

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

INHIBICION DE LA MIGRACION DE LOS
LEUCOCITOS PERIFERICOS EN PACIENTES
ALERGICOS A LA PENICILINA

TESIS PRESENTADA POR
MA. TERESA ARELLANO DOMINGUEZ
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN
ANALISIS CLINICOS

*Maestría en Ciencias
Químicas*

MEXICO, D. F., SEPTIEMBRE DE 1974



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.

El presente trabajo se efectuó bajo la dirección
del Dr. Librado Ortiz-Ortiz
en el Departamento de Ecología Humana
de la Facultad de Medicina
de la U.N.A.M.

Deseo expresar mi más sincero
agradecimiento en primer lugar
al Dr. Librado Ortiz-Ortiz
por su valiosa dirección en la
elaboración de la presente tesis

A los compañeros del Laboratorio
de Inmunología por su colaboración
y amistad que supieron brindarme

Al personal del Departamento
de Ecología Humana
por su sincera acogida

A la memoria de mi padre

Sr. Adalberto Arellano Luna

**A mi madre
Sra. Ma. Guadalupe Dominguez Vda. de Arellano
con profundo reconocimiento**

**A mis hermanos
Adalberto Humberto
Ma. Guadalupe
con todo cariño**

INDICE

Lista de tablas	i
Lista de figuras	ii
Introducción	1
Material y métodos	
A) Material	9
B) Métodos	
Prueba cutánea	10
Prueba de inhibición de la migración MIF	12
Sensibilización pasiva de leucocitos de individuos no alérgicos a penicilina	13
Prueba inversa de la inhibición de la migración de leucocitos pasivamente sensibilizados	14
Inactivación del bacteriófago T ₄	14
Determinación de anticuerpos por medio de la inactivación del fago modificado	18
Inhibición de la inactivación del bacteriófago T ₄	19
Resultados	21
Discusión	27
Conclusiones	31
Bibliografía	33

LISTA DE TABLAS

Tabla

- | | |
|------|---|
| I | Deteminación de grupos peniciloilo por molécula de globulina gamma |
| II | Prueba de la inhibición de la migración de los leucocitos periféricos de individuos alérgicos o no alérgicos a penicilina |
| III | Sensibilización pasiva de leucocitos periféricos de individuos no alérgicos con suero de individuos alérgicos o no alérgicos a penicilina |
| IV | Inhibición por hapteno del factor sensibilizante presente en los sueros de individuos alérgicos a penicilina |
| V | Deteminación de anticuerpos a penicilina por medio de inactivación del bacteriófago T ₄ penicilina |
| VI | Estudio comparativo entre la prueba de MIF pasivo y la inactivación del fago penicilina |
| VII | Inhibición por hapteno (penicilina) de la inactivación del fago penicilina por anticuerpo |
| VIII | Inhibición por hapteno (penicilina) de la inactivación del fago penicilina causado por sueros de individuos alérgicos al medicamento |

LISTA DE FIGURAS

Figura

- 1 Cambio en la movilidad electroforética de globulina gamma
- 2 Inhibición de la migración de los leucocitos de pacientes alérgicos a penicilina por antígeno -globulina gamma-penicilina-
- 3 Inhibición de la migración de los leucocitos de pacientes alérgicos a penicilina por antígeno -globulina gamma-penicilina- (distribución)
- 4 Inactivación del bacteriófago T₄-penicilina por sueros de individuos alérgicos o no alérgicos al antibiótico

INTRODUCCION.

A pesar de la frecuencia de las reacciones alérgicas debidas a drogas se conoce poco acerca de su mecanismo. Las técnicas in vitro hasta hoy descritas para determinar la alergia a drogas (1-6) son poco aceptadas por su falta de sensibilidad y la escasa relación que guardan con los síndromes clínicos, de tal modo que resulta difícil poder utilizarlas como un método de rutina en la búsqueda y cuantificación de los anticuerpos involucrados.

Entre las principales dificultades para determinar la existencia de un estado de hipersensibilidad a drogas tenemos la gran diversidad de respuestas tanto clínicas como inmunológicas que pueden ser observadas, así como el hecho de que generalmente el grado de sensibilización de los individuos es débil o moderado. Por estas razones son necesarias técnicas muy sensibles que permitan determinar varios parámetros inmunológicos.

Para estudiar y comprender los mecanismos que intervienen en las reacciones alérgicas es importante también el conocimiento de la inmunología de las drogas, sus metabolitos y productos de degradación, ya que por ejemplo en el caso de sulfonamidas

-namidas, aspirinas, barbitúricos, etc. se supone que sus productos de degradación o metabolitos unidos a proteínas son los responsables de la sensibilización (7).

Recientemente se han tenido evidencias que la penicilina al ser administrada a los pacientes, sufre cambios produciéndose distintos determinantes hapténicos los cuales debido a su bajo peso molecular no inducen por si solos una reacción inmunológica, pero que combinados a proteínas tisulares a través de uniones covalentes, forman un conjugado proteína-hapteno el cual es capaz de inducir la formación de anticuerpos y en la mayoría de los casos causar la reacción alérgica. También se ha encontrado que la presencia de impurezas de alto peso molecular en la preparación de penicilina semi-sintética forman polímeros que pueden inducir la respuesta inmune (8).

De los determinantes hapténicos que se producen a partir de la penicilina el grupo peniciloilo es el que se forma en mayor proporción (aproximadamente el 95%) y en la mayoría de los casos es el principal responsable de la sensibilidad a ésta droga. In vivo probablemente éste determinante o el ácido penicilénico se acoplan con las proteínas tisulares.

En la alergia a drogas se ha demostrado la presencia de

anticuerpos no solo IgE (homocitotropa) sino también IgG (heterocitotropa) e IgM lo que ocasiona grandes variaciones en las respuestas clínicas e inmunológicas observadas (9).

Ishizaka y col. (10) han reportado que la IgG tiene la capacidad de unirse a neutrófilos y macrófagos y que ésta reacción no ocasiona la liberación de histamina aunque si destruye a la célula. Esta inmunoglobulina también se encuentra sobre las células cebadas solo que en mucho menor proporción que la IgE, lo que sugiere que éstos anticuerpos bloqueadores no compiten con las moléculas de IgE por el alergeno a nivel celular. Por otra parte, la IgE se fija a la célula cebada o al basófilo y una vez que reacciona con el alergeno causa su desgranulación sin destruirla, con la consecuente liberación de sustancias vasoactivas como la histamina y la serotonina que son las responsables de la sintomatología alérgica del paciente. La cantidad de histamina liberada por la célula cebada es de aproximadamente 3.2 a 4.6 picogramos (11).

La presencia de la IgE unida a receptores sobre células cebadas es un prerrequisito para el desarrollo de la hipersensibilidad inmediata. Las aminas vasoactivas liberadas producen anafilaxia local en piel y mucosas de recubrimiento, a través de me-

-canismos mediados por otros factores que posiblemente no están relacionados con el sistema inmune del individuo.

Recientemente han sido desarrolladas varias técnicas in vivo e in vitro para determinar la presencia de anticuerpos anti-droga basadas en las diferentes propiedades de las inmunoglobulinas por ejemplo en la propiedad de la inmunoglobulina G o de la E de sensibilizar por su fragmento Fc tejido heterólogo u homólogo respectivamente; la de unirse a basófilos, la de reaccionar con bacteriófagos modificados por la presencia de antígeno o la combinación de dichos anticuerpos con partículas de sepharosa, etc.

Entre las pruebas in vivo se ha utilizado la transferencia pasiva en humanos para la determinación de inmunoglobulina E (prueba de Praunitz-Küstner). Esta prueba tiene el inconveniente de transmitir enfermedades al receptor sano, y cuando se realiza en animales como el mono, resulta muy costosa y poco sensible. La transferencia pasiva de suero humano a animales tales como el cobayo solo detecta la presencia de inmunoglobulina G, la cual rara vez se encuentra en grandes cantidades en éste tipo de alergias y puede no correlacionar con la reacción clínica del paciente.

La prueba cutánea muy utilizada para el diagnóstico de -

la alergia a medicamentos corre el riesgo de sensibilizar al paciente y el de producir reacciones sistémicas en los individuos altamente sensibilizados; además generalmente solo un pequeño porcentaje de éstos pacientes muestran una prueba cutánea positiva.

Entre las pruebas in vitro para detectar la alergia a medicamentos tenemos la hemaglutinación pasiva por medio de eritrocitos sensibilizados en la cual un resultado negativo puede indicar que los anticuerpos se encuentren en bajas concentraciones o bien que se encuentren fijos a los tejidos en el momento de efectuar la prueba y además en caso de que la prueba sea positiva puede indicar la presencia de IgM, la cual no participa en la anafilaxia.

Se ha demostrado la presencia de anticuerpos reagénicos sensibilizando pasivamente tejido de pulmón humano con sueros alérgicos y cuantificando la histamina liberada por las células cebadas al ponerse en contacto con el antígeno (12-15); Goodfriend y col. (16) así como Ishizaka y col. (11) han utilizado tejido de mono en lugar de tejido humano. Por otra parte Van Arsdel y Sells (17) e Ishizaka y col. (10) han determinado la presencia de inmunoglobulina E por sensibilización de leucocitos.

Basandose en la propiedad heterocitotropa de la inmunoglobulina G, Nielsen (18) sensibilizó pasivamente ñeon de cobayo

y determinó la magnitud de la respuesta por la técnica de Schultz-Dale encontrando una cantidad de anticuerpo sensibilizante del orden de 0.014 mg/ml. para la ovoalbúmina.

Las observaciones de Shelley y Juhlin (19) demuestran la existencia de anticuerpos del tipo IgE por medio de la sensibilización de basófilos de conejo, los cuales en presencia del antígeno presentan alteraciones típicas de los gránulos intracelulares con liberación de histamina. Estos estudios sirvieron de base a Denise y col.(20) para estudiar la desgranulación de basófilos en alergia a varios medicamentos (aspirina, antibióticos, antipiréticos, analgésicos, anti-inflamatorios, etc.)

La inmunofluorescencia ha sido utilizada ampliamente en el estudio de las enfermedades autoinmunes, en la identificación de células formadoras de anticuerpos y en la determinación de complejos antígeno-anticuerpo depositados en órganos o tejidos.

La técnica denominada RAST (Radioallergosorbent technique) usa alérgeno unido a una fase sólida y se hace reaccionar con el suero que contiene la reagina alérgica; después de varios lavados se pone en contacto con una anti-IgE marcada radioactivamente. Se elimina el material en exceso y se mide la radioactividad del complejo formado.

Las técnicas de radioactividad han tenido aplicación en la alergia a drogas y se han utilizado entre otras para autorradiografía determinando así los sitios de combinación en los diferentes tipos de células para las distintas inmunoglobulinas.

Makela (21) y Haimovich y Sela (22) han reportado una técnica muy sensible para determinar concentraciones extremadamente bajas de anticuerpos IgE, IgG e IgM y que está basada en la inactivación por anticuerpos específicos de fagos que han sido modificados por el acoplamiento de drogas.

Otra de las pruebas utilizadas es la inhibición de la migración de los leucocitos obtenidos de sangre periférica del paciente alérgico en que se ha demostrado inhibición de la migración al poner las células en contacto con el antígeno específico (23) en diferentes condiciones alérgicas como enfermedades autoinmunes, en alergias a drogas y a los alimentos.

En un gran número de reacciones a drogas aparecen manifestaciones clínicas como exantemas y eritemas maculopapulares consideradas hoy día como expresiones de reacción de tipo tardío generalizado (24). Halpern y col. (25) han encontrado una relación estrecha entre la prueba de estimulación de linfocitos y las manifestaciones clínicas.

La formación de rosetas que se observa al incubar las células sensibilizadas con los glóbulos rojos de carnero recubiertos con el antígeno específico, sugiere que los linfocitos involucrados pueden ser linfocitos T y por lo tanto responsables de la hipersensibilidad tardía.

Se ha reportado en la alergia a drogas el desarrollo de hipersensibilidad tanto humoral como tardía por lo que se ha considerado a la prueba de inhibición de la migración de los leucocitos como una técnica útil para ayuda en el diagnóstico de la alergia a la penicilina.

El presente trabajo tiene por objeto determinar la presencia del factor inhibidor de la migración (MIF) en la sangre circulante de los pacientes alérgicos a la penicilina y su posible relación con la inmunoglobulina determinada por medio de la inactivación del bacteriófago T₄ modificado con penicilina.

MATERIAL Y METODOS.

Medio líquido de Luria.

Bacto-triptona	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Cloruro de sodio	0.5 g
Agua destilada	1 lt

Calentar hasta la completa disolución y ajustar el pH a 7.0 con NaOH 1 M. Esterilizar durante 30 minutos a 15 libras de presión y posteriormente agregar 10 ml de una solución estéril de glucosa al 20%. Este medio sirve de base a los siguientes:

Medio sólido de Luria. Para las cajas de agar se añaden 13 g de agar por litro de medio líquido de Luria.

Agar blando de Luria. El agar blando fué preparado agregando 7 g de agar por cada litro de medio líquido de Luria.

Determinación de proteína. Se determinó el contenido de proteína en la globulina gamma por la técnica de Lowry y col. (26).

Escherichia coli. La cepa de E.coli B fué obtenida de la colección del Depto. de Ecología Humana de la Facultad de Medicina, UNAM.

Bacteriófago T₄. El bacteriófago fué proporcionado por el Depto. de Ecología Humana, Facultad de Medicina, UNAM.

Pacientes alérgicos. Se obtuvieron leucocitos y suero de pacientes con antecedentes clínicos de hipersensibilidad a penicilina, todos con una previa reacción cutánea positiva de tipo inmediata al antibiótico.

Individuos controles. Se utilizaron como control suero y leucocitos de pacientes con fiebre reumática que habían sido tratados con penicilina por largo tiempo y que nunca mostraron manifestaciones alérgicas y de individuos sin antecedentes de reacciones de hipersensibilidad al antibiótico.

Prueba cutánea. Las pruebas cutáneas fueron realizadas en un hospital con las precauciones apropiadas; se llevaron a cabo por escarificación usando de 2 a 100 unidades de penicilina G. Las pruebas fueron efectuadas de 3 semanas a 2 meses antes del presente trabajo. Las reacciones fueron observadas por 30 minutos aunque la reacción caracterizada por eritema y edema generalmente fué positiva dentro de los primeros 5 minutos.

Preparación del antígeno. Se preparó una solución de 330 mg de globulina gamma humana (Hyland) en 10 ml de una so-

-lución amortiguadora de carbonatos de pH 9.0; posteriormente se agregó gota a gota y en agitación constante una solución que contenía 330 mg de penicilina G, sal sódica cristalizada de 10^6 U (Lake side) disueltos en 6.5 ml del mismo amortiguador de carbonatos. Se incubó en baño maría a 37°C con agitación continua durante 24 horas y después se dializó a 4°C contra un amortiguador de fosfatos de pH 7.0, haciendo varios cambios de la solución hasta la eliminación del carbonato. El antígeno utilizado en nuestros estudios contenía 28 mg de inmunoglobulina por ml y 21.8 moles de penicilina por mol. de globulina gamma. Para demostrar que la conjugación de la globulina gamma con la penicilina se ha llevado a cabo, se efectuó un estudio electroforético (27) de la globulina gamma utilizada para preparar el antígeno y del conjugado globulina gamma-penicilina.

Determinación de grupos peniciloilo. La determinación se efectuó utilizando un método basado en la observación de Woodward y col. (28) del desarrollo de un máximo de absorción a $282\text{ m}\mu$, cuando se agrega HgCl_2 a soluciones alcohólicas peniciladas. Levine (29) sugirió que éste efecto podía aplicarse al análisis de proteína-peniciloil y Parker y col. (3) desarrollaron el siguiente procedimiento.

Titulación preliminar: Colocar en una celdilla del espectrofotómetro 1 ml de la solución problema conteniendo aproximadamente de $2 \text{ a } 5 \times 10^{-5}$ meq de peniciloil y adicionar a diferentes tiempos pequeñas cantidades de 0.01 a 0.02 ml de una solución recién preparada de HgCl_2 2.58×10^{-4} M. Mezclar rápidamente y dejar reposar de 1 a 3 minutos. Después de cada adición leer a 282 mu. (Cuando existe un exceso de HgCl_2 la absorbancia no cambia ó puede inclusive disminuir más de lo esperado debido a un cambio en volumen).

Segunda titulación: Se procede en igual forma para una segunda titulación solo que en esta ocasión se utiliza 1 ml de la solución problema con un volumen inicial de la solución de HgCl_2 que contenga 0.02 ml menos del que se usó en la primera titulación. A continuación se adicionan volúmenes de 0.01 ml de HgCl_2 , hasta que se obtenga claramente el punto final de la reacción.

Prueba de inhibición de la migración. Para su realización se separaron los leucocitos de 20 ml de sangre periférica del paciente, por el método de Wolfson y col. (30) y se lavaron 3 veces con solución balanceada de Hanks (BSS). Las células se resuspendieron en medio RPMI y se ajustaron a una concentración de 30×10^6 células/ml. La suspensión celular fué introducida en tubos

capilares y las células sedimentadas por centrifugación durante 3 minutos a 400 rpm; el tubo capilar se cortó en la interfase células-líquido y el trozo de capilar que contiene las células se expuso al antígeno dentro de una cámara especial de Bloom. En ensayos preliminares se utilizaron dosis de 100 a 500 ug/ml de globulina gamma-penicilina, encontrándose resultados óptimos con una concentración de 100 ug/ml. La prueba de inhibición de la migración de los leucocitos fué reportada en por ciento y se calculó en la siguiente forma:

$$\% \text{ de inhibición de la migración} = 1 - \frac{\text{area promedio de la migración con Ag}}{\text{area promedio de la migración sin Ag}} \times 100$$

Sensibilización pasiva de leucocitos de individuos no alérgicos a penicilina. La sensibilización pasiva de leucocitos de sujetos no alérgicos fué hecha para demostrar que el factor responsable de la inhibición de la migración de los leucocitos de individuos alérgicos a penicilina, estaba presente en el suero. Para efectuar esta prueba el suero de pacientes alérgicos o de controles fué inactivado a 56°C durante 60 minutos y diluído 1:2 o 1:4. Posteriormente fué incubado en volúmenes de 1 ml con 30×10^6 leucocitos normales/ml durante 60 minutos a 37°C. Después de la incubación los leucocitos fueron lavados 3 veces con BSS, empacados por centrifuga-

-ción en tubos capilares y expuestos al antígeno como se describió previamente.

Prueba inversa de la inhibición de la migración de leucocitos pasivamente sensibilizados. Esta prueba fué efectuada en los sueros de individuos alérgicos a la penicilina y tuvo por objeto estudiar si la inhibición de la migración podía ser bloqueada por el hapteno.

Esta prueba fué llevada a cabo incubando los sueros de los individuos alérgicos, con 1 000 a 5 000 unidades de penicilina G, durante 60 minutos, a 37°C. Los sueros así tratados, se adicionaron sobre leucocitos normales para estudiar si todavía conservaban su capacidad sensibilizante. Posteriormente se ensayaron para determinar si se inhibía la migración de estos leucocitos al adicionar antígeno, tal como se describió anteriormente.

Prueba de la inactivación del bacteriófago T₄. La determinación de anticuerpos contra penicilina por medio de la inactivación del bacteriófago T₄ acoplado a penicilina, se efectuó por la técnica de Haimovich y col. (22). Esta técnica es muy sensible y puede determinar muy bajas concentraciones de inmunoglobulinas (0.5 a 2.0 ng) (31).

Determinación del número de fagos: Se prepara un cultivo de 18 hr de E. coli B en 10 ml de medio líquido de Luria. Se toma 0.1 ml del cultivo y se coloca en un matríz estéril que contiene 10 ml de medio líquido de Luria. Se incuba por 1 hr a 37°C en baño María con agitación. A continuación se centrifuga el cultivo a 1 500 rpm durante 10 minutos y se desecha el sobrenadante; la bacteria sedimentada se resuspende en la décima parte de su volúmen original (1ml).

Por separado se colocan en un tubo estéril 0.1 ml del fago y se agregan 2 gotas de la bacteria resuspendida. Se incuba a 42°C por 1 a 2 minutos y se agregan 2.5 ml de agar blando de Luria previamente fundido a 15 libras de presión y manteniendo a 42°C. Se agita suavemente y se vierte la mezcla sobre una caja de Petri que contiene medio sólido de Luria. Para mezclar bien la bacteria y el virus y efectuar una distribución uniforme sobre la superficie del agar se rota la placa suavemente, se deja solidificar y se incuba en una estufa a 37°C durante 24 hr. Cuando el fago infecta a la bacteria la lisa de tal forma que se puede determinar el número de colonias del fago por medio de la formación de pequeñas áreas circulares de lisis sobre la película de crecimiento bacteriano.

Preparación de una solución con elevado título de fago: Se

efectúa un plaqueo por duplicado en la forma anteriormente mencionada, utilizando el fago a una concentración de 10^4 , de manera que las placas de lisis casi sean confluentes. El cultivo así preparado se deja crecer por 4 a 5 horas.

En un matr az nefalom trico, se colocan 20 ml de medio líquido de Luria y se adicionan 0.2 ml del cultivo de 1 hr de E. coli B utilizado para el plaqueo. La mezcla se incuba en baño María a 37°C con agitación suave por aproximadamente 1 hora, hasta obtener un crecimiento en fase logar mica de 5×10^8 bacterias. La determinación del número de bacterias se mide por medio de un fotocolorímetro o un nefelómetro. En seguida el cultivo bacteriano se inocula con una cantidad suficiente de fagos recién crecidos (del que se preparó en 4   5 hr) y se incuba en baño María a 37°C con agitación continúa hasta que la bacteria sea lisada (5 a 6 hr). Posteriormente para lisar la bacteria no infectada, se adiciona al cultivo 1 ml de cloroformo y se deja 15 minutos a temperatura ambiente; se centrifuga durante 15 minutos a 4 000 rpm; se separa el sobrenadante, se esteriliza por filtración y se titula la concentración de fago/ml obtenida.

Titulación de bacteriofago: Para titular el fago se efectúan diferentes diluciones del sobrenadante obtenido después del trata-

-miento con cloroformo usando para el caso el mismo medio de Luria; por ejemplo: 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} . Con las 3 últimas diluciones se efectúa por duplicado un plaqueo en la forma ya mencionada, y se deja incubar 24 hr a 37°C . Al día siguiente se cuentan las colonias de fago obtenidas y se calcula el título, considerando tanto la dilución como la cantidad de fago utilizada.

Acoplamiento de la penicilina G al bacteriófago T_4 : Aproximadamente 15 ml del cultivo anterior fueron dializados durante 2 días contra un amortiguador de carbonatos 0.1 M de pH 9.5 realizando cambios frecuentes. El material obtenido fue esterilizado por filtración y 10 ml de la solución fueron tratados con 1 g de penicilina G disuelta en 2 ml del mismo amortiguador de carbonatos (100 mg/ml de bacteriófagos). La adición fue realizada gota a gota con agitación continua. Una vez que la penicilina fue adicionada se incubó en baño María a 37°C durante 24 horas continuando la agitación. La solución se dializó nuevamente, pero ahora contra un amortiguador de fosfatos 0.05 M de pH 7.0. Durante el acoplamiento gran parte de los bacteriófagos se inactiva y el título suele caer hasta un 10% del valor inicial. El material obtenido se esterilizó por filtración y se tituló nuevamente utilizando como diluyente el amortiguador de fosfatos. Generalmente el título obtenido después

del acoplamiento fué de 1.5×10^8 bacteriófagos/ml. El fago control fué procesado exactamente igual que el fago modificado, solo que no se trató con penicilina.

Determinación de anticuerpos por medio de la inactivación del fago modificado. Tanto el fago combinado con penicilina, como el fago control fueron diluidos a una concentración capaz de producir 200 a 400 placas de lisis. Los sueros utilizados fueron diluidos 1:5 con solución salina estéril y ensayados antes y después de ser inactivados. La inactivación fué realizada durante 5 hr a 56°C . Para la prueba se colocó en un tubo estéril 0.1 ml del fago penicilinado y 0.4 ml del suero diluido. La mezcla fué incubada a 37°C durante 5 hr y posteriormente plaqueadas por duplicado e incubadas a 37°C por 24 hr. Se determinó el número de colonias de fago no inactivadas.

El control de cada uno de los sueros ensayados fué preparado en igual forma, solo que se substituyó el fago penicilinado por un fago no modificado. También se incluyó un control de fago cuyo título correspondía al 100% de fago, o sea a un 0% de inactivación y que consistía de 0.4 ml de medio líquido de Luria en lugar del suero diluido bajo ensayo.

El número obtenido de placas de lisis, se relacionó al de

placas por ml y después a por ciento, considerando el control del fago como 100%. La diferencia entre 100 y el por ciento de placas nos indica el por ciento de inhibición. El por ciento de inactivación real del fago, se obtiene restando el por ciento de inhibición del fago control del por ciento de inhibición del fago-penicilinado.

• Inhibición de la inactivación del bacteriófago T₄. Esta prueba se efectuó con el objeto de determinar si el factor que interviene en la inhibición del fago-penicilina es una inmunoglobulina o bien si es un factor diferente. Para ello se trató previamente el suero en estudio con cantidades variables de penicilina (20,000U, 2,000U, 200U, 20U, 2U, 0.2U, 0.02U). Experimentalmente las concentraciones de 20,000U y 2,000U inhibieron el crecimiento de la bacteria por lo que en estudios subsecuentes solo se utilizaron las concentraciones inferiores de 20U. La reacción se llevó a cabo por incubación a 37°C de 0.4 ml del suero inactivado y diluido 1:4 con 0.1 ml de las diferentes diluciones de penicilina durante 2 hr. A continuación la mezcla se colocó a 4°C durante 18 hr y posteriormente se efectuó la prueba de inactivación del bacteriófago utilizando 0.4 ml del suero tratado con penicilina y 0.1 ml del fago penicilinado.

Análisis estadístico. Se utilizó la prueba de Fisher's para determinar la homogenicidad de las varianzas entre grupos. Cuando éstas variaciones fueron homogéneas, se aplicó la prueba t de Student Fisher's (32) para estimar la significancia entre las medias.

En cambio cuando las varianzas fueron heterogéneas la prueba utilizada fué la de U de Mann-Whitney's (33) para estimar la significancia de esas diferencias.

RESULTADOS.

Movilidad electroforética de la globulina gamma-penicilina. Los estudios realizados por electroforésis muestran cambios en la movilidad entre la globulina gamma sola y el complejo globulina gamma-penicilina, lo que indica que la penicilina se ha combinado a la molécula protéica y al hacerlo ha modificado la carga de la globulina (Fig. 1).

Determinación del número de grupos peniciloilo por mol de globulina gamma. Se titularon 0.5 ml de la muestra (28 mg/ml de proteína) diluída 1:50, con la solución 2.58×10^{-4} M de HgCl_2 . Como puede observarse en la Tabla I 0.09 ml de HgCl_2 fueron suficiente para obtener una máxima absorción. Para determinar las moles de penicilina se efectuaron los siguientes cálculos: como solo se utilizaron 0.5 ml de la muestra diluída 1:50, multiplicamos 0.09 por 100 para obtener el resultado en ml y por 1000 para calcular la molaridad. Si un litro contiene 2.58×10^{-4} M de HgCl_2 en 9 litros tenemos 0.2322×10^{-2} moles y ya que una mol de Hg es igual a 1.6 moles de penicilina, el conjugado contiene 0.37152×10^{-2} moles de penicilina/lit.

Si el peso molecular de la inmunoglobulina es de -

156,000, las moles por litro a que corresponden los 28 mg/ml del antígeno es de 0.17×10^{-3} moles/lit. La relación entre las moles de penicilina y las moles de inmunoglobulina nos indica que el antígeno contenía 21.8 moles de penicilina por mol de globulina gamma.

Factor inhibidor de la migración de leucocitos periféricos (MIF). Los leucocitos de individuos alérgicos a penicilina son inhibidos en su migración cuando se ponen en contacto con el antígeno globulina gamma-penicilina. Sin embargo los leucocitos de estos pacientes migran normalmente cuando se utiliza a la misma concentración la globulina gamma sola (Fig. 2). Los valores obtenidos pueden apreciarse tanto en la Tabla II como en la Fig. 3. Se observaron algunas diferencias cuando se compararon estos resultados con los obtenidos por medio de la prueba cutánea de 22 individuos clínicamente alérgicos a penicilina, todos dieron prueba cutánea positiva mientras que la prueba de inhibición de la migración de los leucocitos (MIF) fué positiva en el 68%.

Ninguno de los individuos no alérgicos a la penicilina dió positivo los estudios de inhibición de la migración in vitro, a pesar de que 5 de estos pacientes habían estado en continuo tratamiento con la droga por espacio de 2 años o más.

Inhibición de la migración de leucocitos de individuos no alérgicos sensibilizados pasivamente con suero de pacientes alérgicos MIF pasivo. La migración de los leucocitos de individuos no alérgicos a penicilina que fueron tratados con sueros de individuos alérgicos, fué inhibida al adicionar 100 ug de globulina gamma-penicilina (Tabla III). Uno de los sueros ensayados de un individuo clínicamente alérgico a penicilina dió resultado negativo, pero la -- prueba cutánea fué también negativa. Por otro lado el suero de individuos controles no alérgicos a penicilina, no fué capaz de sensibilizar los leucocitos normales de individuos no alérgicos.

Inhibición por hapteno del factor sensibilizante de los leucocitos en la prueba pasiva de migración leucocitaria. No se observó inhibición en la migración cuando se agregó previamente penicilina G, en dosis variables de 1,000 a 5,000 unidades a 1 ml de suero que previamente había sensibilizado y por tanto inhibido la migración de leucocitos normales de individuos no alérgicos. Los leucocitos sensibilizados en estos sueros tratados previamente con penicilina, se comportaron como leucocitos de individuos no alérgicos (Tabla IV).

Determinación de anticuerpos a penicilina por medio de la inactivación del bacteriófago T₄-penicilina. Como puede obser

-vase en la Tabla V, los sueros calentados ó sin calentar de pacientes alérgicos a penicilina, contenían anticuerpos contra el antibiótico. La inactivación del fago-penicilina por éstos sueros varió desde 17.5% hasta 92.5%; por otra parte en los controles se obtuvieron valores de 0% a 10.9%.

En la Figura 4 vemos que los valores de los 18 sueros no calentados de pacientes alérgicos o no alérgicos a penicilina, alcanzaron cifras ligeramente mayores que la de los 19 sueros calentados. El 55% de las muestras no calentadas inactivaron más del 50% del fago-penicilina, en comparación con el 36.8% observado en los sueros calentados. En el 22.2% de los casos (4) el valor fué invertido y solo en el 11.1% (2) el valor de los sueros tanto calentados como no calentados fué igual. Por otra parte, los sueros de individuos normales inactivaron el fago-penicilina en menos de 10.9% .

Comparación entre la prueba de MIF pasivo y la inactivación del fago-penicilina. En la Tabla VI se muestra una comparación de los resultados obtenidos con los sueros de individuos alérgicos usando la prueba de MIF pasivo y la inactivación del fago tanto en los sueros calentados como en los no calentados. En los sueros controles de individuos no alérgicos a penicilina cuyo MIF pasivo fué negativo, la inactivación del fago fué inferior al 10.9%.

Por el contrario los sueros de pacientes no alérgicos a la penicilina cuya prueba de MIF directo era negativa, pero que habían estado con un tratamiento continuado por largo tiempo con el antibiótico inactivaron el fago-penicilina. El grado de inactivación fué comparable al observado con los sueros que tenían una prueba de MIF - pasivo positiva (>18.9%).

Inhibición por hapteno de la inactivación del bacteriófago T₄-penicilina. En estudios preliminares se determinó la cantidad de penicilina que no inhibe el sistema. Para el caso un suero de un sujeto alérgico fué tratado con cantidades variables de hapteno y como lo muestra la Tabla VII, concentraciones superiores a 2,000U inhibieron el crecimiento de la bacteria E. coli B. Sin embargo usando concentraciones menores de 2 U se obtuvo la inhibición total del anticuerpo anti-penicilina. Debido a ésta razón en estudios sucesivos se utilizaron concentraciones que variaron desde 20 U hasta - 0.02 U.

Los resultados del efecto del tratamiento de los sueros con penicilina, se encuentran recopilados en la Tabla VIII. De 6 - sueros con MIF positivo solo 3 fueron inhibidos cuando se trataron con las cantidades de penicilina antes mencionadas. En otro de los casos se observó una inhibición del 45% a una concentración de hap-

-teno de 0.02 U. Sin embargo, en lo que se refiere a los sueros con pruebas de MIF negativas, en 3 pacientes no alérgicos a la penicilina pero que se mantenían bajo tratamiento por largo tiempo con esta droga, y los 3 controles normales, no se obtuvo ninguna inhibición de su efecto inactivante del bacteriófago.

DISCUSION

El método de la inhibición de la migración de los leucocitos en éste estudio, ha demostrado ser una técnica relativamente fácil, práctica y útil para el diagnóstico de alergia a la penicilina y debido a su gran especificidad puede utilizarse en el diagnóstico de otras manifestaciones alérgicas, sin exponer al paciente a riesgos de sensibilización que implica la prueba cutánea.

Aunque la técnica originalmente fué descrita para determinar la hipersensibilidad de tipo tardío, midiendo la inhibición de la migración de macrófagos en cobayos sensibilizados (34), en el sistema que nos ocupa, la inhibición de la migración de los leucocitos periféricos puede deberse a la presencia de complejos antígeno-anticuerpo o a la de inmunoglobulinas citofílicas que se sabe tienen éste efecto (35), puesto que la cantidad de macrófagos y monocitos presentes en la sangre circulante es muy baja como para mostrar un efecto similar al observado en el sistema linfocito-macrófago del cobayo.

Nuestros resultados muestran que la prueba de MIF no requiere en éste caso particular de células para afectar la inhibición de la migración leucocitaria ya que el suero de los pacientes alérgi-

-cos es capaz de sensibilizar leucocitos de individuos normales que pueden posteriormente ser inhibidos en su migración por el antígeno. Este factor responsable es estable a la temperatura, resistiendo el calentamiento a 56°C durante 60 minutos.

El hecho de que ésta reacción pueda ser inhibida por la presencia del hapteno penicilina, indica la especificidad de la reacción y apunta fuertemente su naturaleza inmunológica.

La propiedad termoestable que tiene éste factor o inmunoglobulina sugiere que se trate de una inmunoglobulina de la clase IgG.

La técnica de inhibición de migración leucocitaria mostró una mayor correlación con los síntomas clínicos de los pacientes estudiados que la técnica de inactivación del fago penicilado. Esta diferencia en resultados podría ser explicada en base a que la primera mide únicamente globulinas citotropas mientras que la segunda técnica mide globulinas tanto citotropas como no citotropas. Esto ocasiona que el suero de sujetos sin antecedentes clínicos de alergia al medicamento puedan inactivar el fago con penicilina, debido a que el suero contiene inmunoglobulinas no involucradas en la sintomatología alérgica. Levin y col. (36) han reportado la presencia de IgM, IgG, IgA e IgE en el suero de recién nacidos y el de sus pro-

-genitoras, sin que presentaran datos clínicos de alergia a penicilina.

La inactivación del bacteriófago T_4 sin penicilina por el suero de sujetos tanto alérgicos como normales, mostró títulos de inactivación elevados, hecho que no se observó en los sujetos normales cuando se usó el fago modificado por la penicilina. Este hallazgo podría deberse a la presencia de anticuerpos contra el fago debido posiblemente a la presencia de éste último en E.coli. Infecciones por éste microorganismo serían las responsables de la presencia de anticuerpos anti- T_4 . Sin embargo es notable como al modificar el fago por su unión con la penicilina adquiere otra especificidad y es inactivado solamente con los sueros de pacientes alérgicos a la penicilina, pero no con los controles normales. Es por esta causa que no se reportan los resultados en base a inactivación del fago control sino solamente inactivación del bacteriófago-penicilina.

La diferencia en la inactivación del fago-penicilina entre los sueros calentados y no calentados indican la presencia de un anticuerpo termolábil, seguramente IgE, el cual se inactiva a 56°C . La inactivación del fago modificado por la penicilina al contacto con el suero calentando durante 5 horas a 56°C demuestra la presencia de anticuerpos termoresistentes como IgG, IgM ó IgA.

La cantidad de hapteno utilizada para inhibir el anticuerpo en la prueba del fago-penicilina fué menor de 20 unidades. Esto contrasta con la cantidad utilizada para bloquear la prueba de MIF. Sin embargo es necesario considerar que en la prueba de MIF, los leucocitos sensibilizados son lavados por lo que cualquier exceso del antibiótico es eliminado. En el caso del bloqueo del anticuerpo para la prueba del fago, la cantidad de penicilina, aunque en baja concentración, se encuentra presente a lo largo de la duración de la prueba. Sin embargo podemos indicar que la especificidad de la prueba de MIF es evidente en éstos experimentos de bloqueo con hapteno.

CONCLUSIONES

Debido a que no existen técnicas sensibles y prácticas para establecer un diagnóstico en la alergia a medicamentos, se propone la prueba de MIF (factor inhibidor de la migración de los leucocitos periféricos) como una técnica relativamente sencilla, útil, sensible y específica para determinar en un momento dado la sensibilidad de un individuo a la droga sin exponerlo a riesgos como en el caso de la prueba cutánea.

Los leucocitos de los pacientes alérgicos a la penicilina son inhibidos en su migración cuando se exponen al antígeno (penicilina-globulina gamma), hecho que no se observó cuando los leucocitos de individuos no alérgicos fueron expuestos al mismo antígeno.

Se estudiaron algunas características del factor responsable del MIF y se demostró que no era necesaria la presencia de las células, ya que es posible sensibilizar leucocitos de individuos normales con el suero de pacientes alérgicos.

Este factor presente en el suero es una sustancia termolabile que resiste el calentamiento a 56°C durante 5 horas.

Se observó que los sueros de individuos alérgicos a penicilina previamente tratados con el hapteno (penicilina G) fueron capaces de inhibir la prueba que antes había sido positiva, hecho que implica la participación de un anticuerpo.

Como método de comparación en la determinación de anticuerpos anti-penicilina presentes en los sueros en estudio, se utilizó la técnica de inactivación del bacteriófago T₄-penicilina, encontrando por ésta prueba valores positivos tanto para los sueros de pacientes alérgicos a penicilina como de individuos no alérgicos pero bajo tratamiento con éste medicamento por largo tiempo; en cambio los sujetos normales que no han recibido el medicamento por lo menos durante los dos últimos años antes del estudio dieron resultados negativos.

La inhibición de la inactivación del bacteriófago solo se llevó a cabo en 3 de los sueros estudiados lo que podría sugerir que por ésta técnica se determinan anticuerpos de diferentes tipos.

BIBLIOGRAFIA

1. Salazar Mallen, M., y Ortiz-Ortiz, L. Sur Serologischen diagnostik bei pwnicillinuberempfindlinchkeit. *Allerg. and Asthma*, 6: 227, 1960.
2. Finke, S.R., Grieco, M.H., Connell, J.T., Smith, E.C. y Sherman, W.B., Results of comparative skin test with penicilloyl polylysine and penicillin in patients with penicillin allergy, *Amer. J. Med.*, 38: 71, 1965.
3. Parker, C.W., De Weck, A.L., Kern, M., y Eisen, H.N., The preparation and some properties of penicillenic acid derivatives relevant to penicillin by hypersensitivity. *J. Exp. Med.*, 115: 803, 1962.
4. Parker, C.W., Shapiro, J., Kern, M. y Eisen, H.N., Hypersensitivity to penicillenic acid derivatives in human beings with penicillin allergy. *J. Exp. Med.*, 115: 821, 1962.
5. Voss, H.E., Redimond, A.P., y Levine, B.B., Clinical detection of the potential allergic reactor to penicillin by immunological test. *J. Allerg.*, 37: 99, 1966.
6. De Weck, A.L., y Blum, G., Recent clinical and immunological aspects of penicillin allergy. *Int. Arch. Allerg.*, 27: 221, 1961.
7. Levine, B.B., Immunochemical mechanisms of drug allergy. *En Immunopharmacology*, H.O. Schild ed. Pergamon Press., 1966 p. 143.
8. Shaltiel, S., Misrahi, R., y Sela, M., On the immunological properties of penicillins. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 179: 411, 1971
9. De Weck, A.L., Critical evaluation of diagnostic methods in drug allergy. *En Allergology*, J. Charpin, C. Boutin and J. Aubert eds. *Excerpta Médica*, Amsterdam., 1971 p. 23
10. Ishizaka, T., De Bernardo, R., Tomioka, H., Lichtenstein, L.M. e Ishizaka, K., Identification of basophil granulocytes as a site of allergic histamine release. *J. Immunol.*, 108: 1000, 1972.

11. Ishizaka, T., Ishizaka, K., y Tomioka, H., Release of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) by IgE anti IgE reactions on monkey mast cells. *J. Immunol.* 108: 513, 1972.
12. Foucard, T., Aas, K., y Johansson, S.G.O., Concentration of IgE antibodies PK titers and chopped lung titers in sera from children with hypersensitivity to cod. *J. Clin. Immunol.*, 51: 39, 1973.
13. Greaves, M.W., Yamamoto, S., y Fairley, V.M., IgE mediated hypersensitivity in human skin studied using a new in vitro method *Immunol.*, 23: 239, 1972.
14. Mongar, J.L., y Schild, H.O., Inhibition of the anaphylactic reaction. *J. Physiol.*, 135: 301, 1957
15. Sheard, P., Killingback, P.G., y Blair, A.M.J.N., Antigen induced release of histamine and SRS-A from human lung passively sensitized with reaginic serum. *Nature*, 216: 283, 1967.
16. Goodfriend, L., Kovacs, B.A., y Rose, B., In vitro sensitization of monkey lung fragments with human ragweed atopic serum. *Int. Arch. Allerg.*, 30: 511, 1966.
17. Van Arsdel, P., y Sells, C.J., Antigenic histamine release from passively sensitized human leucocytes. *Science*, 141: 1190, 1963.
18. Nielsen, G.B., Terres, G., y Feigen, G.A., Adsorption of antibody in vitro and magnitude of Schultz-Dale reaction of guinea-pig ileum. *Science*, 130: 41, 1959
19. Shelley, W.B., y Juhlin, L., A new test for detecting anaphylactic sensitivity the basophil reaction. *Nature (Lond)*, 191: 1056, 1961.
20. Denise, A., Grilliant, J.P., y Pupil, P., Basophil degranulation in drug allergy. En Mechanism in drug allergy, C.H. Dash, and H.E.H. Jones eds. Churchill Livingstone. Edinburgh and London., 1972 p. 159

21. Makela, O., Assay of anti-hapten antibody with the aid of hapten coupled bacteriophage, *Immunol. (Lond.)*, 10: 81, 1966.
22. Haimovich, J., Sela, M., Dewdney, J.M., y Batchelor, F.R. Anti-penicilloyl antibodies: Detection with penicilloylated bacteriophage and isolation with a specific immunoabsorbent, *Nature (Lond.)* 214: 1369, 1970
23. Sjøborg, M., y Bendixen, G., Human lymphocyte migration as parameter of hypersensitivity. *Acta Med. Scand.*, 181: 247, 1967.
24. De Weck, A.L., Immunochemical mechanisms in drug allergy. *En Mechanisms in drug allergy*, C.H. Dash, and H.E.H. Jones eds. Churchill Livingstone. Edinburgh and London., 1972 p.2
25. Halpern, B., y Amache, N., Diagnosis of drug allergy with the lymphocyte transformation test. *J. Allerg.*, 40: 168, 1967
26. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., y Randall, R.J., Protein measure with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
27. Grunbaum, B.W., Kirk, P.L. y Atchley, W.A., Micro-electrophoresis on cellulose acetate membranes. *Anal. Chem.*, 32: 1361, 1960
28. Woodward, J., *En The chemistry of penicillin*. H.T. Clark, J.R., Johnsson, and R. Robinson eds. Princeton University Press., 1949 p. 427.
29. Levine, B.B., The N (D-benzylpenicilloyl) group as an antigenic determinant in rabbits immunized with benzylpenicillin. *Fed. Proc.*, 20: 28, 1961
30. Wolfson, R.L., Maddison, S.E., y Kagan, I.G., Migration inhibition of peripheral leucocytes in human schistosomiasis. *J. Immunol.*, 109: 123, 1972.
31. Haimovich, J., y Sela, M., Protein bacteriophage conjugates: Application in detection of antibodies and antigens. *Science.*, 164: 1279, 1969

32. Fisher, R.A., Statistical methods for research workers (5th ed.) Edinburgh: Oliver & Boyd, 1934
33. Mann, H.B. y Whitney, D.R., On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann. Math. Statit.*, 18: 50, 1947.
34. Bloom, B.R., y Bennett, B., Mechanisms of a reaction *in vitro* associated with delayed type hypersensitivity. *Science*, 153: 80, 1966
35. Wasserman, J., y Packalen, T., Immune response to thyroglobulin in experimental allergic thyroiditis. *Immunol.*, 9: 1, 1965.
36. Levin, S., Altman, Y., Nir, E., Hurwitz, E., y Sela, M., Penicillin antibodies and immunoglobulin production in newborn infants: Studies with chemically modified bacteriophage. *Pediat. Res.*, 7: 675, 1973.

TABLA I

DETERMINACION DE GRUPOS PENICILOILO POR MOLECULA
DE GLOBULINA GAMMA

Volumen adicionado	Primera titulación	Segunda titulación
0.01 ml	0.450	- - -
0.02 ml	0.557	- - -
0.03 ml	0.670	- - -
0.04 ml	0.780	- - -
0.05 ml	0.900	- - -
0.06 ml	0.980	0.940
0.07 ml	1.050	1.020
0.08 ml	1.090	1.040
0.09 ml	1.100	1.050
0.10 ml	1.100	1.050
0.11 ml	1.100	1.050
0.12 ml	1.090	1.040
0.13 ml	1.070	1.030

La lectura inicial de 0.5 ml de la muestra diluida 1:50 y adicionada de 1.5 ml de agua destilada fué de 0.323 en la primera titulación y de 0.324 para la segunda. Estas lecturas se efectuaron a 282 mu.

TABLA II

PRUEBA DE INHIBICION DE LA MIGRACION EN LEUCOCITOS PERIFERICOS DE
INDIVIDUOS ALERGICOS O NO ALERGICOS A PENICILINA

Manifestaciones clínicas	Pruebas de inhibición de la migración positivo/total	Prueba cutánea positivo/total
Reacción anafiláctica	10 / 15	13 / 13
Prueba cutánea positiva	5 / 7	7 / 7
Pacientes de fiebre reumática no alérgicos	0 / 5	NSH ^a
Individuos no alérgicos	0 / 10	NSH

a) N S H no se hizo

TABLA III

SENSIBILIZACION PASIVA DE LEUCOCITOS PERIFERICOS DE INDIVIDUOS
NO ALERGICOS CON SUERO DE INDIVIDUOS ALERGICOS O NO ALERGICOS
A PENICILINA

Grupo	Prueba ^a cutánea	MIF pasivo ^b % inhibición	Promedio inhibición de migración ± E. E.
Pacientes alérgicos			
1	+	55.5	
2	+	80.4	
3	+	25.0	
4	+	46.5	
5	Neg	20.0	
6	NSH	27.0	
7	NSH	32.0	
8	+	50.0	
9	+	20.0	
10	+	31.0	
11	+	31.0	38.0 ± 5.5 ^c
Individuos no alérgicos			
1	Neg	15.5	
2	Neg	9.0	
3	Neg	8.6	
4	Neg	13.3	
5	Neg	8.0	
6	Neg	1.0	
7	Neg	4.0	8.5 ± 1.9

a) La prueba cutánea fué efectuada por escarificación de la piel con 2 a 100 unidades de penicilina G.

b) Leucocitos de individuos no alérgicos fueron sensibilizados con el suero alérgico, lavados 3 veces con Hanks' BSS y finalmente puestos en contacto con el antígeno.

c) El valor P determinado por la prueba de Mann-Whitney's (2D. E.) fué de < 0.002

TABLA IV

INHIBICION POR HAPTENO DEL FACTOR SENSIBILIZANTE PRESENTE EN LOS SUEROS DE
INDIVIDUOS ALERGICOS A PENICILINA^a

Sueros	Prueba de inhibición de la migración pasiva					p ^d
	Suero no tratado ^b		Suero tratado ^c			
	positivo/total	promedio migración \pm E	positivo/total	promedio migración \pm E	E	
Alérgicos a penicilina	5/5	31.6 \pm 5.1	0/5	12.6 \pm 3.1		< 0.02
No alérgicos a penicilina	0/5	8.2 \pm 1.5	0/5	6.1 \pm 1.5		> 0.3

- a) El suero fué obtenido de individuos clínicamente alérgicos a penicilina con una prueba de inhibición de la migración positiva o de individuos no alérgicos con una prueba de inhibición de la migración negativa.
- b) Suero de individuos alérgicos o no alérgicos a penicilina previamente inactivados a 56°C por 60 minutos fueron incubados con leucocitos obtenidos de individuos normales no alérgicos (ver material y métodos)
- c) El suero inactivado fué incubado con penicilina G por 60 minutos a 37°C, antes de la sensibilización de leucocitos normales obtenidos de individuos no alérgicos a penicilina.
- d) El valor de P fué determinado por la prueba t de Student's.

TABLA V

DETERMINACION DE ANTICUERPOS A PENICILINA POR MEDIO DE LA
INACTIVACION BACTERIOFAGO T₄- PENICILINA.

Sueros	No calentados	Calentados ^a	Diferencia ^b
Alérgicos	65.1	53.8	11.3
	44.2	44.8	0
	38.2	47.8	*
	80.7	61.5	19.2
	NSH ^c	60.4	- -
	28.6	18.9	9.7
	69.2	26.6	42.6
	29.5	29.1	0
	72.7	64.7	8.0
No alérgicos	85.1	88.0	*
	46.0	44.0	2.0
	17.5	27.5	*
	49.3	35.1	14.2
	70.5	25.1	45.4
	92.5	35.0	57.5
	57.1	28.3	28.8
	86.8	68.0	18.8
	57.2	53.8	3.4
	35.8	44.0	*
Controles	3.8	2.4	1.4
	5.7	10.9	*
	NSH	5.9	- - -
	NSH	3.6	- - -
	NSH	0	- - -

a) Sueros inactivados por 5 horas a 56°C

b) Diferencia entre los valores del suero no calentado y el suero calentado

c) NSH no se hizo

NOTA: Los valores corresponden a por ciento de inactivación del bacteriófago T₄ penicilina.

TABLA VI

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LA PRUEBA DE MIF PASIVO Y
LA INACTIVACION DEL FAGO PENICILINA

Sueros	MIF pasivo	Inactivación del fago penicilina		Diferencia ^a
		Sueros no calentados	Sueros calentados	
Alérgicos	80.4 %	65.1	53.8	11.4
	32.0 %	44.2	44.8	*
	31.0 %	80.7	61.5	19.2
	55.0 %	28.6	18.9	9.7
	25.0 %	69.2	26.6	42.6
		72.7	64.7	8.0

No alérgicos

a) individuos que no han recibido penicilina en los 2 últimos años

Neg	3.8	2.4	1.4
Neg	5.7	10.9	*
Neg	NSH ^b	5.9	-
Neg	NSH	3.6	-
Neg	NSH	0	-

b) individuos con tratamiento prolongado con el antibiótico

Neg	85.1	88.0	*
Neg	92.5	35.0	57.5
Neg	57.1	28.3	28.8
Neg	86.8	68.0	18.8
Neg	35.8	44.0	*

a) Diferencia entre los valores obtenidos con los sueros no calentados y los sueros calentados

b) NSH no se hizo

*) valores invertidos

TABLA VII

INHIBICION POR HAPTENO (PENICILINA) DE LA INACTIVACION
DEL FAGO-PENICILINA POR ANTICUERPO^a

Unidades de penicilina ^b	Colonias de fago ^c	% de inactivación del fago
20,000 U	0 ^d	—
2,000 U	0	—
200 U	319	21.6
20 U	373	8.3
2 U	410	0
0.2 U	418	0
0.02U	425	0

a) Se usó el suero de un individuo clínicamente alérgico a la penicilina con prueba cutánea y MIF positivos.

b) Unidades de penicilina adicionados al suero

c) Número de colonias de crecimiento del fago obtenidas

d) Se inhibió el crecimiento de la bacteria E. coli B

e) Como control se utilizó suero sin penicilina dando un crecimiento de 408 colonias de fagos el cual se tomó como 100%.

TABLA VIII

INHIBICION POR HAPTENO (PENICILINA) DE LA INACTIVACION DEL FAGO
 PENICILINA CAUSADO POR SUEROS DE INDIVIDUOS ALERGICOS AL
 MEDICAMENTO

Pacientes	C ^a	Unidades de penicilina ^b				MIF
		20	2	0.2	0.02	
Alérgicos						
	12.8	NSH ^c	3.7	NSH	NSH	32.0
	47.8	NSH	0	NSH	NSH	47.5
	23.3	8.3	0	0	0	42.0
	45.5	NSH	35.1	45.5	NSH	80.4
	64.0	71.7	66.2	75.0	63.5	31.0
	21.5	25.9	26.4	21.0	12.2	55.0
No alérgicos bajo tratamiento con penicilina						
	15.6	NSH	12.4	19.5	18.7	Neg
	22.0	NSH	23.7	27.0	NSH	Neg
	85.0	85.4	84.8	86.0	84.3	Neg
Controles no alérgicos						
	10.6	12.8	12.2	8.4	8.4	Neg
	11.7	17.1	16.6	10.0	12.8	Neg

a) Control. Se utilizó suero no tratado previamente con penicilina y trabajado en las mismas condiciones que las demás muestras.

b) Unidades de penicilina previamente adicionadas al suero antes de tratarlo con el fago.

c) NSH no se hizo.

NOTA: Exceptuando los valores de MIF que se reportan como porciento de inhibición de migración de los leucocitos, las cifras anotadas corresponden a porcentos de inhibición de inactivación del fago.

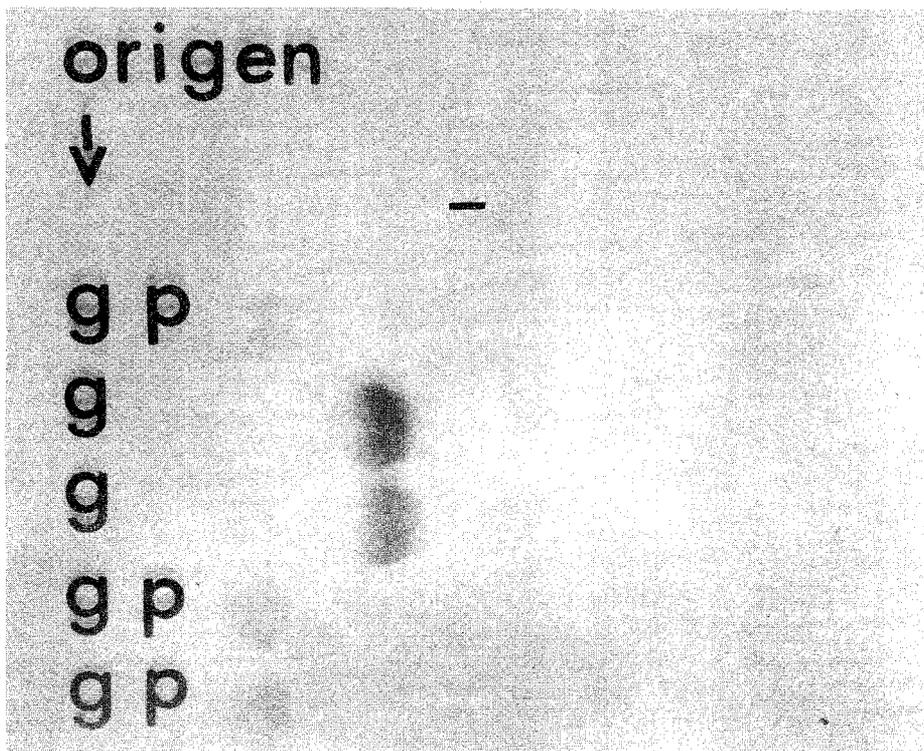
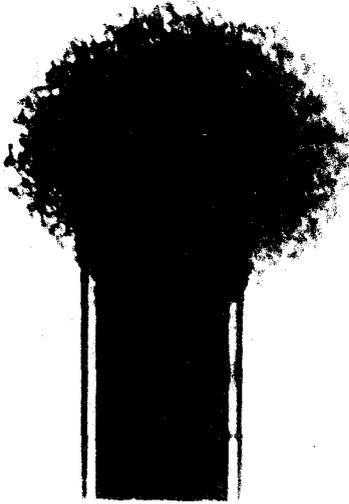


Fig. 1. Cambio de la movilidad electroforética de globulina gamma (g) cuando se le acopla penicilina (gp).

A



B

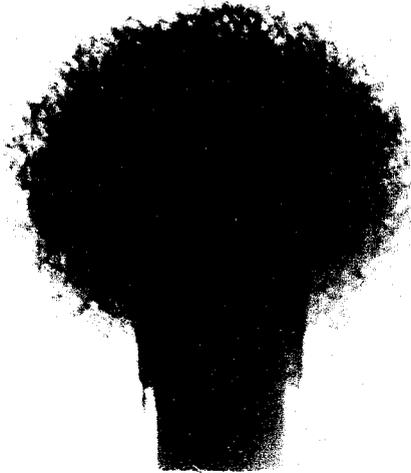


Fig. 2. Inhibición de la migración de los leucocitos de pacientes alérgicos a penicilina por antígeno-globulina gamma-penicilina- (A). Los leucocitos del paciente en medio de cultivo sin antígeno no son inhibidos en su migración (B).

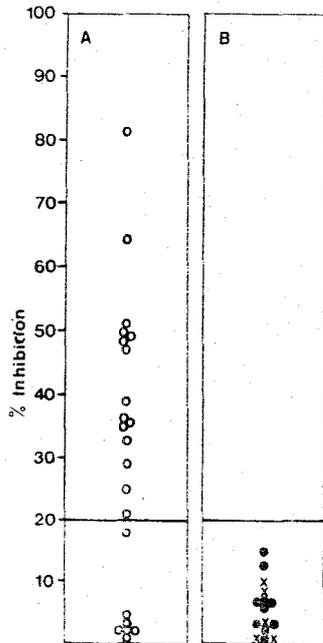


Fig. 3. Inhibición de la migración de leucocitos de pacientes alérgicos a penicilina por antígeno-globulina gamma-penicilina (A). Los leucocitos de sujetos normales (●) o pacientes no alérgicos a penicilina que habían recibido tratamiento prolongado con el antibiótico (x) no fueron inhibidos en su migración (B).

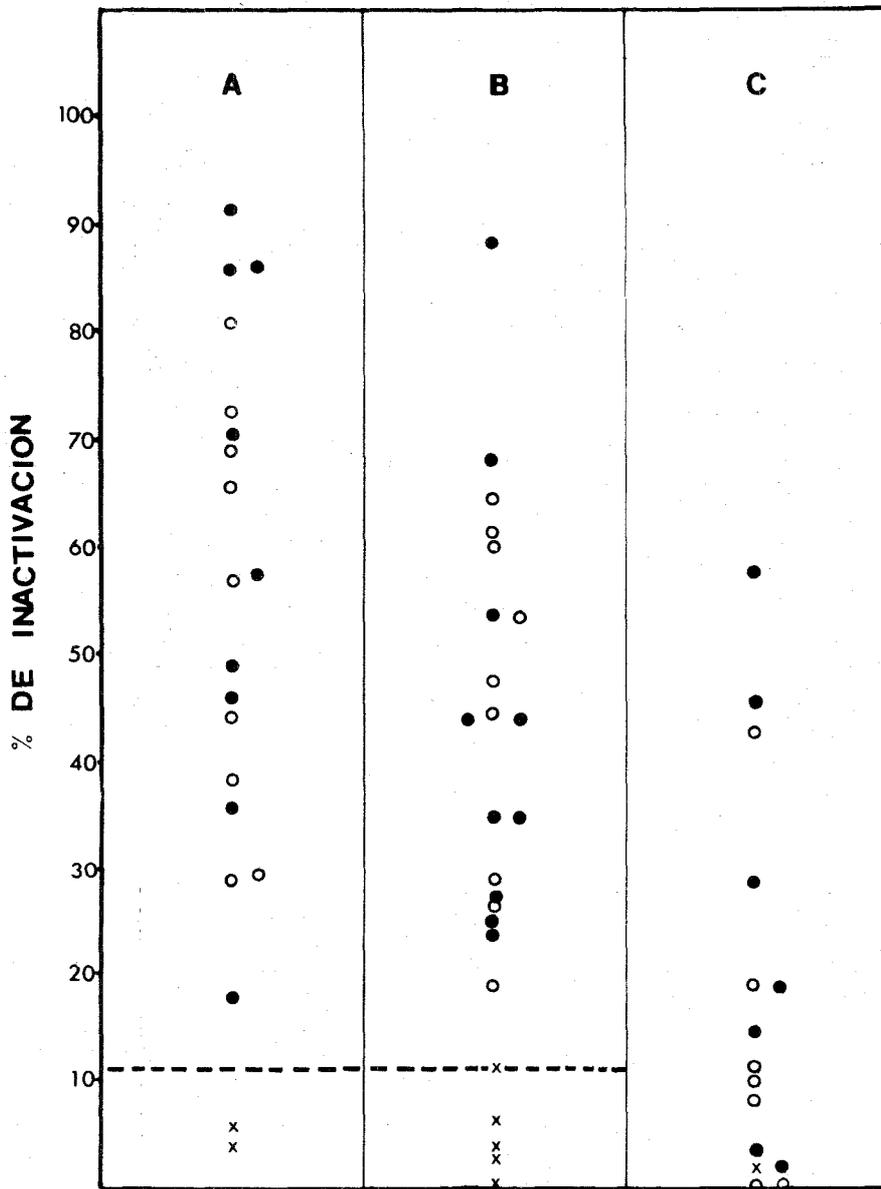


Fig. 4. Inactivación del bacteriófago T₄ penicilina por sueros de individuos alérgicos o no alérgicos al antibiótico. En la columna (A) se observa el efecto de los sueros no calentados de los individuos alérgicos (o) y de los sujetos no alérgicos con (●) y sin (x) tratamiento con el antibiótico. En la columna (B) se presentan los datos obtenidos con los mismos sueros solo que inactivados por el calor (56°C durante 5 horas). La diferencia entre los sueros calentados (B) y no calentados (A) nos indican la presencia de IgE en éstos sueros (C). Valores de sueros normales (-----).