

Universidad de Murcia



ESTANDARIZACION Y DIAGNOSTICO
DE ALERGOPATIAS A HONGOS.

TESIS DOCTORAL

Antonio Carlos del Martínez

1989

DEPARTAMENTO DE MEDICINA, RADIOLOGIA, ESTOMATOLOGIA Y
MEDICINA FISICA
CATEDRA DE PATOLOGIA Y CLINICA MEDICAS
FACULTAD DE MEDICINA
MURCIA

UNIVERSIDAD DE MURCIA



1574070

ESTANDARIZACION Y DIAGNOSTICO
DE ALERGOPATIAS A HONGOS

TESIS DOCTORAL
ANTONIO CARBONELL MARTINEZ



ESTANDARIZACION Y DIAGNOSTICO
DE ALERGOPATIAS A HONGOS

MEMORIA PARA LA OBTENCION
DEL GRADO DE DOCTOR EN LA
FACULTAD DE MEDICINA DE
LA UNIVERSIDAD DE MURCIA.

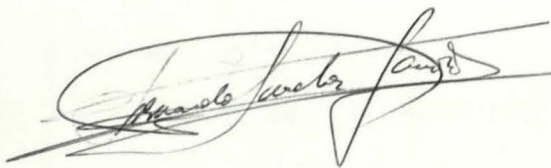
MURCIA, Noviembre 1989.

Don Fernando Sánchez Gascón, Profesor Titular de Patología y Clínicas Médicas de la Facultad de Medicina y Don Mariano Valdés Chavarri, Catedrático de Patología y Clínica Médicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia.

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada "ESTANDARIZACION Y DIAGNOSTICO DE ALERGOPATIAS A HONGOS", original de D. ANTONIO CARBONELL MARTINEZ, ha sido realizada bajo nuestra dirección, y reúne las condiciones exigidas para la obtención del Título de Doctor en Medicina y Cirugía.

MURCIA, Noviembre 1989

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Fernando Sánchez Gascón', with a large, sweeping flourish at the end.

Fdo. Prof. F. Sánchez Gascón

Fdo. Prof. M. Valdés

Elaborar una tesis sobre la colaboración de distintos organismos en la conservación de la biodiversidad; voy a agradecer a los profesores que me ayudaron en esta tarea.

- En primer lugar, a mi director de tesis, el Sr. Sánchez Gascón, director del Departamento de Biología, por su confianza y por haberme permitido realizar esta tesis en su departamento. También agradezco a los profesores que me ayudaron en esta tarea: los profesores de Biología, de Estadística y de Matemáticas.

- A mi familia, especialmente a mi madre, por su apoyo y comprensión. También agradezco a mis amigos por su apoyo y comprensión.

- Al Prof. Dr. José María Sánchez Gascón, director del Departamento de Biología, por su confianza y por haberme permitido realizar esta tesis en su departamento.

A G R A D E C I M I E N T O S

- Al Prof. Dr. José María Sánchez Gascón, director del Departamento de Biología, por su confianza y por haberme permitido realizar esta tesis en su departamento.

- Al Prof. Dr. José María Sánchez Gascón, director del Departamento de Biología, por su confianza y por haberme permitido realizar esta tesis en su departamento.

- A mi familia, especialmente a mi madre, por su apoyo y comprensión. También agradezco a mis amigos por su apoyo y comprensión.

- Al Dr. Alberto Martínez, Biólogo del Laboratorio de Genética, por su confianza y por haberme permitido realizar esta tesis en su laboratorio.

Elaborar una Tesis Doctoral es fruto del esfuerzo y la colaboración de distintas personas que me han guiado y ayudado; vaya aquí expresado mi agradecimiento sincero:

- En primer lugar al Prof. Dr. Don Fernando Sánchez Gascón, director de este trabajo, que durante los tres últimos años me orientó y enseñó, con paciencia y pericia de maestro a superar dificultades, a ordenar los pasos cada vez más complejos, así como a llegar a unas conclusiones claras.

- Al Dr. Don Ricardo Palacios, que me apuntó la idea de la que ha surgido esta Tesis, así como su colaboración generosa para llevar a cabo las pruebas de laboratorio.

- Al Prof. Dr. Don Mariano Valdés Chavarri, por su inestimable ayuda, colaboración y estímulo, teniendo en cuenta, que numerosos pacientes procedían de su Servicio de Medicina Interna del Hospital General.

- Al Prof. Dr. Don Manuel Canteras, por su colaboración en los siempre complicados trabajos de estadística.

- A O.F.M. por su ayuda valiosa, material, en datos y manejos de ordenador, redacción, etc..., y también su optimismo incansable y apoyo espiritual para elaborar esta Tesis.

- Al Dr. Alberto Martínez, Biólogo del Laboratorio donde realizamos las pruebas de estandarización de alergenitos.

- A Santos Montañés por su estímulo y apoyo en todo momento, y a Pedro García.

- A los miembros del Servicio de Medicina Interna del Hospital General.

- A Paquita, Maruja y M^a Dolores, auxiliares de Neumología del Hospital General que siempre me brindaron su apoyo.

A María mi madre y a Pilar mi esposa,
las dos mujeres de mi vida.

ABREVIATURAS

AA: Alternaria Alternata.

Ac: Anticuerpo.

AF: Aspergillus Fumigatus.

Ag: Antígeno.

Artem.: Artemisa.

Cañig.: Cañiglo.

Cerec.: Cereales.

CIE/CRIF: Radioinmunolectinoforación indirecta.

CL: Cladosporium Herbarum.

Conc.: Concentración.

ABREVIATURAS

DF: Dermatophagoides Farinae.

Dp: Dermatophagoides pteronyssinus.

ECF-A: Factor quimiotáctico de eosinófilos de tipo A.

Ep.Ov.: Epitelio de oveja.

Ep.V.: Epitelio de vaca.

Gram: Gramíneas.

Igb: Inmunoglobulina.

MIF: Factor inhibidor de macrófagos.

Parist.: Parietaria.

pi: Punto isoelectrico.

Pm: Peso molecular.

RAST: Radioinmunoensayo.

SI: Sistema inmune.

SRS-A: Sustancias de reacción lenta de anafilaxia.

ABREVIATURAS

AA: *Alternaria Alternata*.

Ac: Anticuerpo.

AF: *Aspergillus Fumigatus*.

Ag: Antígeno..

Artem.: *Artemisa*.

Ceñig.: Ceñiglo.

Cerea.: Cereales.

CIE/CRIE: Radioinmunolectroforesis cruzada.

CL: *Cladosporium Herbarum*.

Conc.: Concentración.

Df: *Dermatophagoides farinae*.

Dp: *Dermatophagoides pteronyssinus*.

ECF-A: Factor quimiotáctico de eosinófilos de la anafilaxia.

Ep.Ov.: Epitelio de oveja.

Ep.V.: Epitelio de vaca.

Gram: Gramíneas.

Igb: Inmunoglobulina.

MIF: Factor inhibidor de macrófagos.

Pariet.: *Parietaria*.

pI: Punto isoeléctrico.

Pm: Peso molecular.

RAST: Radioinmunoensayo.

SI: Sistema inmune.

SRS-A: Sustancias de reacción lenta de anafilaxia.

	<u>Página</u>
I. INTRODUCCION.....	1
II. DESCRIPCION DEL SISTEMA INMUNE.....	10
2.1. Organos linfoides primarios.....	11
2.2. Organos linfoides secundarios.....	12
2.3. Células del sistema inmune.....	12
2.4. Componentes del sistema inmunitario..	14
III. REACCIONES ALERGICAS.....	18
3.1. Hipersensibilidad tipo I.....	19
3.2. Hipersensibilidad tipo II.....	20
3.3. Hipersensibilidad tipo III.....	21
3.4. Hipersensibilidad tipo IV.....	22
IV. HONGOS: CLASIFICACION.....	24
V. DESCRIPCION DE LOS HONGOS.....	27
5.1. Micromicetos.....	28
5.1.1. Alternaria Alternata.....	28
5.1.2. Cladosporium Herbarum.....	29
5.1.3. Aspergillus Fumigatus.....	31
VI. INCIDENCIAS.....	34
6.1. Epidemiología.....	36

	8.9.4.1. Método Orosinai.....	84
VII.	HIPOTESIS.....	41
VIII.	MATERIAL Y METODOS.....	43
	8.1. Anamnesis.....	44
	8.2. Exploración física.....	49
IX	RESULTADOS.....	
	8.2.1. Exploración cardiorespiratoria	49
X	TABLA 8.2.2. Exploración ORL.....	49
XI	8.3. Exploraciones complementarias.....	49
	8.4. Analítica.....	50
	8.5. Pruebas alérgicas.....	50
	8.6. Protocolo de admisión de pacientes...	50
	8.7. Metodología de la técnica del Prick..	51
	8.8. Pruebas de provocación nasal.....	53
	8.9. Producción y procesamiento.....	55
XI	DISCUSION.....	
	8.9.1. SDS-PAGE.....	58
XIII	CONCLUSIONES 8.9.2. IEF.....	60
	8.9.3. Determinación de proteínas....	65
XIV	BIBLIOGRAFIA.....	109
	8.9.3.1. Procedimiento	
XV	ICONOGRAFIA..... standard.....	65
	8.9.3.2. Procedimiento	
	microassay.....	67
	8.9.4. Determinación de carbohidratos	69

	8.9.4.1. Método Orcinol.....	69
	8.9.4.2. Método de la Antrona.	70
	8.9.5. Determinación de cloruros.....	71
	8.10. Método estadístico.....	72
IX	RESULTADOS.....	74
X	TABLAS.....	79
XI	CÁLCULOS.....	92
	11.1. Estandarización.....	93
	11.2. Cálculos de Alternaria.....	93
	11.3. Cálculos de Cladosporium.....	96
	11.4. Cálculos de Aspergillus.....	98
XI	DISCUSION.....	101
XIII	CONCLUSIONES.....	106
XIV	BIBLIOGRAFIA.....	109
XV	ICONOGRAFIA.....	124

1.- INTRODUCCION HISTORICA.

Queramos comenzar esta breve reseña histórica por John Sostock (67), ya que es evidente que esto ya existía anteriormente, aunque documentado en 1871 por John Sostock, que nos ocupan. (46, 55, 66, 68, 103, 122, 123, 124, 125).

Así pues, John Sostock (67) publicó en 1871 en el Medical Society de Londres en 1871, un artículo sobre "afección periódica de los ojos y el nariz".

I.- INTRODUCCION.

Cataratas afección, o también se conocía con el nombre popular de "hemorrea", ya que provocaba la idea de que el flujo de sangre fluía del hemo. Más tarde, en 1871, en un artículo de nuestro país, se menciona el caso de un niño en Inglaterra.

Medio siglo más tarde, Charles Blackley (68, 126) estableció sin lugar a dudas que el polen juega un papel importante en la causa de la fiebre del heno, y ello fue referido en su libro "Experimental Researches on the Causes and Nature of Catarrhus aestivus".

Este autor estudió en sí mismo el efecto de los pólenes haciendo fricción con diversos materiales en su brazo y produjo una reacción cutánea que medía 1.5 por 2.5 pulgadas. También provocó en diversos pacientes episodios de conjuntivitis.

1.- INTRODUCCION HISTORICA.

Queremòs comenzar esta breve reseña històrica por John Bostock (67), ya que es evidente que todo lo sucedido anteriormente, aunque documentado en múltiples ocasiones carecía como es lógico, de las consideraciones etiológicas que nos ocupan. (46,55,66,68,103,109,118,126,138)

Así pues, John Bostock (67), hablando a la Royal Medical Society de Londres en 1819, describió su propia "afección periódica de los ojos y el pecho" a la que llamó Catarrhus aestivus, o catarro de verano. Esta condición también se conoció con el nombre popular de "fiebre del heno", ya que prevalecía la idea de que era producida por el efluvio del heno fresco. Más tarde, Bostock presentó un muestreo del mal pero sólo pudo hallar 28 casos en toda Inglaterra,

Medio siglo más tarde, Charles Blackley (94,125) estableció sin lugar a dudas que el polen juega un papel importante en la causa de la fiebre del heno, y ello fue referido en su libro "Experimental Researches on the Causes and Nature of Catarrhus aestivus".

Este autor estudió en si mismo el efecto de los pólenes haciendo fricción con diverso material en su brazo y produjo una reacción cutánea que media 1,5 por 2,5 pulgadas. También provocó en diversos pacientes episodios de conjuntivitis,

rinitis y asma.

Posteriormente y por métodos rudimentarios llevó a cabo un recuento de pólenes en el aire y observó una correlación entre el muestreo y los síntomas propios y los de sus pacientes. Finalmente hizo un recuento de muestras a 500 m. sobre el nivel del suelo utilizando placas de vidrio alargado a las cuerdas de cometas. (94,125)

Tras la publicación de su libro, Blackley recibió muchas cartas de personas que mostraban interés por sus observaciones. Entre esas cartas, una de Charles Darwin (16) que decía : " He leído dos tercios del libro con mucho interés...", y sugirió a Blackley la posibilidad de investigar las diferencias que podrían ser inherentes a los pólenes transportados por el viento y aquellos que eran transferidos por los insectos.

Por otra parte, en el siglo XIX (99,100), no sólo fue descrita la fiebre del heno como una entidad clínica, sino también la rinitis vasomotora (o rinitis perenne no infecciosa); fue explicada por Herzog (94) en 1881, y Quincke (94) describe un año más el edema que llevaría su nombre.

Aunque fue demostrado que estas entidades clínicas, y también el asma bronquial, podían en ciertos casos ser provocados por exposición a sustancias extrañas, no dañinas per se, los mecanismos tras los síntomas no fueron dilucidados hasta mucho más adelante.

En 1901, los científicos franceses Charles Richet y Paul Portier (99) efectuaron un viaje por el Mediterráneo con el fin de estudiar las medusas venenosas, cuya picadura es extremadamente dolorosa. Tras su regreso a París, Richet intentó hacer inmunes a los perros por el conocido método del Rey Mitridates de Pontos (132-63 a.c.) que tomaba repetidas dosis pequeñas de veneno para volverse resistente. (110)

A uno de los perros le administró a los 22 días de la primera inyección una segunda, esta vez $1/10$ de la dosis fatal y, tras pocos segundos, el animal se agravó rápidamente y murió a los pocos minutos.

Richet quedó atónito por el resultado que era opuesto a lo esperado. Creyó que la defensa natural contra la sustancia tóxica había desaparecido. Como el fenómeno fue considerado opuesto a la profilaxis se le llamó anafilaxis. (99,110) Este término es usado actualmente para la alergia inducida en animales y para severas reacciones alérgicas sistémicas en el hombre.

Richet recibió el premio Nobel de Medicina en 1919. Aunque su interpretación del experimento era errónea, el concepto de anafilaxis se mostró muy útil en el posterior estudio de la alergia. Pocos años más tarde fue sugerido por Wolff-Eisner (16) en 1906 y por Meltzerque (16) en 1910 que la fiebre del heno y el asma, podrían ser consideradas como anafilaxia humanas.

El año siguiente al experimento de Richet, M. Arthus (113) mostró que las reacciones anafilácticas pueden ser desencadenadas por sustancias que no son tóxicas en sí. Este autor, inyectó suero de caballo en conejos sin que causase ninguna reacción en un primer momento, pero cuando repitió la inyección, tras varias semanas, observó una fuerte reacción. El tejido se inflamaba y se volvía necrótico en algunos casos. Esta reacción anafiláctica local, tomó el nombre de "fenómeno de Arthus".

Dos pediatras, el austriaco C. Von Pirquet (16) y el húngaro Bela Shick (16) informaron en 1905 que niños a los que se había suministrado repetidas inyecciones de antitoxina streptocócica de caballo desarrollaron fiebres en algunos casos, hinchazón de glándulas y urticarias. Es la llamada "enfermedad del suero". Von Pirquet (67) en un artículo publicado en el Münchener Medizinische Wochenschrift, en 1906, propuso el término "alergia" para referirse a la reactividad combinada. La raíz semántica de alergia proviene del término griego "allos" = diferente, y de "ergos" = trabajo o acción.

Los investigadores americanos R.A. Cooke (57) y A.F. Coca (57), en 1923, propusieron el término atopia para aquellas formas clínicas de alergia, manifestada por fiebres y asma, al constatar que "los individuos, como grupo, poseen una capacidad peculiar para volverse sensibles a ciertas proteínas a las que su ambiente y hábitos de vida les expone

frecuentemente". Así una predisposición heredada a volverse sensible es un hecho característico de la atopia. Más tarde se añadió otra característica, la presencia de la "reagina" o alérgeno.

En 1919 el Dr. Maximilian Ramírez (113) de Nueva York informó de un caso inusual de asma en la revista Journal of the American Medical Association. Había sido consultado por un hombre que había desarrollado un ataque de asma por primera vez, en un carro tirado por caballos en Central Park. Este paciente había tenido anteriormente una transfusión sanguínea por anemia, y el Dr. Ramírez encontró que el donante era asmático. Fue examinado y mostró una reacción cutánea positiva al testigo de caballo. Esta era la primera observación, indicando que el asma puede ser mediada por un factor del suero.

Esta alergia transferida por suero fue confirmada en 1921 por el Dr. Prausnitz (67) en su experimento clásico con su paciente Küstner (67). Este experimento, ya conocido, consistió en inyectar suero de Küstner, que era alérgico al pescado, en el brazo de Prausnitz. Al día siguiente Prausnitz se inyectó en el mismo sitio y por primera vez en su vida, extracto de pescado mostrando una reacción positiva. Era manifiesto que el suero de Küstner contenía un factor que podía mediar un test cutáneo positivo. El factor responsable de esta reacción fue llamado "reagina" por Coca y Cooke. (57)

carne, bajo la piel del paciente rinitico o asmático, no inspiraban mucho respeto a los colegas de los alergólogos. (113,37)

Esta situación cambió drásticamente en 1967. Debido a las nuevas orientaciones y observaciones, la alergia adquiere categoría de disciplina médica. En nuestra opinión, ello es debido en gran parte, al hallazgo de la IgE.

El equipo formado por Kimishige y T. Ishizaka (113), trabajando en Denver, Colorado, aislaron una fracción de suero rica en reagina de una persona con alergia muy intensa al polen. Mediante el test de P-K demostraron el contenido reagínico del suero que fue usado como antisuero en conejos. Añadieron al antisuero las Igbs humanas G, M, D para hacer precipitar anti-IgG, M, A y anticuerpos D.

Aunque el antisuero debía estar limpio, según los conocimientos de las distintas clases de Igbs seguía produciendo una reacción P-K positiva. La adicción del suero rico en reagina original produjo un pequeño precipitado y lo sorprendente de lo obtenido fue encontrar que estaba exento de actividad sensitivo cutánea. El mismo precipitado limitó determinados alergenos, indicando que tenía actividad de anticuerpo. Ishizaka y colaboradores, llegaron a la conclusión de que los Ac-reagínicos pertenecen a una clase de Igb aún sin descubrir que llamaron " gamma E globulina". (113)

Trabajando simultáneamente Ishizakas y colaboradores,

pero independientemente de ellos, Johansson y H. Bennich en Uppsala, Suecia, obtuvieron una proteína atípica de un paciente con mieloma y establecieron que se trataba de una Igb que difería de las hasta entonces conocidas. Como las iniciales del paciente eran N.D. la nueva Igb fue llamada IgND. Usando un método extremadamente sensible de radioinmunoensayo en colaboración con L. Wide, demostraron la presencia de muy pequeñas cantidades de IgND en el suero normal.

Johansson y Bennich (16) mostraron más tarde que en el suero de pacientes alérgicos había un alto nivel de IgND, y demostraron que pequeñas cantidades de esta Igb bloqueaban la reacción P-K. Estas observaciones junto con los descubrimientos de las propiedades físico-químicas de la IgND les llevaron a la conclusión de que la reagina pertenecía a esta clase de Igb.

Cuando los dos equipos se encontraron en 1968 quedó claro que habían estudiado el mismo tipo de Igb al que de común acuerdo llamaron IgE, estableciendo, sin lugar a dudas, que esta nueva Igb es la portadora de las propiedades biológicas del Ac-reagina.

2.- DESCRIPCION DEL SISTEMA INMUNE (SI).

En líneas generales, la función del SI, es distinguir lo propio de lo extraño y eliminar este último.

El ser humano, igual que otros seres vivos, necesita para su supervivencia un sistema de defensa, cuya deficiencia, ocasiona cuadros clínicos de expresión y gravedad variable. II.- DESCRIPCION DEL SISTEMA INMUNE. En las neoplasias.

El SI está formado por tejidos y órganos que desempeñan sus funciones en la defensa del huésped. Entre ellos se encuentran:

2.1.- ORGANOS LINFÓIDES PRIMARIOS.

El timo y la bolsa de Fabricio en aves, la médula ósea y el tazo en humanos y mamíferos.

1. Médula ósea: Produce células germinales plasmáticas que se diferencian en las respectivas poblaciones:

... Linfocitarias.

... Granulocíticas.

... Eritrocíticas.

... Megacariocíticas.

2. Timos: En él se producen:

... Formación de células timoderivadas inmunocompetentes → linfocitos T.

... Fagocitosis de células o clones linfocitarios que reaccionan contra los antígenos propios.

... Regulación de la función inmunitaria por se-

2.- DESCRIPCION DEL SISTEMA INMUNE (SI).

En líneas generales, la función del SI, es distinguir lo propio de lo extraño y eliminar esto último.

El ser humano, igual que otros seres vivos, necesita para su supervivencia un sistema de defensa, cuya deficiencia, ocasiona cuadros clínicos de expresión y gravedad variables; desde una rinitis alérgica, hasta neoplasias.

El SI está formado por tejidos y órganos que desempeñan sus funciones en la defensa del huésped. Estos elementos son:

2.1.- ORGANOS LINFOIDES PRIMARIOS.

El timo y la bolsa de Fabricio en aves, y la médula ósea y el timo en humanos y mamíferos.

1. Médula ósea: Produce células germinales pluripotenciales que se diferencian en las respectivas poblaciones:

... Linfocitarias.
También ... Granulocíticas.
... Eritrocíticas.
... Megacariocíticas.

2. Timo: En él se produce:

... Formación de células timoderivadas inmunocompetentes => Linfocitos T.

... Fagocitosis de células o clones linfocitarios que reaccionan contra los antígenos propios.

... Regulación de la función inmunitaria por se-

creción de hormonas solubles.

2.2.- ORGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS.

Son los ganglios linfáticos, bazo y tejido linfoide intersticial, que están comunicados entre sí por vasos sanguíneos y linfáticos.

1.- Ganglios linfáticos: Son los órganos periféricos del SI; tratan de localizar la infección e impedir su diseminación.

Están formados por corteza y médula. Los linfocitos B se localizan en corteza y médula, y los linfocitos T se encuentran en zona paracortical y área medular.

2.- El bazo: Su función es la de filtrar y procesar antígenos de la sangre. Se puede considerar que está estructuralmente dividido como los ganglios en zonas de células T y células B.

3.- Tejido linfoide: Se halla asociado a las amígdalas, placas de Peyer de intestino delgado y apéndice. También se puede objetivar células T y B. (Quizá la función del tejido linfoide asociado al intestino desarrolla una función de diferenciación de las células germinales en linfocitos B).

2.3.- CELULAS DEL SISTEMA INMUNE.

1.- Linfocitos: Son los responsables del reconocimiento de lo específico, del antígeno.

Se dividen en T y B. La función de los B es la producción del anticuerpo, y la de los T es la citotoxicidad mediada por células.

Las células B están cubiertas por inmunoglobulinas y disponen de receptores para el complemento y para la fracción Fc de la inmunoglobulina. Las células T tienen capacidad para adherir los hematíes de carnero a su superficie formando rosetas. Dentro de su función está la "respuesta de inmunidad mediada por células", como el rechazo de injertos y la hipersensibilidad tardía.

También existen las subpoblaciones de linfocitos T, como son:

..Células T Helper o cooperadoras.

..Células T supresoras.

..Células T Killer.

Las células B son las precursoras directas de las células maduras secretoras de anticuerpos (células plasmáticas).

Está claramente documentado que, existen numerosas interacciones entre las células T y B. (70,44)

2.- Células fagocíticas:

- Macrófagos: Son las células de primer orden en la respuesta inmune. Derivan de los monocitos sanguíneos y tras su pérdida de madurez en la médula ósea, se sitúan en los espacios hísticos por diapedesis, convirtiéndose en macrófagos hísticos activos. Sus funciones más importantes son:

.. Quimiotaxis.

.. Fagocitosis.

.. Presentación del antígeno en forma inmunógena a los linfocitos.

enzimas ... Carecen de especificidad.

Leucocitos polimorfonucleares: Se localizan en médula ósea y su función principal es la fagocitosis.

Eosinófilos: Se localizan en zonas inflamatorias, zonas de reactividad inmunitaria, y no se sabe a ciencia cierta todas las funciones que desempeñan, aunque tienen acciones similares a los neutrófilos.

Basófilos y Mastocitos: Los primeros se localizan en la circulación y los segundos en tejidos. Ambos liberan los mediadores de hipersensibilidad inmediata. Estos mediadores son, principalmente:

- ... Histamina.
- ... SRS-A (sustancias de reacción lenta de la anafilaxia).

- ... ECF-A (Factor quimiotáctico eosinofílico de la anafilaxia).

... IgM: Es el elemento fundamental de la respuesta.

2.4.- COMPONENTES DEL SISTEMA INMUNITARIO.

El SI consta de un sistema específico humoral que da lugar a los Ac. de especificidad y memoria y de un sistema inespecífico celular con células fagocíticas y proteínas del complemento.

Los dos sistemas, cuya función es distinta, se superponen.

1.- Inmunidad por anticuerpos:

Inmunoglobulina. Esta formada por cuatro cadenas polipeptídicas, dos ligeras y dos pesadas, unidas por puentes disulfuro. Las Igb. se estudian por medio de la

enzima papaina, que las fracciona dando lugar a dos fragmentos: Fab y Fc. El primero es el extremo aminoterminal al que se le une el Ag., y el segundo es el extremo carboxiterminal, el cual le da a la Igb. la actividad biológica, como por ejemplo, la fijación al complemento, la transferencia placentaria, la unión a células y a piel.

Existen cinco clases de Igb.: A.G.M.D. y la IgE, en función de la estructura de la cadena pesada.

.. IgG: es la principal que interviene en la respuesta secundaria o de recuerdo. Se divide en IgG 1-2-3-4. Y sus acciones son:

- Activación de la vía alternativa del complemento.
- Adherencias a macrófagos.
- Atraviesa la placenta.
- Y tiene capacidad para difundirse por los tejidos, lo que facilita su unión a los Ags y eliminación de estos.

.. IgM: Es el elemento fundamental de la respuesta humoral precoz frente a bacterias no protéicas. No atraviesa la barrera placentaria, pero su estructura polimérica la hace muy adecuada para la aglutinación o lisis de los Ags.

.. IgA: Es la principal Igb de todas las superficies mucosas y secreciones exocrinas. Existe en forma de monómero dímero y trímero. La IgA secretora está unida a un polipéptido que favorece su secreción a través de las mucosas, siendo la protección inicial contra patógenos a nivel mucoso. Su deficiencia es de las inmunodeficiencias más frecuentes en el ser humano.

.. IgD: Se encuentra en cantidades muy pequeñas en el

suero. Su función no está bien definida, pero parece ser que actúa como reconocedor en la célula B no comprometida. IgE: anticuerpo reagínico. Esta en la sangre en concentraciones bajas, pero en atópicos alcanza niveles altos. Los mastocitos y basófilos tienen receptores para la región Fc de la IgE y; la formación de puentes de dos moléculas de IgE por antígenos, da lugar a la liberación de mediadores de la inflamación.

2.- Inmunidad mediada por células: La cualidad fundamental de la inmunidad celular es que el efector específico del antígeno en esta reacción inmune, es un linfocito sensibilizado en lugar de una molécula libre de Ac.

El desarrollo de los linfocitos T-Ag específicos depende de la interacción del macrófago y de la célula T. El antígeno intacto precisa unas interacciones celulares para presentar los determinantes Ags específicos a las células T implicadas en la respuesta inmuno competente. Para que este proceso ocurra es imprescindible la transformación de la célula T en linfocito efector específico de antígeno. Esta es la transformación linfocitaria, con la que se produce el reconocimiento del Ag., la proliferación de linfoblastos y la transformación de linfocito en linfoblasto.

Subpoblaciones de linfocitos T:

- células T efectoras. No son específicas de Ag. Elaboran linfoquinas que se producen por las células T de memoria específica de Ag tras el contacto con este. La más

conocida es el factor inhibidor de macrófagos (MIF) produciendo disminución del movimiento del macrófago, alterando su membrana y su capacidad fagocítica. También se producen alteraciones enzimáticas intracelulares, como son:

- Aumento de enzimas lisosomales.
- Aumento de la actividad del adenil-ciclasa.
- Aumento de la actividad del shunt hexosa-monofosfato.
- Aumento de la actividad bacteriostática y antimicrobiana.

Con MIF pueden colaborar en este proceso el factor agregador de macrófagos y el factor activador de macrófagos.

Una vez que el macrófago se encuentra con el Ag se libera la interleuquina-1. Esta mas el Ag activa las células T cooperadoras y se libera la interleuquina -2 produciéndose la células T citotóxicas. Las células T cooperadoras por medio de factores específicos e inespecíficos se transforman en células T supresoras, las cuales pueden ser Ag-específicas o Igb- específicas.

Las linfoquinas, a su vez, actuando sobre el macrófago, lo transforman en macrófago activado.

3.- TIPO DE REACCIONES ALERGICAS.

Clinicamente se distinguen, desde el punto de vista pedagógico, cuatro tipos de reacciones que fueron descritas por Gell y Coombs. (44,70)

3.1.- HIPERSENSIBILIDAD TIPO I

También llamada de tipo inmediato o reacciones

El organismo está continuamente expuesto a los antígenos, en este tipo de reacciones, los antígenos, los anticuerpos, los mediadores alergenos y las inmunoglobulinas IgE y la IgG4.

III.- REACCIONES ALERGICAS.

Se fijan a la superficie del mastocito, liberación de mediadores.

Estos son:

-histamina

-SRS-A

-serotonina

-factor quimiotáctico de eosinófilos de la anafilaxia (ECF-A)

-factor activador de plaquetas

-y prostaglandinas.

Además del mastocito y basófilo hay otras células que poseen receptores para la IgE, como son:

-células T, células B, monocitos, macrófagos alveolares, eosinófilos y plaquetas.

La IgE, tiene un peso molecular de 198000; tiene cinco

domin 3.- TIPO DE REACCIONES ALERGICAS.

hidra Clínicamente se distinguen, desde el punto de vista pedagógico, cuatro tipos de reacciones que fueron descritas por Gell y Coombs. (44,70) grados.

La IgG4, tiene un peso molecular de 188000, por lo

cuatr 3.1.- HIPERSENSIBILIDAD TIPO I.

hidratos de carbono, y además, su vida media es de 21 días.

Tiene También llamada de tipo inmediato o reagínica.

decir, El organismo está continuamente en contacto con antígenos, en este tipo de reacción, a los antígenos se les denomina alérgenos y las inmunoglobulinas producidas son la IgE y la IgG4. Estas inmunoglobulinas son muy citofílicas y se fijan a la superficie del mastocito provocando la liberación de mediadores.

Estos son: HIPERSENSIBILIDAD TIPO I

-histamina

-SRS-A (se conoce como hipersensibilidad sistémica mediada

por -serotonina

-factor quimiotáctico de eosinófilos de la anafilaxia (ECF-A), a los que se unen los anticuerpos IgE o IgG

espe -factor activador de plaquetas. Como consecuencia de

esta -y prostaglandinas. luce:

Además del mastocito y basófilo hay otras células que poseen receptores para la IgE, como son: fracción P2 de los

inven -células T, células B, monocitos, macrófagos alveolares, eosinófilos y plaquetas. que también es opsonizante.

La IgE, tiene un peso molecular de 188000; tiene cinco

dominios en su cadena pesada, igual que la IgM, y a diferencia del resto de las inmunoglobulinas, es muy rica en hidratos de carbono un 12%. Su vida media es de dos días y medio, no atraviesa la barrera hematoencefálica y se destruye a 56 grados centígrados.

La IgG₄, tiene un peso molecular de 146000, posee cuatro dominios en su cadena pesada y es menos rica en hidratos de carbono, y Además, su vida media es de 21 días. Tiene una función similar a la IgE, actividad bloqueante, es decir, hay posibilidad de que una misma célula tenga un receptor para la IgE junto a uno para la IgG₄, en éste caso al unirse el antígeno no se puentean dos moléculas de IgE, por lo cual se bloquea la reacción.

3.2.- HIPERSENSIBILIDAD TIPO II.

Se la conoce como hipersensibilidad citotóxica mediada por anticuerpos.

Partimos de los antígenos presentes en la superficie celular, a los que se unen los anticuerpos, IgG o IgM específicos que el organismo produce. Como consecuencia de esta unión Ag-Ac se produce:

--Fagocitosis de la célula mediante adherencia opsonica, (unión de los fagocitos a la fracción Fc de las inmunoglobulinas), o adherencia inmune, (por unión a la fracción C3b del complemento, que también es opsonizante).

--Activación de todo el sistema de complemento, que

produce un daño directo en la membrana. Esta activación tiene lugar por la vía clásica del complemento.

--También se produce un ataque citotóxico extracelular de las células T "killer".

La activación del complemento posibilita además, que a través de sus fracciones C3a y C5a sean atraídos los neutrófilos, macrófagos y eosinófilos. Estas células colaboran en la destrucción de las células diana, ya que, gracias a los receptores que poseen, a las Fc y al C3b, se unen a aquella y la destruyen, fagocitándola.

Las células diana en la respuesta tipo II son diferentes en cada caso, pudiendo ser hematíes, leucocitos, células de trasplante, etc. Así tenemos varios ejemplos, anemia hemolítica del recién nacido, reacciones de transfusiones, reacciones contra membrana basal del glomérulo.

3.3.- HIPERSENSIBILIDAD TIPO III.

También conocida como hipersensibilidad mediada por inmunocomplejos, basa su patogenia en la formación de complejos entre el antígeno y el anticuerpo humoral; estos inmunocomplejos conducen a la activación del complemento y a la agregación de plaquetas. De este modo:

--Se produce C3a y C5a, que poseen propiedades tanto anafilótóxicas (liberación de sustancias vasoactivas), como quimiotácticas (atraen a los polimorfos). En ésta reacción, los polimorfos intentan fagocitar los inmunocomplejos, pero

al no conseguirlo, lo que hacen es liberar enzimas lisosomales al exterior, causando daño tisular.

--Los inmunocomplejos interaccionan con las plaquetas produciendo su agregación y la formación de microtrombos.

Son básicamente dos: la Enfermedad del suero y el Fenómeno de Arthus.

Existen cinco factores que determinan el depósito de inmunocomplejos en el tejido:

-Aumento de la permeabilidad vascular.

-Procesos hemodinámicos.

-Unión del inmunocomplejo.

-Tamaño del inmunocomplejo.

-Tipo de inmunocomplejo.

3.4.- HIPERSENSIBILIDAD TIPO IV.

Se le llama también reacción tipo retardado.

Esta reacción es más frecuente en alergia que las tipo II y III, es una reacción no mediada por anticuerpos, ya que los efectores principales son los linfocitos T.

Los linfocitos T son estimulados por el contacto del antígeno y dan lugar a la producción de :

-Células de memoria.

-linfocitos T efectores:

-Células citotóxicas:

* natural killer, no necesitan inmunoglobulinas.

* células citotóxicas dependientes de inmuno-

globulinas:

- Supresores.
- De hipersensibilidad retardada.

Se distinguen tres mecanismos implicados en esta reacción:

1.-Los linfocitos T "killer" se unen a los receptores antigénicos de la célula diana, destruyéndola.

2.-A la célula diana se le unen IgG específicas de los antígenos presentados. A éste complejo célula-IgG se unen linfocitos "killer" dependientes de anticuerpos, son receptores para la fracción Fc de la inmunoglobulina.

3.-Hipersensibilidad retardada, los linfocitos T sensibilizados por la presencia del antígeno, producen linfoquinas, estas atraen a otras células, las activan, e inhiben su migración.

Las linfoquinas principales son:

- Factor activador de macrófagos.
- Factor quimiotáctico mononuclear y factor inhibidor de la migración, atracción de macrófagos.
- interleuquina II.
- Interferón.
- Factor inhibidor de linfocitos, función T supresora.
- Linfotoxina.
- Factor reactivo con la piel.

Algunos ejemplos de éste tipo de reacción son: dermatitis de contacto, reacción de la tuberculina, reacción granulomatosa, etc.

HONGOS

La clasificación de los hongos es la siguiente:

(6, 9, 11, 40, 43)

REINO HONGOS

DIVISION:

-MYXOMICETOS

-EUMICETOS

SUBDIVISION:

-DEUTERMICOTINA (hongos imperfectos)

-MASTIGOMYXIV. - HONGOS: CLASIFICACION.

-ZYGOMICOTINA

-ASCOMICOTINA

-BASIDIOMICOTINA

A. - ZYGOMICOTINA:

CLASE:	ZYGOMICETOS
ORDEN:	MUCORALES
FAMILIA:	MUCORACEAE
GENERO:	MUCOR, RHIZOPUS

B. - DEUTEROMICOTINA:

CLASE:	HYPHOMYCETES
ORDEN:	HYPHOMYCETALES
GENERO:	ASPERGILLUS

H O N G O S

La clasificación de los hongos es la siguiente:

(8,9,11,40,43)

REINO HONGOS

DIVISION:

-MYXOMICETOS

-EUMICETOS

SUBDIVISION:

-DEUTERMICOTINA (hongos imperfectos)

-MASTIGOMYCOTINA

-ZYGOMICOTINA

-ASCOMICTINA

-BASIDIOMICOTINA

A.- ZYGOMICOTINA:

CLASE:	ZYGOMICETOS
ORDEN:	MUCORALES
FAMILIA:	MUCORACEAE
GENERO:	MUCOR, RHIZOPUS

B.- DEUTEROMICOTINA:

CLASE:	HYPHOMYCETES
ORDEN:	HYPHOMYCETALES
GENERO:	ASPERGILLUS

PENICILLIUM

ALTERNARIA

CLADOSPORIUM

CURVALARIA

HELMINTHOSPORIUM

AEROBASIDUM

STEMPHYLIUM

EPICOCUM

FUSARIUM

TRICHODERMA

CLASE: BLASTOMYCETES

ORDEN: CRYPTOCOCALES

GENERO: CANDIDA

CLASE: CAELOMYCETES

ORDEN: SPHAEROPSIDALES

GENERO: PHOMA

5.- DESCRIPCION DE LOS HONGOS

Los hongos, objeto de nuestro trabajo son los que revisamos a continuación:

5.1.- NICEOMICETOS: POSICION Y ESTRUCTURA

5.1.1.- ALTERNARIA ALTERNATA.

Descripción: (Foto 13) Sus colonias son blancas o amarillentas, oscuras, marrones o negras. La estructura es sencilla y lleva rasas encadenadas al borde. El hongo está dividido por varias células transversales y verticales. Su tamaño es de 20-63µm. De largo y 9-12µm de ancho.

V.- DESCRIPCION DE LOS HONGOS.

Presencia: es muy común y se encuentra en algunas plantas y en sustratos incluyendo el suelo, alimentos y tejidos (131). Conocemos hábitat comunes, que como decimos son, el suelo, silos de grano (33), leña podrida, nidos de pájaros y plantas del bosque. Las manchas negras de los tomates también pueden ser producidas por la Alternaria (132). Se considera un hongo de exterior y aparece cuando hace calor. Su crecimiento óptimo es de 25-26°C y máximo 31-32°C y mínimo de 6-6.5°C. También hay formas que se adaptan al frío 0°C. (40,39).

Por otra parte es considerado uno de los hongos más importantes alergénicos en USA (71). Las esporas de

5.- DESCRIPCION DE LOS HONGOS

Los hongos, objeto de nuestro trabajo. Son los que revisamos a continuación:

5.1.- MICROMICETOS: POSICION Y ESTRUCTURA.

5.1.1.- ALTERNARIA ALTERNATA.

Descripción: (Foto 13) Sus colonias son grises, verdes oscuras, marrones o negras. La conidia es marrón oscura, lleva ramas encadenadas del tipo de conidiospora simple y está dividida por varias células transversas y verticales. Su tamaño es de 20-63µm. de largo y 9-13µm. de ancho. (135)

Presencia: es muy común y se encuentra en algunas plantas y en sustratos incluyendo el suelo, alimentos y tejidos (131). Conocemos hábitat comunes, que como decimos son, el suelo, silos de grano (33), leña podrida, nidos de pájaros y plantas del bosque. Las manchas negras de los tomates también pueden ser producidas por la Alternaria (132). Se considera un hongo de exterior y aparece cuando hace calor. Su crecimiento óptimo es de 25-26°C y máximo 31-32°C y mínimo de 6-6,5°C. También hay formas que se adaptan al frío 0°C. (40,39)

Por otra parte es considerado uno de los hongos más importantes alergénicos en USA (71). Las esporas de

Alternaria están relacionadas con el asma del panadero y también con el pulmón de los trabajadores del papel (18,65, 112,105).

Yuringer et all (137) descubrieron el alérgeno mayor de la Alternaria, que es el Alt-1 (133), es un carbohidrato rico en proteínas con un Pm de 30.000 daltons. (54,4)

Alérgenos idénticos o parcialmente idénticos a Alt-1 han sido descritos por Nylon et all (98) es el Ag-1 y por Aukrus et all (12) es el Ag-8.

Budd y colaboradores describen el aislamiento de un péptido alérgico básico con un Pm. por debajo de 14.000 daltons. (21,22)

Toxicidad: Cereales afectados severamente por esta clase de hongo son tóxicos para mamíferos. (39)

5.1.2.- CLADOSPORIUM HERBARUM.

Descripción: (Foto 14) Las colonias alcanzan 3-3,7 cms de diámetro después de 10 días en agar de malta a 20°C. La conidia es elipsoidal o redondeada, frecuentemente ramificada y con un tamaño de 8-15 x 4-16µm. (40)

Presencia: Es uno de los hongos más frecuentemente encontrados en la atmósfera (47). La conidia seca es fácilmente transportada a través del aire (17) pudiendo atravesar fácilmente los océanos (39). Se halla presente en gran número en el aire (más de 35.000 conidias por metro cuadrado son detectadas en Leiden, Alemania Oeste). La concentración interior (92) depende de la exterior en

función de las condiciones climáticas. (46)

Puede empezar a aparecer en la atmósfera en Mayo, teniendo un pico en Julio, Agosto, Septiembre y Octubre. (69,82,91,90,96)

El *Cladiosporium* es uno de los hongos más colonizadores de sustratos, como en plantas muertas y perecederas en particular, hojas y tallos de varias especies de plantas, incluyendo helechos, musgos, plantas acuáticas y desérticas; también en varios tipos de suelos, en productos alimenticios ricos en cereales, pepinos, tomates y melocotones (8,9). Es frecuentemente encontrado en refrigeradores, en marcos de ventanas, en casas con techos de paja, y casas con poca ventilación, casas bajas con humedad alrededor. También ha sido aislado en tanques de fuel, en cremas pinturas y tejidos. Su temperatura de crecimiento óptima varía de 18-28°C.

Por otra parte, el *Cladiosporium* es uno de los hongos que más responsabilidad tiene en cuanto a la positividad de los test cutáneos en individuos alérgicos (3,80,86,93,101). En un estudio de 1.300 niños asmáticos en Finlandia, 7,1% tenían positividad al *Cladiosporium*, siendo el hongo más común a la hora de producir síntomas alérgicos. (9,42)

Su composición alergénica ha sido estudiada mediante el CIE/CRIE (10) y otra técnicas, demostrando alrededor de 60 Ag. precipitables. Usando un panel de sueros de pacientes alérgicos encontramos: 1 mayor, 10 intermedios y 25 alergenos menores que fueron identificados por Aukrus et al (11,14,15,128). El alergeno mayor Ag-32 fue aislado y su Pm.

concentración de esporas en el aire es baja. La temperatura alta, requerida por este hongo, hace que aparezca una alta incidencia en los meses calurosos. Su crecimiento es óptimo a 40°C, necesitando el sustrato gran cantidad de agua. (82)

Los restos de plantas, montones de estiercol, de heno o de paja, con alto contenido en humedad, cuando se calientan producen gran cantidad de esporas, las cuales, pueden ser liberadas al aire, causando una alta incidencia local. El *Aspergillus* es considerado siempre un importante hongo de interior, y se caracteriza por su habilidad para crecer en un amplio rango de temperatura, 12°C.- 57°C, con una temperatura óptima entre 37-43°C. (87,47).

Por otra parte la inhalación de conidias o micelios de *Aspergillus* puede desarrollar graves enfermedades, cuya severidad depende de la respuesta inmune del huesped. Es responsable del: Asma alérgico, aspergiloma, neumonitis por hipersensibilidad, aspergilosis invasiva y aspergilosis extrínseca broncopulmonar. (47,48,49)

Es considerado así mismo, como causante de la enfermedad del "pulmón de granjero", del "asma del panadero" y de la enfermedad de los trabajadores de la malta. (47)

Los alergenitos más importantes, Ag-10 y Ag-40 fueron identificados por I. Wallenbeck et al. (134,63)

H.F. Kauffman et al (42,59,60) han estudiado la composición antigénica del *Aspergillus* en relación con las condiciones de crecimiento. (64)

Toxicidad:

El *Aspergillus* se reconoce como causa de enfermedad en

hombres y animales, sobre todo en pájaros (47). La patogenicidad depende de la vía de crecimiento del hongo, invadiendo diferentes órganos y produciendo diferentes y potentes toxinas. Micotoxinas a alcaloides fumigaclavine A y Fumigaclavine C han sido encontradas en *Aspergillus* aislados de hongos de granos en silos(35).

Una toxina termogénica , la Fumitremorgin-B ha sido también aislada de *Aspergillus*.(136).

VI.- INCIDENCIA.

6.- INCIDENCIA DE LAS ENFERMEDADES ALÉRGICAS.

Las muestras aerobiológicas estudiadas, tienen una distribución mundial y son una causa de enfermedades alérgicas, por sensibilidad mediada por IgE. (1,3)

En 1980, había 281 hongos disponibles comercialmente en USA (24). Estos extractos fúngicos son variables y complejos en sus constituyentes.

De cara a la clínica, la falta de diagnóstico y tratamiento de pacientes con Alergia a Hongos constituye un gran problema debido a la falta de extractos estandarizados de forma adecuada (2).

Afortunadamente las VI.- INCIDENCIA. áreas de esta área aparecen brillantes. En años pasados, las técnicas han sido desarrolladas, permitiendo adecuar los estudios de composición y contenido de tales extractos (11). El aislamiento y purificación de alérgenos de extractos fúngicos, tiene además el desarrollo y estandarización de extractos alérgicos. (6,59,72)

Estas referencias internacionales incluyen alérgenos fúngicos tales como ALTERNARIA, CLADOSPORIUM y ASPERGILLUS. (7,73,60)

Trabajos de eficacia terapéutica de los extractos fúngicos estandarizados han comenzado a aparecer y los estudios adicionales están en progreso. (62,71,11,12,24,32)

6.- INCIDENCIA DE LAS ENFERMEDADES ALERGICAS.

6.1.- EPIDEMIOLOGIA.

Las muestras aerobiológicas estudiadas, tienen una distribución mundial y son una causa de enfermedades alérgicas, por sensibilidad mediada por IgE. (1,3)

En 1980, había 281 hongos disponibles comercialmente en USA (24). Estos extractos fúngicos son variables y complejos en sus constituyentes. obtenidos son: CLADOSPORIUM y ALTERNARIA.

De cara a la clínica, la tarea de diagnóstico y tratamiento de pacientes con alergia a hongos constituye un gran problema debido a la falta de extractos estandarizados de forma adecuada (2). *Aspergillus*, que son hongos que crecen en el medio ambiente.

Afortunadamente las perspectivas de avances en este área aparecen brillantes. En años pasados, las técnicas han sido desarrolladas, permitiendo adecuar los estudios de composición y contenido de tales extractos (11). El aislamiento y purificación de alergenos de extractos fúngicos, tiene además el desarrollo y estandarización de extractos alérgicos. (6,59,72) pero se encontraron algunos problemas.

Estas referencias internacionales incluyen alergenos fúngicos tales como ALTERNARIA, CLADOSPORIUM y ASPERGILLUS. (7,72,60) fúngicos en la atmósfera (93). Esto podría deberse a la contaminación ambiental.

Trabajos de eficacia terapéutica de los extractos fúngicos estandarizados han comenzado a aparecer y los estudios adicionales están en progreso. (62,71,11,12,24,38)

de enfermedades alérgicas fue establecida por estudios de provocación. Barry et al. provocan (53) asma y rinitis en diez o más pacientes con síntomas y test positivos a

Alternaria que tienen una historia sugestiva de alergia a hongos

6.1.- EPIDEMIOLOGIA.

De cada diez pacientes con test positivo solamente

uno En el ambiente natural el hombre se expone a más de cien especies de hongos aéreos.

algo Las esporas de hongos pueden exceder a la cantidad de pólenes en la atmósfera en el doble. Los más dominantes en las muestras aéreas obtenidas son: CLADOSPORIUM y ALTER-NARIA, así como algunas levaduras. (81,93,50,90,91,45)

La concentración de hongos de interior, generalmente coincide con los de exterior (92), salvo en el caso de los hongos Aspergillus y Penicilium, que son hongos de interior y su concentración no depende de la exterior.

de re En los EE.UU. la Alternaria es el alérgeno más frecuente en la costa Este, en el bajo medio Oeste y en California. Sin embargo, es el alérgeno más frecuente en zonas más templadas y calurosas. (8,9,32,26)

estab Inicialmente la sensibilidad a hongos fue igual a los test de sensibilidad cutáneas pero se encontraron algunos pacientes con reactividad cutánea que no experimentaban los síntomas típicos en el periodo en el que había alto nivel de esporas fúngicas en la atmósfera (92). Esto podría deberse, en parte, a irritantes propios del extracto usado como testigo.

50%. El papel de las sensibilidades a hongos en una variedad de enfermedades alérgicas fue establecido por estudios de provocación. Harry et al provocan (53) asma y rinitis en diez o doce pacientes con síntomas y test positivos a

Alternaria que tienen una historia sugestiva de alergia a hongos.

De cada diez pacientes con test positivos solamente uno muestra una historia de sensibilidad y desarrollo de síntomas bajo provocación. Pennington (101) aplicó un algodón que previamente había pasado por un cultivo de hongos aplicándolo a la mucosa nasal de 61 individuos con test positivos, de los cuales 22 reaccionaron a la variedad de hongos a los que dieron positivo en los test cutáneos.

Consecuentemente se descubre que no son suficientes los test cutáneos, sino que son necesarios estudios más sofisticados que demuestren la actividad en pacientes con test positivos, cuya hipersensibilidad inmediata y las fases de reacciones alérgicas han sido inducidas por estudios de provocación (84). A pesar de los numerosos estudios implicando la sensibilidad a hongos en la patogénesis de enfermedades alérgicas, la prevalencia de estos no ha sido establecida.

En pacientes con asma o rinitis, con frecuentes test cutáneos positivos a alergenos fúngicos varía de un 4% en Escandinavia a más de un 80% en USA (74). Además la reactividad cutánea positiva indica la presencia de anticuerpos y de IgE a alergenos fúngicos; la correlación entre los síntomas y los test cutáneos positivos es de un 50%.

La potencia y materiales usados para los test cutáneos influyen significativamente en los resultados de prevalencia de sensibilidad a hongos. Por ejemplo: los test cutáneos

positivos en pacientes con historial sugestivo a sensibilidad *Cladosporium Herbarum* varia de un 12,5% a un 86% en la misma población dependiendo del extracto usado como testigo. (1)

La sensibilidad a hongos está reconocida, y no es siempre posible establecer una correlación entre esporas fúngicas contadas en la atmósfera y la presencia de síntomas alérgicos. Bruce et all (20) pudo correlacionar los síntomas de asma otoñales con esporas de *Alternaria* en solo 15 de 29 sujetos que han demostrado IgE a estos hongos. (25)

En un estudio de la universidad de Wisconsin sólo 1 de 20 sujetos sensibles a *Alternaria*, demuestran una correlación positiva entre síntomas alérgicos y esporas de *Alternaria*. (25)

La introducción de muestras aéreas y técnicas que pueden cuantificar la cantidad de alergenitos en la atmósfera, puede aclarar estos problemas.

Agarwal et all (5) descubrió el alergenito mayor de *Alternaria* en la atmósfera.

Desde que la actividad alérgica puede ser llevada en otras partículas además de las esporas tales estudios pueden intensificar las medidas entre la exposición a alergenitos y los síntomas clínicos. Las medidas medioambientales han supuesto nuevos avances y aprovechamientos en el estudio de la alergia a hongos. (51)

Salvaggio et all (112) describe una alta proporción de admisión de asmáticos en el Hospital de Nueva Orleans que parece estar asociado con una alta cantidad de esporas,

particularmente de esporas pequeñas, tales como los basidiomicetos.

Los basidiomicetos, están extensamente distribuidos y sus esporas son las más comunes en la atmósfera (28,29,30, 31). Investigaciones recientes muestran que ellos producen enfermedades alérgicas.

Santilli et all (115) demostraron que en 32 sujetos alérgicos a gramíneas el 65%-75% tenían test cutáneos positivos a tres extractos de basidiomicetos estos fueron además confirmados por la demostración positiva al RAST y CRIE.

Finalmente los médicos necesitan entender las posibilidades de sensibilización a materiales fúngicos, no solo de exposición natural de exterior, sino también de interior.

Un modesto número de plantas secas en las casas contribuye mínimamente a la presencia de alergenos en los hogares (23). Lo mismo sucede con las plantas de interior que favorecen el crecimiento de hongos fácilmente distribuidos por el aire.

Los vaporizadores de aire pueden generar también altas concentraciones de esporas fúngicas (121) y los fumadores de marihuana pueden desarrollar reacciones de hipersensibilidad a hongos. (58)

También se debe considerar la exposición ocupacional a hongos como una fuente importante de sensibilidad. Por ejemplo: en panaderos (65) se diagnostican test cutáneos positivos y cambios bronquiales a *Alternaria* y *Aspergillus*.

Es un hecho evidente también que alergenofúngicos juegan un papel importante en la etiología de sensibilidad a polvo de algodón. (27)

A modo de resumen podemos decir que la frecuencia relativa de alergia a hongos es valorada de muy diferente manera por distintos grupos de trabajo, que van desde considerar nula su incidencia, hasta conferirle un 50% de las alergias respiratorias. Estos resultados dependen de el método, alergenof (mezclas, alergenof individuales, etc...) y diagnóstico utilizados, así como, los tipos de enfermos (adultos o niños) asistidos. También influye en la incidencia, la aerobiología de la zona.

7.- HIPOTESIS DE TRABAJO.

La gran morbilidad de enfermedades alérgicas, aproximadamente el 12% de la población mundial es un hecho incuestionable, y dentro de ellas cada vez se constata más la implicación causal de los hongos en este tipo de patología.

Por otra parte no existe una base científica completamente contrastada, en cuanto, a los métodos diagnósticos etiológicos de los procesos alérgicos causados por hongos. En nuestra región, los hongos constituyen uno de los alergenos involucrados en el inicio de la enfermedad de muchos pacientes que atendemos diariamente.

Por ello, nos planteamos los objetivos de esta tesis que son tratar de conocer la incidencia de la patología alérgica inducida por hongos en nuestro medio.

Así mismo, trataremos de establecer si en el momento actual es suficiente la correlación existente entre historia clínica y diagnóstico etiológico de alergia a hongos, o si por el contrario sería necesario incidir más aún no sólo en la historia clínica, sino también, en la exploración física y sobre todo dentro de los elementos complementarios de diagnóstico en alergenos con estandarización mucho más adecuada.

8.- MATERIAL Y METODOS.

El trabajo se ha realizado sobre un grupo de 700 pacientes afectos de rinitis alérgica y rinosinusitis al siguiente estudio:

8.1.- ANAMNESIS:

Nombre

Edad Sexo Fecha

Antecedentes familiares

Antecedentes personales

VIII.- MATERIAL Y METODOS.

Frecuencia

Tipo de síntomas:

Estornudos

Rinorrea

Picor de nariz

Lagrimeo

Enrojecimiento ocular

Picor de ojos

Picor de oídos

Picor del paladar

Carraespere de garganta

Tos:

Productiva

Seca

Espasmódica

8.- MATERIAL Y METODOS.

El trabajo se ha realizado sobre un total de 700 pacientes afectos de procesos alérgicos, y fueron sometidos al siguiente estudio:

8.1.- ANAMNESIS:

Nombre

Edad Sexo Fecha

Antecedentes familiares

Antecedentes personales

Frecuencia

Tipo de síntomas:

Estornudos

Rinorrea

Picor de nariz

Lagrimeo

Enrojecimiento ocular

Picor de ojos

Picor de oídos

Picor del paladar

Carraspera de garganta

Tos:

Productiva

Seca

Espasmódica

Sibilancias:

Inspiratorias

Espiratorias

Disnea

Duración de la crisis

Momento del año

Estación:

Invierno

Primavera

Verano

Otoño

Día:

Soleado

Nublado

Lluvioso

Seco

Ventoso

Hora:

Nocturno

Diurno

Tarde

Levantarse

Lugar:

En la casa

En la calle

En el trabajo

Tipo de vivienda:

Casa baja

Casa de huerta

Casa de campo

Casa de playa

Piso

Condiciones de vivienda:

Tipo Ventilada

Soleada

Seca

Húmeda

Cerrada

Calefacción

Aire acondicionado

Alfombras

Tapicería

Tipo de suelo

Tipo de paredes:

Pintadas

Empapeladas

Enlucidas

Encementadas

Madera

Tipo de colchón:

Espuma

Muelles

Agua

Lana

Plumas

Tipo de almohada:

Espuma

Muelles

Agua

Lana

Plumas

Tipo de mantas:

Lana

Algodón

Sintéticas

Edredones

¿En alguna habitación en particular aumentan o se le desencadenan los síntomas?: SI NO

SI (descripción de la habitación y objetos)

Descripción del baño:

Húmedo

Seco

Tipo de cortinas de baño

Mamparas

Pérdidas frecuentes de agua

Descripción y tipos de plantas de interior:

Secas

Verdes

Flores

- Bebedor Acúmulo de alimentos ¿cuales?
- Medicación Acúmulo de grano (silos)
- Tratamientos Harinas
- Medicamento Estiercol (casa de campo o huerta)
- Vacuna Plantas de exterior
- Acúmulos de hojarasca
- 8.2.- EXPLORACIÓN Frutas en putrefacción
- Basuras
- Exámenes especiales Cultivos:
- Frutales
- 8.2.1.- Exploración Verduras
- 8.2.2.- Exploración Hortalizas
- Cereales
- Animales
- Exposición a productos químicos
- Intolerancias a:
- Polvo
- Insectos
- Alimentos
- Animales
- Olores
- Humos
- Medicamentos
- 8.3.- EXPLORACIÓN Ejercicio
- Emociones
- Cambios de temperatura
- Cambios de estación
- Fumador

Bebedor

Medicación que toma

Tratamientos anteriores:

Medicamentos

Vacuna



8.2.- EXPLORACION FISICA:

Hacemos especial hincapié en algunos aspectos como son:

8.2.1.- Exploración cardio-respiratoria.

8.2.2.- Exploración Otorrinolaringológica.

--- Rinoscopia: estudio de la fosa nasal anterior, estado de la mucosa, secreciones color, consistencia, poliposis, ulceraciones, lesiones.

--- Faringe: amígdalas, y todo el anillo de WALDEYER, en el que distinguimos coloración, secreciones, lesiones etc..

--- Otoscopia: en busca de lesiones CAEX. y del tímpano.

--- Peso del paciente y talla.

--- Tensión arterial.

8.3.- EXPLORACIONES COMPLEMENTARIAS:

--- Rx de torax, P-A y L.

--- Rx de senos paranasales

--- Espirometría

--- Electrocardiograma.

8.4.- ANALITICA:

- Análisis de sangre: fórmula, recuento, hgbl, hto, VSG, pruebas reumáticas,
- Análisis de orina: sedimentos y anormales
- Análisis de heces: parásitos.
- Determinaciones de eosinófilos en moco nasal y esputo.
- Determinaciones de IgE total.

8.5.- PRUEBAS ALERGICAS:

- Prick-test, en función de la historia clínica.

Además de ello, al paciente que en su diagnóstico etiológico evidencian positividades a hongos con alergenios estandarizados comercialmente, les aplicamos el protocolo de inclusión de estudio que consiste en:

8.6.- PROTOCOLO DE ADMISION DE PACIENTES:

- 1.-Edad superior a 16 años.
- 2.-Preferiblemente de raza blanca y no hipertricticos.
- 3.-Anamnesis: rinoconjuntivitis o asma.
- 4.-Dermografismo negativo.
- 5.-No padecer dermatitis atópica.
- 6.-No estar embarazada.
- 7.-No haber recibido inmunoterapia en los últimos 5 años.

8.-No estar en tratamiento con:

- beta-bloqueantes.
- H-2 antagonistas.
- antidepresivos tricíclicos.
- esteroides.

9.-En las 48h, previas a las pruebas:

- No estar en tratamiento con antihistamínicos.
- No estar en tratamiento con descongestionantes.

A los pacientes incluidos en el protocolo de admisión les fue realizado:

- Prick-test, con hongos estandarizados por nosotros.
- Pruebas de provocación nasal.

8.7.- METODOLOGIA DE LA TECNICA DEL PRICK.

1.-Elección de la zona a utilizar:

- Se empleará la cara volar del antebrazo y preferentemente alejada de la inmediaciones de los pliegues de codo y muñeca.

2.-Limpieza de la zona a utilizar:

- se limpiará la zona con una gasa-algodón impregnado en una solución salina fisiológica, sin presionar, para evitar problemas inherentes al dermatografismo.

pápulas con los viales, con los que se ha realizado la prueba 3.-Realización de la prueba del prick:

- Emplear una lanceta por cada prueba de extracto-dilución.

- Codificar de acuerdo con lo indicado en el vial, mediante un rotulador las claves de los lugares elegidos para realización de las pruebas.

- Separar las pruebas entre sí 3 cm.

- Colocar una gota del extracto sobre la piel.

- Presionar con la lanceta a través de la gota, evitando la formación de sangre.

- Repetir las pruebas en las que se hubiese producido sangre.

- Inmediatamente de realizar el prick, secar con un papel absorbente de celulosa las gotas. No apretar o frotar, para evitar mezclas.

- Tapar el brazo.

- Mantener en reposo al paciente.

- Leer los resultados tras 15 minutos y transferir los datos a las hojas control:

- Bordear el contorno de la pápula con un rotulador de punta fina.

- Adherir una tira adecuada de una cinta adhesiva transparente, con objeto de calcar la papula.

- Transferir la cinta adhesiva calcada a la hoja control adecuada.

- Identificar sobre la hoja de control con la cinta adhesiva calcada la correspondencia que tienen las

pápulas con los viales, con los que se ha realizado las pruebas.

-Calcular los diámetros mayores y menores de la pápula y expresar también el valor diámetro mayor por diámetro menor. (D por d).

8.8.- PRUEBAS DE PROVOCACION NASAL.

Se sabe en rinología que la mucosa nasal, pituitaria, es un órgano reflexógeno muy sensible. De ahí la conveniencia de evitar en lo posible estímulo inespecíficos como los provocados inevitablemente en grado variable por el "método de las torundas montadas".

También el método de la instilación de gotas no pareció muy adecuado a la vista de su gran inseguridad, respecto a la cantidad de antígeno y duración de su presencia en el lugar de la reacción. Por una parte, el rápida desplazamiento hacia adelante de la solución vehiculadora del antígeno, debido a su excesiva movilidad, o hacia atrás, a lo largo del suelo nasal relativamente insensible, suscita una estimulación insuficiente que con facilidad ocasiona resultados altamente negativos. Por otra parte, el bloqueo de la respiración nasal y la eventual acumulación de secreciones puede dar lugar a una ausencia de estimulación inicial y de capacidad reactiva de los bulbos carnosos de la pituitaria.

Por lo demás en la reacción de la mucosa nasal también desempeña cierto papel las irritaciones fisicoquímicas

inespecíficas. Así como, estímulos de cambios térmicos. Para realizar una prueba de provocación nasal deben de utilizarse estímulos con antígenos de máximo pureza aplicados exclusivamente en el área de reactividad principal, es decir, en el cornete inferior, especialmente en la cabeza. Con objeto de cumplir exactamente estos requisitos, también se recomendó la aplicación del antígeno en forma de spray, mediante un nebulizador (94,95). Como cantidad óptima de antígeno se consideró suficiente utilizar 0'05 ml. de la solución intradérmica, que en determinados casos puede repetirse.

Se trata de un spray de bombeo sobre el que se acopla el frasquito que contiene la solución. Esta sustancia utilizada para la prueba de utilización nasal solo contiene fenol como agente de conservación y no en cambio glicerina. De ahí la ventaja que posee de no producir irritaciones eventuales debido a la glicerina (95). Por una sola compresión de una adaptador nasal intercambiable, se nebulizan intranasalmente 0'04-0'05 ml. de la solución de prueba. Por regla general, esta solución es suficiente para inducir una provocación alérgica positiva en las rinopatías alérgicas. El adaptador nasal debe mantenerse lo más horizontal posible, es decir, no en la línea de prolongación del dorso de la nariz, al objeto de humedecer el área reactiva principal con la máxima cantidad posible de antígeno. Con el fin de prevenir la inhalación de antígeno, el paciente no debe efectuar una aspiración de aire por la boca.

8.9.- PRODUCCION Y PROCESAMIENTO.

Partimos de las siguientes cepas:

-Cladosporium Herbarum, cepa... CBS142.81

-Alternaria Alternata:

Cepa 2662...CECT(colección española de cultivos tipo)

Cepa 89344...CMI(Commonwealt Mycological Institute)

Cepa 7725...QM(quetermaster culture collection)

Cepa LSHB(SMO 430)...(London school of hygiene & tropical Medicine. London). Aislada de tomate. Londres 1948. Produce alternariol y derivados. Medio de patata-glucosa; patata diluida y Czapeck a 26°C.

-Aspergillus fumigatus:

Cepa CBS 54565=ATCC 16913=WB 4537

CBS: Central Bureau Schimmel Cultures Baarn

ATCC: American Type Culture Collection

WB: University of Wisconsin Departament of Bacteriology.

Una vez obtenida la cepa la trasvasamos a un medio que permita un crecimiento adecuado de la cepa de colección. Nosotros partimos de una cepa liofilizada, la cual, recomponemos en una solución de NaCl al 0,9% + 5% de Tween (Foto 1). Agitamos suavemente para favorecer y homogeneizar la suspensión.

Con una jeringa y aguja estéril, extraemos 0,5 ml de suspensión de la parte superior de la ampolla, con objeto de asegurarse una buena cantidad de esporas.

Este preinóculo lo sembramos en cultivos en medio líquido, que son exclusivos para hongos.

Este medio líquido es el medio de Czapek-Dox modificado que presenta la concentración siguiente:

Sacarosa.....30gr.

Nitrato Sódico..... 3gr.

Fosfato Dipotásico..... 1gr.

Sulfato de Magnesio..... 0,5gr.

Cloruro Potásico..... 0,5gr.

Sulfato Ferroso..... 0,01gr.

Una vez el preinóculo reseñado en el medio obtenemos el inóculo (Foto 1), el cual mantenemos en fase de crecimiento durante 40 días. En un recipiente de Roux (4 litros) a 25°C (Foto 1).

Como prevención de contaminación, dejamos siempre placas de Petri o tubos de agar sin sembrar.

Una vez pasados los cuarenta días obtenemos una masa de hongos adecuada y procedemos a la detención del crecimiento, para ello añadimos una solución de fenol en agua al 1%, que se introducirá con la ayuda de una gran aguja en los recipientes de cultivo y lo mantenemos durante 24h.

Una vez pasado este tiempo procedemos a la separación del micelio del medio de cultivo por filtración en papel o cualquier otro sistema mecánico (Foto 2).

Obtenido el cultivo filtrado, debemos ajustar el pH, para ello añadimos ClH hasta obtener un pH entre 3 y 3,5 (Foto 3). Después lavamos con acetona empleando un volumen de acetona cuatro veces superior al filtrado y lo mantenemos

entre 2-8°C durante 12h (Foto 4), para producir la precipitación y separar las proteínas y carbohidratos del resto de los oligoelementos.

Pasado ese tiempo procedemos a la eliminación de la acetona por medio de una tropa de agua de vacío, con lo cual eliminamos la mocotoxina, que son componentes del medio de cultivo que no precipitan (Foto 5).

El paso siguiente es resuspender la precipitación en líquido de Coca que es una solución tampón. Añadimos 250ml de líquido de Coca, por litro de medio y lo mantenemos en agitación magnética durante 30 minutos o una hora a 900 revoluciones por minuto (Foto 6).

* Concentración del líquido de Coca:

Cloruro Sódico..... 5gr.

Bicarbonato Sódico..... 0,4gr.

Agua destilada.....100ml.

Después de la agitación, procedemos al calentamiento a 70°C durante 20 minutos para eliminar las celulasas (Foto 7). Una vez enfriado realizamos la diálisis durante 12h en cuarto frío, provocando un corte de 10.000 Daltons (Foto 8).

En este momento, procedemos a la filtración con el filtro de Whatmman, o el de Millpore, para eliminar estructuras sólidas y separar moléculas en disolución. Todo este proceso lo realizamos en la cámara fría para evitar la contaminación de bacterias y hongos, e inhibir la actividad de las proteasas del extracto. A continuación realizamos la filtración esterilizante obteniendo moléculas menores a 0,22

micras (Foto 9).

* ¿Porqué realizamos esta segunda filtración?. La realizamos porque los filtros en profundidad, tipo Millipore, están constituidos por una masa de fibras entrelazadas que forman un conjunto de canales tortuosos. Los contaminantes se eliminan al quedar atrapados en el interior de la masa filtrante o absorbidos sobre las fibras. Debido a que la estructura porosa de los filtros en profundidad nunca es regular ni está perfectamente definida, no es posible atribuirles unas características precisas de retención. Por ello, es imposible definir para este tipo de filtros un tamaño de poro preciso y significativo.

Con el extracto obtenido, lo separamos en alicuotas (Foto 10), congelamos y procedemos a la liofilización Foto 11).

Una vez obtenida la liofilización (Foto 12), debemos proceder a su valoración inmunoquímica; para ello realizamos:

1.- SDS-PAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Duodecil Sulfato Sódico para obtener el peso molecular del extracto.

2.- IEF: Isoelectroenfoque, para obtener el punto isoeléctrico del extracto.

8.9.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato sódico:

Se realiza en un gel de poliacrilamida (10% acrilamida; 0,3% bisacrilamida) conteniendo SDS al 0,1%. Se empleó un

método de tampón discontinuo con un gel apilador de 3% de acrilamida y 0,09% de bisacrilamida.

La electroforesis se efectuó a 30mA durante 3 horas, empleándose como tampón de electrodos trisglicina 0,43M, pH 8,3 con SDS al 0,1%.

Las muestras se disuelven en tampón tris-HCl 0,125M, pH 6,8 con glicerol al 20%, SDS al 0,1%, azul de bromofenol al 0,01% y mercaptoetanol al 5%, incubándose 5 minutos a 100°C.

La tinción se realiza por difusión durante 12 horas en azul brillante de coomassie al 0,5% en ácido acético-metanol-agua (7-43-40) y la destinción también por difusión en la misma mezcla, sin colorante.

Se obtiene un resultado óptimo añadiendo 50 microgramos de proteína por calle.

La composición exacta de gel y del patrón para el cálculo de peso molecular se detalla a continuación:

SDS-PAGE (método de Laemmli et all.)

1.- GEL SEPARADOR (10% Acrilamida):

Solución ACA/BIS (30/0,9%).....	10ml
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8.....	7,5ml
SDS al 10%.....	0,3ml
EDTA 100mM.....	0,3ml
Agua destilada.....	10,9ml
Persulfato amónico (30mg/ml).....	1ml
TEMED.....	0,02ml

Tiempo de polimerización a 18°C = 30 minutos

2.- OVERLAY:

SDS al 0,1%

3.- GEL APILADOR (3% Acrilamida):

Solución ACA/BIS(30/0,9%)..... 1,5ml
 Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8..... 3,75ml
 Glicerol..... 3ml
 SDS al 10%..... 0,15ml
 EDTA 100mM..... 0,15ml
 Agua destilada..... 5,95ml
 Persulfato amónico (30mg/ml)..... 0,5ml
 TEMED..... 0,02ml

Tiempo de polimerización a 18°C = 20 minutos

4.- PATRON:

Proteínas	Subunidades MW
Lysozyme	14,400
Soybean Tripsin Inhibitor	21,500
Carbonic Anhydrase	31,000
Ovalbumin	45,000
Bovine Serum Albumin	66,200
Fosforilasa B	97,400

8.9.2.- Isoelectroenfoque en Geles de Agarosa.

1.- Preparación de muestras.

Los extractos liofilizados se disuelven en agua de inyección a la concentración que nos permita tener 4 mg de

proteína (BIO-RAD protein assay) por ml, de modo que una muestra de 5 microlitros contenga 20 microgramos de proteína, cantidad que da un óptimo resultado en nuestro sistema. Una vez disuelto el liofilizado, se centrifuga a 4.000 rpm, 10 minutos para eliminar restos de liofilizado no resolubilizables.

2.- Placas de isoelectroenfoque.

Se utilizan placas de agarosa "Isogel" (FMC) con un gradiente de pH 3-10. de 102 x 125 mm. Se sacan de la carcasa de plástico y se colocan sobre la placa enfriadora soporte de la electroforesis, donde se ha añadido previamente 0.3 ml de agua para mejorar el contacto.

A continuación, se seca la superficie del gel sobreponiendo brevemente un papel absorbente. (Blotting paper).

3.- Aplicación de electrodos y muestras.

Las muestras correrán en la dimensión más corta del gel (102 mm), por tanto, utilizaremos los contactores de electrodos (Electrode Wicks) largos (6 x 125 mm).

El primero de ellos, se impregna con la solución del cátodo: NaOH 1M que se ha añadido en una placa de Petri, y tras haberlo escurrido en papel absorbente, lo colocamos en el margen izquierdo de la placa; correspondiente al electrodo negativo.

Se coloca paralelo al borde del gel y tocando la placa uniformemente. A continuación, se impregna el segundo con la solución del ánodo; Acido acético 0.5M que se coloca en el margen derecho, tras haber escurrido el exceso de

acético.

Colocamos seguidamente una placa de vidrio para apretar los contactos de electrodo sobre la placa. La dejamos 1 minuto.

La muestra se coloca por medio de aplicadores que deben estar limpios e impregnados con tritón X-100 al 0,1%. Dicho aplicador permite un volumen de muestra o de patrón de 5 microlitros. El aplicador se coloca a 1-2cm del cátodo.

Tras la deposición de la muestra, se baja la tapa soporte de los electrodos de forma que éstos se superpongan perfectamente sobre los contactores.

La cubeta donde se realizan los experimentos es la Multifor II, 2117 (LKB) termostatzada con el Multitemp II 2219 (LKB) a 5°C para esta técnica. No hay que circular el fluido enfriado hasta poco antes de comenzar la electroforesis para evitar condensaciones sobre el gel y la placa.

4.- Electroenfoque.

Se comienza a 4 watios de forma constante durante 10 minutos, transcurrido ese tiempo, se retira el aplicador de muestra y se completa el electroenfoque a 25 watios durante 40 minutos, poniendo un voltaje de 1000 V como límite máximo.

La fuente de alimentación utilizada es la LKB 2197.

5.- Fijado, tinción y destinción.

Una vez finalizada la electroforesis, la placa se sumerge en la solución fijadora durante 10 minutos.

* Solución fijadora:

Metanol.....180ml.

Acido tricloroacético..... 30gr.

Acido sulfosalicílico..... 18gr.

Agua destilada hasta 500ml.

Tras los 10 minutos de fijado, se realiza el prensado (escurrir el exceso de fijador) se pone sobre la placa una lámina de papel absorbente humedecida con agua destilada y sobre ésta cuatro toallitas de papel. Sobre éstas, se coloca una lámina de vidrio y la prensa (de aproximadamente 2Kg.). Se mantiene el prensado 10 minutos.

A continuación, se separa la lámina de papel absorbente de la placa después de humedecerlo otra vez, y se sumerge en agua destilada durante 5 minutos para eliminar los residuos de anfolitos y fijador.

Se seca el gel con aire caliente (con secador a unos 40cm de separación) y seguidamente, se realiza la tinción: La placa se pone a flotar con la cara del gel hacia abajo en la solución de tinción siguiente:

Azul brillante de Coomassie R-250.....1gr.

Etanol.....250ml

Acido acético glacial.....90ml

Agua destilada hasta 1 litro.

Durante 30 minutos.

Tras la tinción, la placa se enjuaga con agua destilada y se destiñe durante tres minutos en la solución de destinción, que es la misma que la de tinción pero sin azul de Coomassie. Finalmente, la placa se seca y archiva.

El patrón de punto isoeléctrico a utilizar es el "Isogel pI Markers" (FMC) cuya composición se detalla a continuación:

Se realiza por el Método de H10-335, que determina la concentración de proteínas o nitro pI

C-Phycocyanin.....4.75,4.85

(A. nidulans)

Azurin(p. aeruginosa).....5.65

Trifluoroacetylated.....5.9

Myoglobin Met

(Porcine)

Myoglobin Met (Porcine).....6.45

Myoglobin Met (Equine).....7.3

Myoglobin Met.....8.3

(Sperm Whale)

Cytochrome C.....10.6

(Horse Heart)

El punto isoeléctrico para los extractos de Alternaria Alternata y Cladosporium Herbarum aparecen en las Fotos 15 y 16 respectivamente.

A continuación realizamos la valoración analítica, por medio de los siguientes procesos:

- 1.- Determinación de proteínas
- 2.- Determinación de carbohidratos.
- 3.- Determinación de cloruros.

8.9.3.- Determinación de proteínas.

- a) Procedimiento standard
- b) Procedimiento microassay

Se realiza por el Método de BIO-RAD, que determina la concentración de proteínas o nitrógeno.

8.9.3.1.- Determinación de proteína por método BIO-RAD, procedimiento standard:

Se utiliza para análisis de tratamientos: ácaros, polvo y pólenes acuosos, venenos de himenópteros.

1º.- Partimos de alícuotas de BSA (BIO-RAD) congeladas, con una concentración de 1520 microgr/ml (dilución A).

2º.- Preparamos la dilución D, diluyendo la A cinco veces (80 microl solución A con 360 microl de agua destilada). Dicha solución D tendrá entonces 30,4 microgr/0,1ml.

20	80	30.4	0.304
40	40	60.8	0.608
60	20	91.2	0.912
80	0	121.6	0.983
100	0	152.0	1.034

Procedimiento:

1º.- Diluir la cantidad de reactivo concentrado 1:4

con agua destilada y filtrar.

Diluyendo las soluciones A y D con SSFF o agua destilada, obtenemos el siguiente patrón:

microl-Sol. D microl-Agua d. microgr. prot/0,1ml A-595

absorbancia a 595 obtenemos una recta de correlación. En este caso corresponde: $r=0,991$.

0	100	0	0,0
33	66	10,1	0,105
66	33	20,3	0,209

Se utiliza para análisis de *Cryptosporidium*, *Isospora*, *deplet.*, hongos achoscos, epidermídeos acuosos y bacterias.

Preparación del patrón:

microl-Sol. A

Partidos de almejas de 234 (10) congeladas, con una concentración de 1526 microgr./ml.

(dilución A)

20	80	30,4	0,312
40	60	60,8	0,570
60	40	91,2	0,756
80	20	121,6	0,955
100	0	152,0	1,084

Preparamos la dilución C diluyendo la B 10 veces (200microl B en 1800 microl de agua destilada o SSFF), de modo que la concentración será 15,2 microgr/ml.

Procedimiento:

1º.- Diluir la cantidad de reactivo concentrado 1:4

con agua destilada y filtrar.

2º.- Añadir 5ml del reactivo diluido a cada 0,1 ml de muestra o patrón y mezclar por inversión.

3º.- Tras esperar 10-20 minutos, leer la absorbancia a 595nm..

Representando microgr.prot./0.1ml frente a la absorbancia a 595 obtenemos una recta de correlación que en este caso corresponde, $r=0,993$.

8.9.3.2.- Determinación de proteína por método BIO-RAD,
procedimiento microassay.

Se utiliza para análisis de tratamientos: sobrenadantes depot, hongos acuosos, epidérmicos acuosos y bacterias.

Preparación del patrón:

1º.- Partimos de alícuotas de BSA (BIO-RAD) congeladas, con una concentración de 1520 microgr./ml (dilución A)

2º.- Preparamos la dilución B, diluyendo la A 10 veces (200microl A en 1800 microl agua destilada o SSFF). Así la dilución B tendrá una concentración de 152 microgr./ml.

3º.- Preparamos la dilución C diluyendo la B 10 veces (200microl B en 1800 microl de agua destilada o SSFF), de modo que la concentración será 15,2 microgr/ml.

De las diluciones de patrón formadas (1ml) tomamos 0,1 ml, al igual que de las muestras problema y añadimos 0,3 ml.

de reactivo BIO-RAD - reactivo. Se agita a 50-60 minutos a 595nm.

recompuestos en agua, obtenemos el siguiente patrón:

<u>microgr prot.</u>	<u>microgr</u>	<u>microl. Sol B</u>	<u>microl agua d</u>	<u>A-595</u>
<u>en 0,8ml</u>	<u>prot/ml</u>			
0	0	0	1000	0,0
20	25	164	836	1,049
16	20	131	869	0,864
11,2	14	92	908	0,525
8	10	66	934	0,365
4,8	6	39	961	0,215

microl. Sol C

3,2	4	263	737	0,098
0,8	1	66	934	0,066

Procedimiento:

1.- Preparación de solución de patrón: 13,5gr de sulfato de cobre (II) se disuelve en 50ml de agua destilada.

De las diluciones de patrón formadas (1ml) tomamos 0,8 ml, al igual que de las muestras problema y añadimos 0,2 ml

2.- Antes de la lectura se agita la muestra con 415ml de ClH concentrado y diluir a 500ml con agua destilada.

de reactivo BIO-RAD concentrado. Agitamos y leemos tras 50-60 minutos a 595nm.

Las absorbancias obtenidas con un patrón tipo representando los microgr. de proteína versus A-595 obtenemos una correlación de $r=0,9947$.

8.9.4.- Determinación de carbohidratos:

a) Método Orcinol: Para la determinación de pentosas.

b) Método Antrona: Para la determinación de hexosas.

8.9.4.1.- Método Orcinol, determinación de Pentosas:

Materiales y reactivos:

- Orcinol
- Sulfato amónico férrico
- ClH concentrado. 37,5%
- Xylosa
- Tubos de ensayo Pyrex
- Baño de agua
- Placa calentadora.

Procedimiento:

1.- Preparación del reactivo stock, disolviendo 13,5gr de sulfato amónico férrico y 20gr de orcinol en 500ml de agua destilada. El reactivo stock lo conservamos en cámara fría.

2.- Antes de su uso, mezclar 25ml de reactivo stock con 415ml de ClH concentrado y diluir hasta 500ml con agua destilada.

3.- Adición de 3ml de muestra (4-40microgr de pentosa) a 9ml de reactivo diluido.

4.- Calentar en baño de agua a 100°C durante 20 minutos.

5.- Enfriado de la solución y lectura de 660nm.

6.- Usamos xylosa para la solución estandar, a concentraciones de 0,10,20,30 y 40 microgr/ml de agua destilada.

La solución estandar sigue el mismo tratamiento que las muestras.

8.9.4.2.- Método de la Antrona, determinación de Hexosas:

Materiales y reactivos:

- Antrona
- Acido sulfúrico
- Glucosa anhidra
- Tubos de ensayp Pyrex
- Baño de agua
- Placa calentadora

Procedimiento:

1.- Preparación del reactivo antrona añadiendo 0,2gr de antrona a 100ml de ácido sulfúrico. Agua fría (mezcla volumétrica 3:1). Dejar 30-60 minutos a temperatura ambiente hasta disolución total.

2.- Añadir lentamente 5ml de reactivo antrona a 1ml de muestra, en un tubo de ensayo inmerso en un baño frío. Agitar el tubo en el baño para asegurar una mezcla homogénea, evitando el aumento de temperatura.

3.- Calentamiento del tubo a 100°C durante 10 minutos.

4.- Enfriamiento de los tubos y lectura en espectrofotómetro a 540nm.

5.- Usamos glucosa para la solución estandar, a concentraciones de 0, 100, 200, 300, 400 y 500 microgr/ml de agua destilada. La solución estandar sigue el mismo tratamiento que las muestras.

8.9.5.- Determinación de cloruros:

Materiales:

- Nitrato de plata
- pH-metro con medida de mV y electrodos de plata (indicador) y plata/cloruro de plata (referencia).

- Cloruro sódico

Procedimiento:

1.- Se prepara una solución valorada de cloruro de sodio, 0,0144N, disolviendo 0,8241gr previamente secados a 250-350°C de una a dos horas y diluyendo a 1l. Esta solución contiene 0,500mg de cloro/ml.

2.- Se prepara una solución valorada de nitrato de plata 0,0144N, disolviendo 2,40gr de nitrato de plata en agua destilada diluyendo a 1l.

3.- La titulación se realiza con un voltímetro electrónico para indicar el cambio de potencial entre los dos electrodos. El punto de vire de la titulación es aquella

lectura de instrumento en la cual se presenta el mayor cambio en el voltaje, para incrementos constantes y pequeños del nitrato de plata.

Se registran los puntos de viraje (ml de nitrato de plata añadidos) para diversas diluciones de cloro (NaCl) y se hace una recta representando ($\log Cl$) frente a los ml de nitrato de plata de viraje de cada solución. Con ello se conoce la concentración de cloro de la muestra.

4.- La medida la haremos pipeteando 1ml de muestra en un vaso de precipitados y se añade agua destilada hasta 30ml. A continuación se hace la valoración potenciométrica.

5.- La sensibilidad de la técnica es del 2,5%

6.- El límite máximo permitido de iones cloruro, es de 0,008-0,009mg/ml.

Una vez terminado este proceso de producción y procesamiento estudiamos la concordancia por planimetría de la actividad biológica y los patrones inmunoquímicos.

8.10.- Método Estadístico.

El método estadístico ha consistido en un análisis de regresión lineal entre las áreas de las pápulas y el logaritmo en base 3 de las concentraciones de alérgeno, usando esta última como variable dependiente. Se ha obtenido la recta de regresión y el coeficiente de correlación.

Esta recta de regresión se ha usado para predecir valores de concentración correspondientes a las áreas de las pápulas. De esta forma, se ha determinado la concentración de

alergeno para el área media de los controles, para el error estándar de la media y el percentil 68 de las áreas de las pápulas normales.

9.- RESULTADOS

Hemos revisado los datos de 1989 y 1990 de los procesos alérgicos y asma de 1989.

De ellos, 144 pacientes fueron alérgicos a hongos 144.

De estos 144, 123 fueron nuestros objetivos de estudio.

Las edades de los pacientes entre 16 y 41 años. 18 varones (54.5%).

Como antecedentes de alergia, 28.5% antecedentes de rinitis, 28.5% antecedentes de asma, 28.5% antecedentes de alergia medicamentosa, 28.5% rinitis en hermanos (28.5%).

8 pacientes (28.5%) antecedentes de asma, 28.5% (28.5%); cinco por rinitis, 28.5% sólo por rinitis y 28.5% exclusivamente por rinitis.

Las características de los pacientes en la edad, sexo y manifestaciones de alergia en la TABLA I.

En lo referente a la manifestación de alergia que el 17.85% de los pacientes presentaron síntomas respiratorios, 28.5% de alergia en el estudio

IX.- RESULTADOS.

9.- RESULTADOS

Hemos revisado un total de 700 pacientes, afectados de procesos alérgicos y vistos desde Enero de 1987 a Julio de 1989.

De ellos, presentaban clínica de clara etiología alérgica a hongos 144 lo que supone un 20,57%.

De estos 144, 28 reunían los criterios señalados en nuestros objetivos de trabajo.

Las edades de estos 28 pacientes están comprendidas entre 16 y 41 años, de los cuales, 10 son mujeres (35,7%) y 18 varones (64,3%).

Como antecedentes familiares 11 presentaban antecedentes de asma broquial en padres (39,3%); 5 antecedentes de rinitis en padres (17,9%); 2 antecedentes de alergia medicamentosa en padres (7,15%); 2 antecedentes de rinitis en hermanos (7,15%) y 8 sin antecedentes alérgicos (28,5%).

8 pacientes consultaban por crisis de disnea y tos (28,5%); cinco por rinitis y crisis asmáticas (17,9%); 1 sólo por rinitis y dermatitis atópica (3,6%) y 14 exclusivamente por rinitis (50%).

Las características de estos 28 pacientes en cuanto a edad, sexo y manifestaciones clínicas se hallan recopiladas en la TABLA I.

En lo referente a la exploración física, constatamos que el 17,85% de los pacientes presentaban sibilancias espiratorias diseminadas, mientras que en el estudio

rinoscópico se objetivaron alteraciones en la mucosa nasal en un 71,42%. Sin embargo, tanto la exploración otoscópica como la ocular se mantuvieron dentro de los límites de la normalidad.

La tensión arterial en todos los pacientes fue normal.

Sóamente uno de los pacientes presentaba signos escasos de dermatitis atópica.

Todo ello está reflejado en la TABLA II.

En la TABLA III se expresan los hallazgos analíticos, donde se objetiva que el 82,14% presentaban tasas elevadas de eosinofilia en fórmula. En cuanto a la eosinofilia en moco nasal, las tasas elevadas de eosinófilos las expresamos de la siguiente manera (116):

- sin eosinofilia ($< 5\%$): 28,57%.
- eosinofilia leve ($< 10\%$): 0%.
- eosinofilia moderada ($< 50\%$): 57,14%.
- eosinofilia acusada ($> 50\%$): 14,3%.

La eosinofilia en esputo es importante en el 46,4% de los pacientes. Finalmente, los niveles de IgE total estaban todos elevados, aunque con amplias oscilaciones de unos pacientes a otros.

En la TABLA IV reseñamos los datos más significativos de las exploraciones complementarias y hacemos constar que el 50% de los pacientes presentaban alteraciones en la radiología de senos.

Sin embargo, y dado que las pruebas de radiología pulmonar las realizamos posteriormente a la primera visita, reseñamos que fueron rigurosamente normales. Esta misma

circunstancia se dió en las pruebas espirométricas excepto en dos pacientes por falta de colaboración de los mismos.

En las TABLAS V, VI y VII, dejamos constancia de la composición de los distintos extractos estandarizados por nosotros en laboratorio especializado, tal como se explica en el capítulo de material y métodos.

Debemos tener en cuenta que la TABLA V es la que se refiere a *Alternaria Alternata*, la TABLA VI es la de *Cladosporium Herbarum*, y la TABLA VII es la de *Aspergillus Fumigatus*, pudiéndose observar las distintas composiciones de cada extracto.

Las TABLAS VIII, IX y X recogen las respuestas dérmicas a las diferentes concentraciones de cada extracto alergénico, y así, en la TABLA VIII referida a *Alternaria Alternata* podemos observar el tamaño de las pápulas, que es estadísticamente significativo con respecto a los controles con una $p < 0,001$.

La TABLA IX hace referencia a las respuestas dérmicas al extracto alergénico de *Cladosporium Herbarum*, mientras que en la TABLA X se expresan los resultados de *Aspergillus Fumigatus*; en ellas y aunque en la lectura dérmica no se especifique un diámetro papular tan manifiesto como en la TABLA VIII los resultados son también significativos con respecto a los controles ($p < 0,001$).

Las pruebas de provocación nasal reflejadas en la TABLA XI demuestran la positividad de un 60,71% a *Alternaria Alternata*; un 35,71% a *Cladosporium Herbarum*, y un 14,28% a *Aspergillus Fumigatus*. Debemos de insistir que un 28,57% de

los pacientes son positivos a más de un hongo de los estudiados.

En la TABLA XII aparecen las otras sensibilizaciones a las cuales los pacientes eran alérgicos.

En cuanto a los cálculos estadísticos debemos de reseñar, que para la obtención de una pápula semejante a la control de 36,13 mm², para la *Alternaria Alternata* necesitamos 11,534 mgr/ml. con una oscilación del 68% de los valores de la población que varía entre 20,83 mgr/ml. y 6,38 mgr/ml. (11.2). Para *Cladosporium Herbarum* necesitamos 416,86 mgr/ml. con una oscilación del 68% de los valores de la población entre 1949,84 mgr/ml. y 87,09 mgr/ml. (11.3), y para *Aspergillus Fumigatus* la cantidad para obtener un área semejante al control es de 645,65 mgr/ml. y la oscilación del 68% de valores de la población varía entre 3246,80 mgr/ml. y 130,60 mgr/ml. (11.4).

10.1.- TABLAS 1. PACIENTES CONTROLADOS

PACIENTE	EDAD	SEXO	DIAGNOSTICO
1	23		
2	20		
3	26		
4	16		
5	18		
6	30		
7	28		
8	28		
9	11		
10	21		
11	26		
12	30		
13	11		
14	28		
15	11		
16	21		
17	16		
18	21		
19	12		
20	10		
21	19		
22	11		
23	21		
24	17		
25	38		
26	18		
27	19		
28	41		

X.- TABLAS.

R: RINITIS

A.B.: ASMA BRONQUIAL

D.A.: DERMATITIS ATOPICA

10.1.- T A B L A I. PACIENTES ESTUDIADOS

PACIENTE	EDAD	SEXO	CLINICA
1	23	V	R
2	20	V	A.B.
3	26	V	A.B.
4	16	V	R
5	18	V	R+A.B.
6	30	V	R
7	28	V	R+A.B.
8	26	H	R+A.B.
9	34	H	A.B.
10	23	H	R+D.A.
11	26	H	R+A.B.
12	30	H	R
13	31	V	A.B.
14	28	H	R
15	31	V	R
16	24	V	R
17	28	V	R+A.B.
18	23	H	R
19	22	V	R
20	40	V	A.B.
21	19	V	R
22	31	V	A.B.
23	23	V	A.B.
24	17	H	R
25	38	H	A.B.
26	18	V	R
27	19	H	R
28	41	V	R

R: RINITIS

A.B.: ASMA BRONQUIAL

D.A.: DERMATITIS ATOPICA

S.E. : SIBILANCIAS EXPIRATORIAS
 S.R. : SIBILANCIAS Y RONCOS
 M.P.S. : MUCOSA PALIDA Y SECRETANTE
 M.P. : MUCOSA PALIDA
 M.P.S.E. : MUCOSA PALIDA SECRETANTE Y EDEMATOSA
 M.R. : MUCOSA ROJA
 M.R.E. : MUCOSA ROJA Y EDEMATOSA
 D.A. : DERMATITIS ATOPICA

10.2.- T A B L A I I. DATOS DE EXPLORACION FISICA

E X P L O R A C I O N							
PACIEN.	AUSCULT.	RINOSC.	OTOSC.	OJOS	PESO	T. A.	PIEL
1	N	M.P.S.	N	N	62	140/70	N
2	S.E.	N	N	N	66	120/70	N
3	N	N	N	N	70	140/70	N
4	N	M.P.S.	N	N	57	110/60	N
5	S.E.	M.P.S.	N	N	76	130/60	N
6	N	M.E.S.	N	N	80	140/80	N
7	S.R.	M.P.	N	N	88	140/80	N
8	N	M.P.S.E.	N	N	60	110/60	N
9	N	N	N	N	67	120/60	N
10	N	M.P.E.	N	N	60	110/55	D.A.
11	N	M.P.	N	N	56	100/60	N
12	N	M.P.S.	N	N	60	120/65	N
13	N	N	N	N	77	140/75	N
14	N	M.R.	N	N	70	130/70	N
15	N	M.P.	N	N	89	160/80	N
16	N	M.R.	N	N	77	110/60	N
17	N	M.P.S.	N	N	80	140/80	N
18	N	M.P.	N	N	60	110/50	N
19	N	M.P.	N	N	71	120/55	N
20	N	N	N	N	90	150/75	N
21	N	M.R.	N	N	68	110/55	N
22	S.E.	N	N	N	88	140/80	N
23	S.E.	N	N	N	69	110/60	N
24	N	M.P.	N	N	71	100/60	N
25	S.E.	N	N	N	80	150/80	N
26	N	M.P.	N	N	64	110/60	N
27	N	M.P.S.E.	N	N	55	100/50	N
28	N	M.R.E.	N	N	90	150/80	N

S.E. : SIBILANCIAS EXPIRATORIAS

S.R. : SIBILANCIAS Y RONCUS

M.P.S. : MUCOSA PALIDA Y SECRETANTE

M.P. : MUCOSA PALIDA

M.P.S.E. : MUCOSA PALIDA SECRETANTE Y EDEMATOSA

M.R. : MUCOSA ROJA

M.R.E. : MUCOSA ROJA Y EDEMATOSA

D.A. : DERMATITIS ATOPICA

EXPLORAC 10.3.- TABLA III

A N A L I T I C A				
PACTE.	EOSI. HEMOG.	EOSI. M.N.	EOSI. ESP.	IgE. TOTAL
1	N	40%	-	741 UI/ml
2	N	-	40%	540 UI/ml
3	9%	-	38%	640 UI/ml
4	N	40%	-	320 UI/ml
5	16%	38%	56%	227 UI/ml
6	N	60%	-	1200 UI/ml
7	16%	53%	60%	840 UI/ml
8	11%	18%	38%	134 UI/ml
9	10%	3%	-	457 UI/ml
10	18%	42%	-	620 UI/ml
11	6%	52%	-	270 UI/ml
12	18%	40%	-	605 UI/ml
13	6%	3%	20%	257 UI/ml
14	N	28%	-	134 UI/ml
15	8%	44%	8%	320 UI/ml
16	16%	40%	18%	260 UI/ml
17	8%	18%	14%	630 UI/ml
18	8%	47%	-	540 UI/ml
19	7%	2%	-	621 UI/ml
20	4%	16%	68%	130 UI/ml
21	7%	40%	-	260 UI/ml
22	10%	3%	42%	328 UI/ml
23	6%	3%	38%	254 UI/ml
24	4%	42%	-	771 UI/ml
25	11%	2%	28%	441 UI/ml
26	6%	28%	-	381 UI/ml
27	6%	45%	-	1200 UI/ml
28	8%	50%	-	330 UI/ml

V.S.: VELADURA DE SENOS

N.C.: NO COLABORA

PACTE. : PACIENTE

EOSI. HEMOG.: EOSINOFILOS EN HEMOGRAMA

EOSI. M.N. : EOSINOFILOS EN MOCO NASAL

EOSI. ESP. : EOSINOFILOS EN ESPUTO

10.4.- T A B L A I V

E X P L O R A C I O N E S C O M P L E M E N T A R I A S			
PACTE.	Rx. SENOS	Rx. TORAX	ESPIROMETRIA
1	H.C.	N	N
2	N	N	N
3	-	N	N
4	H.C.	N	-
5	H.C.	N	N
6	H.C.	N	-
7	H.C.	N	N
8	H.C.	N	N.C.
9	N	N	N
10	H.C.	N	-
11	N	N	N
12	H.C.	N	-
13	N	N	N
14	N	N	-
15	H.C.	N	-
16	V.S.	N	N
17	H.C.	N	N
18	H.C.	N	N
19	N	N	N
20	N	N	N
21	N	N	-
22	N	N	N
23	N	N	N
24	N	N	N
25	N	N	N.C.
26	N	N	N
27	H.C.	N	N
28	H.C.	N	N

H.C.: HIPERTROFIA DE CORNETES

V.S.: VELADURA DE SENOS

N.C.: NO COLABORA

El patrón analítico de los extractos estandarizados por nosotros es el siguiente:

10.5.- T A B L A V

Alergeno: Alternaria Alternata

1. Residuo seco:.....	0,975gr/l
	de medio
2. % Proteinas en liofilizado:.....	0,32
3. % Carbohidratos, hexosas:.....	36,45
4. % Carbohidratos, pentosas:.....	3,10
5. pH (en disolución 1 SPT):.....	7,5
6. Cloruros (en disolución 1 SPT):.....	menos de
	0,008mg/ml

Metodología:

1. Bradford (BIO-RAD)
2. Método de la Antrona.
3. Método del Orcinol.
4. Medida directa en pH-metro.
5. Medida potenciométrica.

10.6.- T A B L A V IAlergeno: Cladosporium Herbarum

1. Residuo	1. Residuo seco:.....	0,527 gr/l de medio
2. % Prote	2. % Proteinas en liofilizado:.....	0,52
3. % Carbo	3. % Carbohidratos, hexosas:.....	35,78
4. % Carbo	4. % Carbohidratos, pentosas:.....	2,39
5. pH (en	5. pH (en disolución 1 SPT):.....	7,5
6. Clorur	6. Cloruros (en disolución 1 SPT): menos de	0,008 mg/ml

Metodología:

1. Bradford (BIO-RAD)
2. Método de la Antrona.
3. Método del Orcinol.
4. Medida directa en pH-metro.
5. Medida potenciométrica.

10.7.- T A B L A V I IA L E R G E N O : *Aspergillus fumigatus*Concentración (33.333 E/ml) (100 mg/ml) (100 mg/ml)
3.33 mg/ml (10 mg/ml)log Alergeno: *Aspergillus Fumigatus*

1. Residuo seco:..... 3,026 gr/l
de medio
2. % Proteínas en liofilizado:..... 0,11
3. % Carbohidratos, hexosas:.....25,75
4. % Carbohidratos, pentosas:..... 2,61
5. pH (en disolución 1 SPT):..... 7,6
6. Cloruros (en disolución 1 SPT):... menos de
0,008 mg/ml

Metodología:

1. Bradford (BIO-RAD)
2. Método de la Antrona.
3. Método del Orcinol.
4. Medida directa en pH-metro.
5. Medida potenciométrica.

X (mm²)

24,7

27,975

42,65

(*) : Diámetro mayor/Diámetro menor (mm)

(**) : Producto de los diámetros (mm²)

10.8.- T A B L A V I I I

A L E R G E N O : Alternaria alternata			
Concentración	(33.333 E/ml)	(100.000 E/ml)	(300.000 E/ml)
	3,33 mg/ml	10 mg/ml	30 mg/ml
log3 Conc.	1,09	2,09	3,09
VIAL nº	1	2	3
PACIENTE Nº			
1	(*) 4/3 (**) 12	3,5/3,5 12,2	4/4 16
2	-	7/2,5 17,5	6,5/5 32,5
3	6/6 36	6,5/5 32,5	6/5 30
4	8/3,5 28	9/4 36	6,5/4,5 29,2
5	4/4 16	4/3 12	6/3 18
6	4/3,5 14	6/5 30	6/6 36
7	6/3 18	5/2,5 12,5	6/3 18
8	8/6 48	9/6,5 58,5	11/8 88
9	2/2 4	4/3 12	6/5,5 33
10	7/6 42	7/6,5 45,5	21/8 168
11	6/6 36	6/6 36	7/7 49
12	7/4 28	9/4 36	8/6 48
13	8/4 32	5/4 20	12/5 60
14	7,5/6,5 48,7	8/5 40	10,5/6,5 68,2
15	4/2,5 10	9/4 16	- -
16	5/4,5 22,5	7/3,5 24,5	7/7,5 52,5
X (mm2)	24,7	27,575	46,65

(*) : Diámetro mayor/Diámetro menor (mm)

(**): Producto de los diámetros (mm2)

10.9.- T A B L A I X

A L E R G E N O : Cladosporium herbarum			
Concentración	(33.333 E/ml)	(100.000 E/ml)	(300.000 E/ml)
	3,33 mg/ml	10 mg/ml	30 mg/ml
log3 Conc.	1,09	2,09	3,09
VIAL nº	1	2	3
<u>PACIENTE Nº</u>			
1	(*) 3,5/3 (**) 10,5	4/2 8	3,5/3 10,5
2	5/5 25	5/5 25	8/5,5 44
3	3,5/4 14	4/4 16	5,5/4 22
4	2/2 4	3/2 6	3,5/4 14
5	2/2 4	3/3 9	3,5/3 10,5
6	2/2 4	3/2,5 7,5	4/4 16
7	- -	- -	7/5 35
8	5/3 15	7/4,5 31,5	6/3 18
9	- -	4/3,5 14	6/4 24
10	3/3 9	- -	5/3,5 17,5
11	3/2,5 7,5	5/4 20	6/4 24
12	3,5/2,5 8,7	4/3,5 14	4/3 12
13	3/2,5 7,5	- -	6/3 18
14	6/4 24	3/2 6	6/4 24
15	5/3,5 17,5	4/3 12	7/5 35
16	6/6 30	4/3,5 14	6/6 36
X (mm2)	11,29	11,43	22,53

(*) : Diámetro mayor/Diámetro menor (mm)

(**): Producto de los diámetros (mm2)

10.10.- T A B L A X

A L E R G E N O: Aspergillus fumigatus			
Concentración	(33.333 E/ml)	(100.000 E/ml)	(300.000 E/ml)
	3,33 mg/ml	10 mg/ml	30 mg/ml
log3 Conc.	1,09	2,09	3,09
VIAL nº	1	2	3
<u>PACIENTE Nº</u>			
1	(*) 4/3 (**) 12	5/4 20	6/4 24
2	2/2 4	5/5 25	7/6 42
3	3/2,5 7,5	3,5/3 10,5	4,5/4,5 20,2
4	5/3 15	7/3 21	4,5/3 13,5
5	2,5/2,5 6,2	3/2 6	5,5/3 16,5
6	3/2 6	- -	4/3 12
7	4/4 16	3/2 6	6/5 30
8	3,5/2 7	3/2 6	3,5/3 10,5
9	4/3,5 14	4,5/4 18	4,5/4 18
X (mm ²)	9,74	12,5	20,74

(*) : Diámetro mayor/Diámetro menor (mm)

(**): Producto de los diámetros (mm²)

A.F. : ASPERGILLUS FUMIGATUS

0 : NO SE REALIZA

10.11.- T A B L A X I

P R U E B A S D E P R O V O C A C I O N N A S A L			
PACTE.	A.A.	CL. H.	A.F.
1	+	-	-
2	0	0	0
3	0	0	0
4	+	-	-
5	-	-	+
6	+	-	-
7	+	+	-
8	-	-	-
9	+	-	-
10	-	+	-
11	-	-	-
12	+	+	-
13	-	-	-
14	-	-	+
15	+	+	-
16	+	+	-
17	-	+	-
18	-	+	+
19	+	+	-
20	-	-	+
21	+	-	-
22	+	-	-
23	+	-	-
24	+	-	-
25	+	+	-
26	+	+	-
27	+	-	-
28	+	-	-

A.A. : ALTERNARIA ALTERNATA
 CL.H.: CLADOSPORIUM HERBARUM
 A.F. : ASPERGILLUS FUMIGATUS
 0 : NO SE REALIZA

[illegible]

11.- CALCULOS

11.1.- ESTANDARIZACION.

- CONTROL PARA PRUEBA PRICE

Se utilizó difosfato de hidrogeno a una concentración de 10mg/al (54.3mmol/l). La dilución fue de 100 partes de 100 partes de su utilización.

RESULTADOS CONTROL: XI.- CALCULOS.

Diámetro mayor x diámetro menor

n=

media= 36,1237 =

desviación=

desviación de la media=

error de la media=

area1= media + desviación=

area2= media - desviación=

11.2.- CALCULO ALTERNARIA ALTERNATA

- ECUACION : (X) Productos de los diámetros (mm) versus la conc.

Intercept. = -0,184

x. = 0,767

x. = 0,710 (2-0,001)

11.- CALCULOS

11.1.- ESTANDARIZACION.

- CONTROL PARA PRUEBA PRICK -

Se utilizó difosfato de histamina a una concentración de 10mg/ml (54,3mmol/l). La dilución fué preparada en el mismo día de su utilización.

RESULTADOS CONTROL:

Diámetro mayor x diámetro menor

n=	100
media= 36,1287 =>	36,13mm ²
desviación=	8,18
desviación de la media=	0,818
error de la media=	1,62
area1= media + desviación=	44,31
area2= media - desviación=	27,95

11.2.- CALCULO ALTERNARIA ALTERNATA

- ECUACION : (X) Productos de los diámetros (mm²) versus log₃ conc.

$$\text{Intercept.} = -0,184$$

$$m. = 0,067$$

$$r. = 0,910 \quad (P < 0,001)$$

$$y = mx + b$$

$$\log_3 [y] = -0,184 + 0,067 (36,13) = 2,236$$

$$\log_3 [y_1] = -0,184 + 0,067 (44,31) = 2,764$$

$$\log_3 [y_2] = -0,184 + 0,067 (27,95) = 1,688$$

$$\log_{10} [y] = 2,236 \times \log_{10} [3] = 2,236 \times 0,4771 = 1,062$$

$$\log_{10} [y_1] = 2,764 \times \log_{10} [3] = 2,764 \times 0,4771 = 1,31$$

$$\log_{10} [y_2] = 1,688 \times \log_{10} [3] = 1,688 \times 0,4771 = 0,805$$

Oscilación del 68% de los valores de la población:

$$\text{Antilog} [y] = 11,534 \text{ mgr/ml}$$

$$\text{Antilog} [y_1] = 20,83 \text{ mgr/ml}$$

$$\text{Antilog} [y_2] = 6,38 \text{ mgr/ml}$$

Oscilación de la media:

$$\text{media} - \text{error de la media} = 34,51 \Rightarrow 10,3 \text{ mgr/ml}$$

$$\text{media} + \text{error de la media} = 37,75 \Rightarrow 13,1 \text{ mgr/ml}$$

11.3.- CALCULOS CLADOS

VIAL 1ALTERNARIA ALTERNATA

- ECUACION : (8) Producto de los distritos

conc.

N= 16
 MEDIA = 24,70
 VARIANZA = 212,78
 DESVIACION = 14,58
 ERROR DE LA MEDIA 3,646
 MAXIMO = 48,70
 MINIMO = 0

VIAL 2

N= 16
 MEDIA = 27,575
 VARIANZA = 182,89
 DESVIACION = 13,52
 ERROR DE LA MEDIA 3,380
 MAXIMO = 58,5
 MINIMO = 12

VIAL 3

N = 16
 MEDIA = 46,65
 VARIANZA = 1434,926
 DESVIACION = 37,880
 ERROR DE LA MEDIA 9,470
 MAXIMO = 168
 MINIMO = 0

Oscilación del 65% de los valores de la población

Antilog (y) = 416,86mg/ml

Antilog (y1) = 1549,84mg/ml

Antilog (y2) = 87,09mg/ml

Oscilación de la media:

media - error de la media = 14,58 mg/ml

11.3.- CALCULOS CLADOSPORIUM HERBARUM

- ECUACION : (X) Productos de los diámetros (mm²) versus log₃ conc.

$$\text{Intercept.} = -0,748$$

$$m. = 0,173$$

$$r. = 0,926 \quad (P < 0,001)$$

$$y = mx + b$$

$$\log_3 [y] = -0,748 + 0,173 (36,13) = 5,50$$

$$\log_3 [y_1] = -0,748 + 0,173 (44,31) = 6,91$$

$$\log_3 [y_2] = -0,748 + 0,173 (27,95) = 4,08$$

$$\log_{10} [y] = 5,50 \times \log_{10} [3] = 5,50 \times 0,4771 = 2,62$$

$$\log_{10} [y_1] = 6,91 \times \log_{10} [3] = 6,91 \times 0,4771 = 3,29$$

$$\log_{10} [y_2] = 4,08 \times \log_{10} [3] = 4,08 \times 0,4771 = 1,94$$

Oscilación del 68% de los valores de la población:

$$\text{Antilog} [y] = 416,86 \text{ mgr/ml}$$

$$\text{Antilog} [y_1] = 1949,84 \text{ mgr/ml}$$

$$\text{Antilog} [y_2] = 87,09 \text{ mgr/ml}$$

Oscilación de la media:

$$\text{media} - \text{error de la media} = 34,51 \Rightarrow 309,02 \text{ mgr/ml}$$

media + error de la media = 37,75 => 572,31mgr/ml

11.4.- CALCULOS ASPERGILLUS FUMIGATUS

Ecuación 1 (A) Producto de los datos de la muestra

VIAL 1

CLADOSPORIUM HERBARUM

Intercepto
N= 16
MEDIA = 11,294
VARIANZA = 75,93
DESVIACION = 8,713
ERROR DE LA MEDIA = 2,178
MAXIMO = 30
MINIMO = 0

VIAL 2

N= 16
MEDIA = 11,438
VARIANZA = 74,089
DESVIACION = 8,608
ERROR DE LA MEDIA = 2,151
MAXIMO = 31,5
MINIMO = 0

VIAL 3

N = 16
MEDIA = 22,531
VARIANZA = 96,389
DESVIACION = 9,818
ERROR DE LA MEDIA = 2,454
MAXIMO = 44
MINIMO = 10,5

Antilog (y1) = 547,55mgr/ml

Antilog (y11) = 3246,50mgr/ml

Antilog (y21) = 110,5mgr/ml

11.4.- CALCULOS ASPERGILLUS FUMIGATUS

- ECUACION : (X) Productos de los diámetros (mm²) versus log₃ conc.

$$\text{Intercept.} = -0,568$$

$$m. = 0,179$$

$$r. = 0,992 \quad (P < 0,001)$$

$$y = mx + b$$

$$\log_3 [y] = -0,568 + 0,179 (36,13) = 5,89$$

$$\log_3 [y_1] = -0,568 + 0,179 (44,31) = 7,36$$

$$\log_3 [y_2] = -0,568 + 0,179 (27,95) = 4,43$$

$$\log_{10} [y] = 5,89 \times \log_{10} [3] = 5,89 \times 0,4771 = 2,81$$

$$\log_{10} [y_1] = 7,36 \times \log_{10} [3] = 7,36 \times 0,4771 = 3,51$$

$$\log_{10} [y_2] = 4,43 \times \log_{10} [3] = 4,43 \times 0,4771 = 2,11$$

Oscilación del 68% de los valores de la población:

$$\text{Antilog } [y] = 645,65 \text{ mgr/ml}$$

$$\text{Antilog } [y_1] = 3246,80 \text{ mgr/ml}$$

$$\text{Antilog } [y_2] = 130,60 \text{ mgr/ml}$$

Oscilación de la media:

VIAL 1

N =
 MEDIA =
 VARIANZA =
 DESVIACION =
 ERROR DE LA MEDIA =
 MAXIMO =
 MINIMO =

media - error de la media = 34,51 => 469,63mgr/ml
 media + error de la media = 37,75 => 870,96mgr/ml

VIAL 2

N =
 MEDIA =
 VARIANZA =
 DESVIACION =
 ERROR DE LA MEDIA =
 MAXIMO =
 MINIMO =

VIAL 3

N =
 MEDIA =
 VARIANZA =
 DESVIACION =
 ERROR DE LA MEDIA =
 MAXIMO =
 MINIMO =

VIAL 1ASPERGILLUS FUMIGATUS

N=	9
MEDIA =	9,744
VARIANZA =	18,011
DESVIACION =	4,244
ERROR DE LA MEDIA =	1,414
MAXIMO =	16
MINIMO =	4

VIAL 2

N=	9
MEDIA =	12,5
VARIANZA =	66,889
DESVIACION =	8,179
ERROR DE LA MEDIA =	2,726
MAXIMO =	25
MINIMO =	0

VIAL 3

N =	9
MEDIA =	20,744
VARIANZA =	89,755
DESVIACION =	9,474
ERROR DE LA MEDIA =	3,158
MAXIMO =	42
MINIMO =	10,5

12.- DISCUSION.

La incidencia de enfermedades alérgicas no es muy elevada, habiendo acuerdo prácticamente unánime por parte de los autores (128,129).

Sin embargo, en cuanto a la responsabilidad atribuida a los hongos en procesos alérgicos hay discrepancias muy importantes, pues mientras algunos autores atribuyen el 24% (126), otros indican un 12.5% (74). En el presente de nuestro estudio hemos encontrado una incidencia del 10.7%.

Estamos conformes con Walling et al. (127) cuando señala que esa falta de acuerdo en la selección de antígenos fúngicos se ha debido a métodos diferentes por distintos investigadores. Lo que ha supuesto la preparación y estandarización de los alérgenos hace falta considerablemente, y, por tanto, no ha sido esta labor tan cuidadosa. Por otra parte, solamente muy pocas especies de hongos se han estudiado en detalle (38, 24, 15, 12, 11 y 64). La clasificación e identificación de los hongos ha sido bastante difícil hasta la realizada recientemente por Wilken-Jensen (131).

También Turkeltaub (130) opina que es una equivocación preparar los extractos fúngicos de forma similar a como se realizan otros extractos, fundamentalmente polínicos, ya que las esporas de los pólenes contienen proteínas muy distintas a las proteínas extraíbles.

12.- DISCUSION.

La incidencia de enfermedades alérgicas no es muy elevada, habiendo acuerdo prácticamete unanime por todos los autores (128,129).

Sin embargo, en cuanto a la responsabilidad etiológica de los hongos en procesos alérgicos, hay discordancias muy importantes, pues mientras algunos autores sitúan las cifras en un 2% (126), otros indican un 12,5% (74), e incluso un 86% (1). En nuestro estudio hemos encontrado una incidencia de un 20,57%.

Estamos conformes con Malling et all. (75,76,77,78 y 79), cuando señala que esa falta de acuerdo viene dada porque la selección de antígenos fúngicos se ha hecho de formas muy diferentes por distintos investigadores, lo que ha supuesto que la preparación y estandarización de los alergenos haya variado considerablemente, y, por tanto, no ha sido establecido de forma cuidadosa. Por otra parte, solamente muy pocas especies de hongos se han estudiado en detalle (38, 24, 15, 62, 63 y 64). Además la clasificación e identificación de los hongos ha sido realmente difícil hasta la realizada recientemente por Wilken-Jensen (135).

También Turkeltaub (130) opina que es una equivocación preparar los extractos fúngicos de forma similar a como se realiza otros extractos, fundamentalmente polínicos, ya que las membranas de los pólenes contienen muchas más proteínas extraíbles.

Otros autores, opinan que en la historia clínica de pacientes afectados de alergia a hongos no existen datos suficientemente fiables para poder establecer una orientación diagnóstica adecuada, por cuanto que las pruebas de Prick no corroboraron en muchos casos esa posibilidad diagnóstica (128,129,86).

Todas las afirmaciones anteriormente reseñadas nos permitieron elaborar nuestra Hipótesis de trabajo, partiendo de la base de que una detallada historia clínica, es sin duda elemento clave de cualquier diagnóstico. Con esta premisa, pensamos que la dificultad del diagnóstico podría no estar en la anamnesis, sino que podría hallarse relacionada con la estandarización de alergenitos, tal como opina Malling (77,78).

Por ello, y después de elaborar unos criterios de inclusión en un grupo de estudio de nuestros pacientes, objeto de este trabajo, seguimos en laboratorio especializado una pauta de estandarización de extractos alérgicos fúngicos (38), que serían acordes lógicamente con los datos recogidos en la historia clínica.

Cuando procedimos a la realización de pruebas Prick, con los referidos extractos alérgicos, pudimos comprobar que la positividad a los mismos mostraba una relación estadísticamente significativa con arreglo a los controles, lo cual corroboraba aquellas afirmaciones de diversos autores en el sentido de la necesidad de una estandarización mucho más precisa para el diagnóstico de la alergia a hongos (2,12,24,78)

Respecto a los otros parámetros estudiados hemos de señalar que aunque distintos autores no indican diferencia de sexos en la alergia a hongos (45), nosotros hemos hallado un mayor porcentaje de hombres sobre mujeres en una proporción de 1,8 a 1. Siendo los límites de edad entre 16 y 41 años.

En lo que se refiere a antecedentes familiares, estamos de acuerdo con diferentes autores lo mismo que ocurre con las manifestaciones clínicas de presentación teniendo en cuenta la alta incidencia de rinitis, un 50% (94,95)

Así mismo nos llama la atención el elevado porcentaje de pacientes que presentaban algún tipo de alteración en la mucosa nasal, un 71%.

En cuanto a los hallazgos analíticos, nuestros datos concuerdan con los de otros autores, sobre todo, la eusinofilia en el moco nasal en la clasificación que realizamos según la consideremos leve, moderada o acusada (116)

Los niveles séricos de IgE se hallan de forma constantemente elevados en nuestros pacientes. Los valores de IgE sérica se hallan comprendidos entre límites muy amplios, pero a pesar de ello, y dado por una parte la elevación generalizada, y por otra el hecho que algunos de los enfermos padecen procesos alérgicos concomitantes con los hongos (20,25), nos permite afirmar la poca discriminación de la IgE en el diagnóstico etiológico de estos procesos.

El porcentaje de alteraciones radiológicas observadas

en los senos es paralelo a la frecuencia de rinitis, tal como se indica en los trabajos de Mygind (95).

Respecto a las pruebas de función pulmonar en nuestro estudio no entramos en consideraciones más importantes ya que se realizaron cuando los pacientes habían superado el cuadro agudo, aunque lógicamente corroboramos lo señalado en diversos trabajos (74,111,128).

Por último, creemos que las pruebas de provocación, nos permiten un gran apoyo a la hora de llegar al diagnóstico correcto de alergia a hongos, tal como está contemplado en recientes observaciones (76,77,78,120).

A modo de resumen, y contemplando los hallazgos de nuestro estudio a la luz de los trabajos de la literatura, creemos que la alergia a hongos constituye un capítulo cada vez más importante, y que requiere sin duda un correcto diagnóstico, para el cual, es absolutamente necesario no sólo una historia clínica completa, sino también y además de la exploración física, un pertinente estudio alergológico que requiere para ser válido nuevas y modernas técnicas de estandarización que deben ser empleadas en el futuro.

13.- CONCLUSIONES.

1.-La incidencia de alergia a hongos en el estudio es del 20,57% y de ellos los cuadros más representativos son la rinitis con un 50% y el asma que representa el 33%.

2.-Es necesario realizar estudios prospectivos, amplios, dada la diversidad porcentual en la incidencia de alergia a hongos, de distintos tipos.

3.-Un porcentaje alto de nuestros pacientes son afectados, además de alergia a hongos, de sensibilización a otros alérgenos.

4.-La alteración sérica de IgE es discriminatoria a la hora de establecer un diagnóstico de alergia a hongos.

XIII.- CONCLUSIONES

5.-Una historia clínica completa es fundamental en la relación a la responsabilidad etiológica de los síntomas en el cuadro alérgico.

6.-En los pacientes afectados de rinitis existe una buena correlación entre la clínica, Prick Test y prueba de provocación nasal.

7.-Las técnicas habituales de preparación de extractos alérgicos fúngicos realizadas hasta ahora no son suficientes para poder llevar a cabo un diagnóstico preciso, por lo que insistimos en la necesidad de una futura estandarización en el futuro.

8.-La alergia a hongos por sí sola no puede ser diagnosticada con una historia clínica detallada, seguida de una exploración

13.- CONCLUSIONES.

1.-La incidencia de alergia a hongos en nuestro medios es del 20,57% y de ellos los cuadros más frecuentes son la Rinitis con un 50% y el Asma que representa un 28,5%.

2.-Es necesario realizar estudios prospectivos más amplios, dada la diversidad porcentual, en cuanto a la incidencia de alergia a hongos, de distintos autores.

3.-Un porcentaje alto de nuestros pacientes se hallan afectados, además de alergia a hongos a sensibilización por otros alérgenos.

4.-La alteración sérica de IgE no resulta discriminativa a la hora de establecer un diagnóstico por alergia a hongos.

5.-Una historia clínica completa es muy orientativa en relación a la responsabilidad etiológica de los hongos en el cuadro alérgico.

6.-En los pacientes afectados de Rinitis existe una buena correlación entre la clínica, Prick Test y pruebas de provocación nasal.

7.-Las técnicas habituales de preparación de extractos alérgicos fúngicos realizadas hasta ahora no son suficientes para poder llevar a cabo un diagnóstico etiológico correcto, por lo que insistimos en la necesidad de una adecuada estandarización en el futuro.

8.-La alergia a hongos por tanto, requiere una historia clínica detallada, seguida de una exploración

física y complementada por estudios de Prick Test realizados tras adecuada estandarización de extractos alérgicos y seguida de pruebas de provocación efectuadas con los citados alergenosen. Aunque consideramos que es suficiente para llegar a un diagnóstico correcto, la complementación de otras técnicas inmunológicas que pueden constituir una ayuda incuestionable.

1. AAS, K., LEEGAARD, J., AUKRUST, L. Hypersensitivity to common moulds. A comparison of different diagnostic materials. *Allergy* 35:130-137, 1980.
2. AAS, K., BACKMAN, A., BELIN, L., WICK, P. Standardization of Allergen Extracts with appropriate methods. *Allergy* 33:130-137, 1978.
3. AAS, K., LEEGAARD, J., AUKRUST, L., GRIMMER, J. Hypersensitivity to Common Moulds. *Allergy* 35:443-451, 1980.
4. AGARWAL, M. K., JONES, E. T., YOUNG, J. W. Allergenic and antigenic determinants of *Alternaria* and *Staphyllum* extracts. *Journal of Allergy and Immunology* 70: 437-441, 1982.

XIV.- BIBLIOGRAFIA.

5. AGARWAL, M. K., SWANSON, M.C., REED, C.F. Immunological quantitation of airborne short ranged allergens: antigen E, and Alt-I allergens: A laboratory study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 73:40-47, 1984.
6. AGARWAL, M.K., JONES, E.T., YOUNGER, J.W. Immunological and physicochemical characterization of *Alternaria* extracts: a model for standardization of mould allergen extracts. *Allergy and Clinical Immunology* 70:432-436, 1982.
7. AGRELL, B., FOUCARD, T., BJELLMAN, M., NILSSON, S. Double-blind, Multicenter, immunotherapy trial in children, using a purified and standardized *Cladosporium Herbarum* Fries extract. *Allergy* 41: 131-140, 1986.
8. AL-DOORY, Y., DOMSON, J.F. 1983. *Mould Allergy*. Lea & Febiger, Philadelphia.
9. AL-DOORY, Y., DOMSON, J.F. 1984. *Mould Allergy*. Lea & Febiger, Philadelphia.

- 1.0 AAS, K. LEEGARD, J. AUKRUST, L. Immediate-type hypersensitivity to common moulds. A comparison of different diagnostic materials. Allergy 35:443-451. 1980.
- 2.1 AAS, K. BACKMAN, A. BELIN, L. WEEKE, E. Standardization of Allergen Extracts with Appropriated methods. Allergy 33:130-137. 1979.
- 3.2 AAS, K. LEEGAARD, J. AUKRUST, L. GRIMMER. Immediate type hypersensitivity to Common Moulds. Allergy 55:443-451. 1980.
- 4 AGARWAL, M. K. JONES, R. T. YUNGINGER, J. W. Shared allergenic and antigenic determinants in Alternaria and Stenphylium extracts Journal Allergy and Clinical Immunology 70: 437-444 1.982.
- 5.4 AGARWAL, M. K. SWANSON, M.C. REED, C.E. Immunochemical quantitation of airborne short ragweed, alternaria, antigen E., and Alt-I allergens: A two-year prospectiv estudy. J. Allergy Clin. Immunol. 72:40-45. 1983.
- 6 AGARWAL, M.K. JONES, R.T. YUGINGER, J.W. Immunochemical and physicochemical characterization of commercial Alternaria extracts: a model for standardization of mould allergen extracts. Allergy and Clinical Immunology 70:432-436. 1982.
- 7 AGRELL, B. FOUCARD, T. KJELLMAN, M. NILSSON, S. Double-blind, Multicenter, immunotherapy trial in children, using a purified and standardized Cladosporium Herbarum Prep aration. Allergy 41: 131-140 1.986
- 8 AL-DOORY, Y. DOMSON, J.F. 1983 MOULD ALLERGY.1, Philadelphia, LEA&FEBIGER.
- 9 AT-DOORY, Y. DOMSON, J.F. Mould allergy. Lea 8 Febiger. Philadelphia. 1984.

- 20 BRUCE, C.A. NORMAN, P.S. ROSENTHAL, S. The role of ragweed pollen in autumnal asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 59:449-459. 1977.
- 21 BUDD, T.W. The isolation of a unique allergen from *Cladosporium* Herbarum. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 58: 375-390 1979.
- 10 AUKRUST, L. Crossed radioimmuno-electrophoretic studies of distinct allergens in two extracts of *Cladosporium Herbarum*. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 58: 375-390 1979.
- 22 BUDD, T.W. XUO, C.Y. YOO, T.J. MCKENNA, W.A. *Antigens of Alternaria Allergy and Immunology* 1979.
- 11 AUKRUST, L. Immunological techniques in allergen characterization and purification. Thesis. Universidad of Oslo. 1979.
- 23 BURGE, R.D. SOLOMON, W.R. MULLERBERG, S.L. *Indoor plantings as allergen sources* 1979.
- 12 AUKRUST, L. ALMELAND, T.L. AAS, K. STERINGER, I. BOKELUND, G. Partial purification and characterization of allergen and quantification of this allergen in 8 strain of *alternaria alternata*. *Journal Allergy* 37. 1:36. 1982.
- 24
- 13 AUKRUST, L. BORCH, S. M. Cross reactiviti of moulds. *Allergy* 40: 57-60 1.985.
- 14 AUKRUST, L. DORCH, S. M. EINEARSSON, R. Mould Allergy-Spores and mycelium as Allergen sources. *Allergy* 40: 43-48 1.985.
- 26
- 15 AUKRUST, L. BORCH, S.M. Partial purification and characterization of two *Cladosporium Herbarum* Allergens. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 60:68-79. 1979.
- 27
- 16 AVENBERG, K. M. HARPER, D.S. LARSSON, B. L. Foot notes on allergy. Uppsala. Pharmacia. 1-103. 1980.
- 17 BEAUMONT, F. KAUFFMAN, H.F. DE MONCHX, J.G.R. SLUITER, H.J. DE VRIES, K. Volumetric aerobiological survey of conidial fungi in the north-east *Allergy* 40:181-186. 1985.
- 18 BELIN, L. Health problems by actinomycetes and moulds in industrial enviroment. *Allergy* 40, 3:24. 1985.
- 19 BENDIXEN, G. WEEKE, E. Micro-fungal Allergy *Allergy* 34:131-133. 1979.

- 20 BRUCE, C.A. NORMAN, P.S. ROSENTHAL, R.R. The role of ragweed pollen in autumnal asthma. J. Allergy Clin. Immunol. 59:449-459. 1977.
- 21 BUDD, T.W. The isolation of a unique basic peptide allergen from alternaria extracts. J. Allergy Clin. Immunol. 69, 145. 1981.
- 22 BUDD, T.W. KUO, C.Y. YOO, T.J. MCKENNA, W.R. CAZIN, J. Antigens of Alternaria Allergy and Clinical Immunology 71:277-282. 1983.
- 23 BURGE, H.D. SOLOMON, W.R. MUILENBERG, M.L. Evaluation on indoor plantings as allergen exposure sources. J. Allergy Clin. Immunol. 70:101-108. 1982.
- 24 BUSH, R. K. YUNGUINGER, J. W. Standardization of Fungal Allergens. Clin. Rev. Allergy 5: 3-21 1.987.
- 25 BUSH, R.K. BEDARD, R.M. PETRY, R. Correlation of allergic symptoms with ragweed pollen and alternaria spore Burdeus. Ner. Allergy Proc. Abstrac. 5:151 1984.
- 26 BUSH, R.K. VOSS, M.J. JONES, J. FLAHERTY, D.K. Immunological studies on Alternaria sensitivity use of crossed radioimmuno-electrophoresis, precipitins and enzyme-linked immunosorbent assay. Clinical Allergy 12:29-36. 1982.
- 27 BUTCHER, B.T. Findings suggestings that anti-fungal antibodies may play a role in the etiology of cotton dust induce lung disease, in Foucard. Dreborg (eds): Mould Allergy Worksshop. Uppsala Pharmacia. 91-96
- 28 CALVO, M. A. GUARRO, J. SUAREZ, G. Micoflora atmosférica de Barcelona. Allergology et Immunopathology 9: 21-28 1.981.
- 39 DOMSCH, GAMS. Fungi in agricultural soil. Allergy 6:209. 1976.
- 40 DOMSCH, GAMS and ANDERSON. Complete de... Vol. I, 1980

- 41 DUCE GRACIA, F. BELLO, PRONDA, S. VILAJUSTRIBO, M. REZUSTRA, A. RUBIO, R.C. Hiperresponsibilidad inmediata.
- 29 CALVO, M. A. GUARRO, J. SUAREZ, G. Algunas consideraciones sobre la elaboración de un calendario micológico de la ciudad de Barcelona. Revista Clínica Española 162: 263-264 1.981.
- 42 FOUCARD, P. CRABBE, J. Hould allergy workshop. Uppsala. Pharmacia. 1984.
- 30 CALVO, M. A. GUARRO, J. VICENTE, E. SUAREZ, G. Estudio comparativo de la micoflora atmosférica de dos ciudades del área mediterránea. Revista Clínica Española 151: 203-206 1.978.
- 43 1.987.
- 31 CALVO, M.A. GUARRO, J. SUAREZ, G. RAMIREZ, C. Airborne fungi in the air of Barcelona. Mycopathologia 71:119-123. 1980.
- 44
- 32 CALVO, M.A. GUARRO, J. SUAREZ, G. RAMIREZ, C. Airborne fungi in Barcelona City Mycopathologia 71:89-93. 1980.
- nuestra región. Estudio de 4 meses. Revista Española de Alergología e Inmunología Clínica 1:177. 1984.
- 33 CARBALLO, M. MIGUEL, J. A. Microflora y mohos toxígeno en trigo. Revista Ibérica de Micología 2: 119-125 1.985.
- 46 La Medicina en el Futuro. Historia Universal de la Medicina. Entralgo. 1972.
- 34 CHUNG, C.W. NICKERSON, W.J. Polysaccharide Syntheses in Growing Yeasts. Journal of Biological Chemistry 208:395-406. 1954.
- 47 Allergy 34:135. 1972.
- 35 CLAVO, M. A. GUARRO, J. SUAREZ, G. RAMIREZ, C. Air-Borne fungi in the air if Barcelona (Spain). III. The genus Aspergillus Link. Mycopathologia 71: 41-43 1.980.
- 48 652. 1984.
- 36 COLE, R.J. Mycotoxins produced by aspergillus fumigatus species isolated from moulded silage. J. Agric. Food. Chem. 25:826. 1977.
- 37 DELAMAY, A. Microbiologia de 1914 a 1960. Historia Universal de la Medicina VI:172-173. Pedro lain Entralgo 1975.
- de Alergología e Inmunología Clínica. 1:155. 1986
- 38 DERBORG, S. EINARSSON, R. LONGBOTTOM, S.L. The chemistry and standardization of allergens. Immunochemistry 1:1-28. 1986.
- 51 de los factores climáticos sobre la concentración de esporas de hongos atmosféricos.
- 39 DOMSCH. GAMS. Fungi in agricultural soil. Clin. Allergy 6:209. 1976.
- 52 GUNOWSKI, E. LECH, B. CHAYK, J. 1981.
- 40 DOMSCH, GAMS and ANDERSON. Compendium of soil fungi. Vol. I, 1980
- 59:48-51. 1987.

- 41 DUCE GRACIA, F. BELLO DRONDA, S. VILAJUSTRIBO, M. REZUSTRA, A. RUBIO, M.C. Hipersensibilidad inmediata en Zaragoza (España). Allergology et Immunopathology 14.2: 101-106 1986.
- 42 FOUCARD, T. DREBORG, S. Mould allergy workshop. Uppasla. Pharmacia. 1984.
- 43 GALLEGRO, E. HONRUBIA, M. Hongos polinícolas. Nota I. Introducción. Revista Ibérica de micología 4: 41-44 1.987.
- 44 GARCÍA ORTEGA, M.P. LO FUNDAMENTAL EN ALERGIA, 1, Madrid, DOYMA. 1972.
- 45 GARCIA, E. GARCIA MARCOS, L. BARBERO, P. GONZALEZ, M. BELTRAN, R. Epidemiología de la alérgia a hongos en nuestra región. Estudio de 4 meses. Revista Española de Alergología e Inmunología Clínica. 1:157. 1986.
- 46 GHALIONNGHI, P. La Medicina en el Egipto Faraónico. Historia Universal de la Medicina. I-104. Pedro Lain Entralgo. 1972.
- 47 GRAVESEN, S. Fungi as a cause of allergic disease. Allergy 34:135. 1972.
- 48 GREENBERGER, P.A. Allergic bronchopulmonary aspergillosis Allergy and Clinical Immunology 74:645-652. 1984.
- 49 GREENBERGER, P.A. PATTERSON, R. Diagnosis and management of allergic bronchopulmonary aspergillosis. Annals of Allergy 56:444-448. 1986.
- 50 GUARDIA, P. GUTIERREZ CRUZ. ORTA CUEVAS, J.C. CHAPARRO, A. DAZA, J.C. CONDE HERNANDEZ, J. Aportación al mapa aeromicológico de Sevilla. Revista Española de Alergología e Inmunología Clínica. 1:155. 1986.
- 51 GUARDIA, P. GUTIERREZ CRUZ. ORTA CUEVAS, J.C. CHAPARRO, A. DAZA, J.C. CONDE HERNANDEZ, J. Influencia de los factores climáticos sobre la concentración de esporas de hongos atmosféricos Revista Española de Alergología e Inmunología Clínica. 1:155. 1986.
- 52 GUMOWSKI, P. LECH, B. CHAVES, I. GIRAR, J.P. Chronic asthma and rhinitis due to Candida Albicans, Epidermophyton, and Trichophyton. Annals of Allergy 59:48-51. 1987.

- 62 KIM, S.J. CHAPARRAS, S.D. BROWN, T.F. KIMMELSON, M.S.
Characterization of Antigens from *Aspergillus fumigatus*
- 53 HARRIS, L.H. Experimental reproduction of respiratory
mould allergy. J. Allergy 12:279-289. 1941.
- 54 HOFFMAN, D.R. KOZAK, P.P. GUILLMAN, S.A. CUMMINS, L.H.
GALLUP, J. Isolation of spore specific Allergens from
Alternaria. Annals of Allergy 46:310-316. 1981.
- 55 HUARD, P. MING WONG. La Medicina China. El Imperio
medio, la medicina bajo las dinastias de los Sui
(589-617) y de los T'ang (618-907). Historia
Universal de la Medicina. I-176. Pedro Lain Entralgo.
1972.
- 65 KLAUSIERMEYER, W.B. BARDANA, E.F. HALE, C. G. GILBERT
Hypersensitivity to *alternaria* and *aspergillus*
- 56 INFANTE, F. DOMINGUEZ, E. RUIZ DE CLAVIJO, E. GALAN,
Incidence of *Alternaria* Nees ex Fries in dwellings of
Cordoba city. Allergology et Immunopathology 15:
221-224 1.987.
- 66 P. La medicina hipocritica. Historia Universal de la Medicina II:103. Pedro Lain Entralgo 1972.
- 57 JORES, A. Metodos actuales de enfermar. Historia
Universal de la Medicina. VII:139-144. Pedro Lain
Entralgo 1972.
- 67 Historia Universal de la Medicina. VII:139-144. Pedro
Lain Entralgo 1972.
- 58 KAGEN, S. KURUP, V.P. SOHNCE, P.G. Marijuana smoking
and fungal sensitization. J. Allergy Clin. Immunol.
71:389-393. 1983.
- 68 Kizantina. Historia Universal de la Medicina
III:21-24. Pedro Lain Entralgo 1972.
- 59 KAUFFMANN, H.F. VRIES, K. Antibodies against *Aspergillus*
Fumigatus. International Archives of Allergy and
Applied Immunology 62:256-275. 1980.
- 69 PENEZ, J. Concentración de esporas de *Aspergillus*
Zaragoza: Resultados previos por el método de
Kizantina. Historia Universal de la Medicina
III:21-24. Pedro Lain Entralgo 1972.
- 60 KAUFFMAN, H.F. VANDERHEIDE, S. VANDERLAAN, S. HOVENGA, H.
BEAUMONT, F. VRIES, K. Standardization of Allergenic
Extracts of *Aspergillus Fumigatus* International
Archives of Allergy and Applied Immunology
76:168-173. 1985.
- 70 International Textbook. 1. Wiley Medical Publications
- 61 KIEFER, T.A. KESARWALA, H.H. GREENBERGER, P.A.
SWEENEY, J.R. FISCHER, T.J. Allergy bronchopulmonary
Aspergillosis in a young child. Diagnostic
confirmation by serum IgE and IgG indices. Annals de
allergy 56:233-235. 1986.
- 72 LOBARDELO, M. GONZALEZ, R. DUFFO, J. GARCIA, F.
AYUSO, R. VENTAS, P. CORTES, S. CARRERA, J.
Evaluación de la actividad biológica y
composición alérgica de extractos de *Aspergillus*
Allergology et Immunopathology 14 1987

- 62 KIM, S.J. CHAPARRAS, S.D. BROWN, T.M. ANDERSON, M.C. Characterization of Antigens from *Aspergillus* American Review of Respiratory Disease 118:553-560. 1978.
- 63 KIM, S.J. CHAPARRAS, S.D. BUCKLEY, H.R. Characterization of Allergens from *Aspergillus Fumigatus*. American Review of Respiratory Disease 120:1305-1311. 1979.
- 64 KIM, S.J. CHAPARRAS, S.P. Characterization of Antigens from *Aspergillus Fumigatus*. American Review of Respiratory Disease 120:1297-1303. 1979.
- 65 KLAUSTERMEYER, W.B. BARDANA, E.F. HALE, C. Pulmonary hypersensitivity to alternaria and aspergillus in laker's asthma. Clin. Allergy 7:227-233. 1977.
- 66 LAIN ENTRALGO, P. La Medicina Hipocrática. Diagnóstico hipocrático, patología especial. Historia Universal de la Medicina II.103. Pedro lain Entralgo 1972.
- 67 LAIN ENTRALGO, P. Inmunoterapia e Inmunología. Historia Universal de la Medicina. VI:192-198. Pedro Lain Entralgo 1972.
- 68 LAIN ENTRALGO, P. GARCIA BALLESTER, L. Medicina Bizantina. Historia Universal de la Medicina III:21-24. Pedro lain Entralgo 1972.
- 69 LARRAZ, I. PORTILLO, J.R. DUCE, F. MAÑAS, A. PASCUAL, G. PEREZ, J. Concentración de esporas de hongos en Zaragoza: Resultados previos por el método Cour Revista Española de Alergología e Inmunología Clínica. 1:156. 1986.
- 70 LESSOF, M.H. LEE, T.H. KEMENY, D.M. 1987 Allergy: And International Textbook, 1, Wiley Medical Publication
- 71 LICORISH, K. NOVEY, H.S. KOZAK, P. Role of alternaria and penicilium spores in the pathogenesis of asthma. J. Allergy Clin. Immunol. 76:819-825. 1985.
- 72 LOBARDERO, M. GONZALEZ, R. DUFFORE, O. JUAN, F. AYUSO, R. VENTAS, P. CORTES, C. CARREIRA, J. Evaluación de la actividad biológica total y composición alérgica de extractos alérgicos. Allergology et Immunopathology 14: 189-198 1.986.

- 73 LONGBOTTOM, J.L. Allergy bronchopulmonary aspergillosis: Reactivity of IgE and IgG antibodies with antigenic components of *Aspergillus Fumigatus* (IgE/IgG antigen complexes) Allergy Clinical Immunology. 72:668-675. 1983.
- 74 LOPEZ, M. SALVAGGIO, J.E. Mould-sensitive asthma. Clin. Rev. Allergy 3:183-196. 1985.
- 75 MALLING, H. J. Diagnosis and Immunotherapy of Mould Allergy. Allergy 40: 354-362 1.985.
- 76 MALLING, H. J. DREBORG, S. WEEKE, B. Diagnosis and Immunotherapy of Mould Allergy. Allergy 41: 507-519 1986.
- 77 MALLING, H. J. DREBORG, S. WEEKE, B. Diagnosis and Immunotherapy of Mould Allergy. Allergy 41: 57-67 1.986.
- 78 MALLING, H. J. AGRELL, B. CRONER, S. DREBORG, S. FOUCARD, T. KJELLMAN, M. KOIVIKKO, A. ROTH, A. WEEKE, B. Diagnosis and immunotherapy of mould allergy. Allergy 40:108-114 1985.
- 79 MALLING, H. J. DREBORG, S. WEEKE, B. Diagnosis and immunotherapy of mould allergy Allergy 42:305-314. 1987.
- 80 MARTIN PEREZ, A. Inmunoterapia en el asma. Jano 3: 33-34. 1989.
- 81 MARTINEZ ALZAMORA, F. LOPEZ SERRANO, M. C. OJEDA CASAS, J.A. FIANDOR ROMAN, A. Sensibilización a hongos en asma. Revista española de Alergología e inmunología clínica. 1:154. 1986.
- 82 MARTINEZ, R. L. RUIZ, D. HUERTA, J. G. ESQUENAZE, A. ALVAREZ, M. T. Variación estacional de hongos productores de alergia en el sur de la ciudad de Allergology et Immunopathology 14: 43-48 1.986.
- 83 MARTORELL ARAGONES, A. SOLE JOVER, A. DIEZ DOMINGO, L.V. BELENGUER RODRIGO, M.J. SANZ ORTEGA, J. TORRO DOMENECH, M.I. Inmunoterapia en alergia a hongos Revista Española de Alergología e Inmunología clínica. 1:188-192. 1986.

- 84 METZER, W.J. HUNNINGHAKE, G.W. RICHESON, H.B. Late asthmatic response: inquiry into mechanisms and significance. Clin. Rev. Allergy 3:145-165. 1985.
- 85 MILES, R.M. PARKER, J.L. JONES, R.T. DAHLBERG, M.J.E. YUNGINGER, J.W. Studies on Alternaria allergens Allergy and Clinical Immunology 71:36-39. 1983.
- 86 MOHOVIC, J. GAMBALE, W. CROCE, J. Cutaneous positivity in patients with respiratory allergies to 42 allergenic extracts of airborne fungi isolated in Sao Paulo, Brazil. Allergologia et Immunopathologia 16:397-402. 1988.
- 87 MULLINS, J. HARVEY, R. SEATON, A. Sources and incidence of airborne aspergillus fumigatus. Clin. Allergy 6:209. 1976.
- 88 MULLINS, J. HUTCHESON, PATRICIA, S. SLAVIN, R.G. Aspergillus fumigatus spore concentration in outside air: cardiff and St. Louis compared. Clinical Allergy. 14:351-354. 1984.
- 89 MUÑOZ FERNANDEZ, M.A. ARANDA VIZCAINO, J.L. RODRIGUEZ RODRIGUEZ, M. GAITERO RIVADILLA, O. BUEN SANCHEZ, C. Detección de IgE específica frente a Ag de Alternaria Alternata aislado de la atmósfera de Madrid. Revista Española de Alergología e Inmunología Clínica 3. 2:11. 1983.
- 90 MUÑOZ FERNANDEZ, M.A. ARANDA VIZCAINO, J.L. RODRIGUEZ RODRIGUEZ, M. PUNZON, M.C. BUEN SANCHEZ, C. Géneros de hongos más frecuentes en la atmósfera de Madrid. Relación con las variables meteorológicas. Revista Española de Alergología e Inmunología Clínica 3. 2:61. 1988.
- 91 MUÑOZ FERNANDEZ, M.A. COMINO ALMENARA, L. RODRIGUEZ RODRIGUEZ, M. ARANDA VIZCAINO, J.L. DE BUEN SANCHEZ, C. Estudio de los hongos propagados por el aire en Madrid (capital) Revista Española de Alergología e Inmunología Clínica. 1:156. 1986.
- 92 MUÑOZ FERNANDEZ, M.A. RODRIGUEZ RODRIGUEZ, M. COMINO ALMENARA, L. ARANDA VIZCAINO, J.L. DE BUEN SANCHEZ, C. Estudio de la microflora intra y extradomiciliaria en sistemática de alergia a hongos. Revista Española de Alergología e Inmunología Clínica. 1:157. 1986.

- 93 MUÑOZ MARTINEZ, M.C. ALONSO LEBRERO, E. LASO BORREGO, M.T. RAMO MANCHEÑO, M.C. GONZALES PEREZ, J. Alergia a hongos en asma infantil. Revista Española de Alergología e Inmunología Clínica. 1:154. 1986.
- 94 MYDGYN, N. Essential allergy: and illustrated text for students and specialists, London. Blackwell Scientific Publications. 1986
- 95 MYGYND, N. Alergia nasal. Salvat editores 1988.
- 96 NOGALES MONCADA, M.T. DOMINGUEZ VILCHES, E. GALAN SOLDEVILLA, C. RUIZ DE CLAVIJO, E. Variación estacional del contenido en esporas de género alternaria Nees ex Fr. en el aire de la ciudad de Córdoba (España). Allergology et immunopathology 14.2: 115-119 1986.
- 97 NORDMO, M.S. WOLD, J.K. PAULSEN, B.S. AUKRUST, L. Purification and partial characterization of the Allergen Ag-54 from Cladosporium Herbarum. International Archives of Allergy and Applied Immunology 78:249-255. 1985.
- 98 NYHOLM, L. LOWENSTEIN, H. YUNGINGER, J.W. Immunochemical identity between two independently identifiical and isolated mayor allergens from alternaria alternata. J. Allergy Clin. Immunol. 71.461. 1983.
- 99 ORTIZ MASLLORENS, F. Inmunologia. Historia Universal de la Medicina VII:172-182. Pedro Lain Entralgo 1972.
- 100 PAGEL, W. Contribución de Von helmont, relativas a enfermedades concretas. Asma y Alergia (1579-1644). Historia Universal de la Medicina IV:272. Pedro lain Entralgo 1975.
- 101 PENNINGTON, E.S. A study of clinical sensitivity to airborne mould. J. Allergy 12:388-404. 1941.
- 102 PIECHURA, J.E. HUANG CAECILIA, J. COHEN, S.H. KIDD, J.M. KURUP, V.P. CALVANICO, N.J. Antigens of Aspergillus Fumigatus: Electrophoretic and Clinical Studies. Immunology 49:657-665. 1983.
- 103 PIÑERO LOPEZ, J.M. Europa Latina. Patología y Clínica en el Romanticismo. Historia Universal de la Medicina V:262-268. Pedro Lain Entralgo 1972.

- 115 SANTILLI, J. ROCKWELL, W.J. COLLINS, A.B. *Aspergillus micaceus, Fuligo septica, and Alternaria alternata* spores allergy: highly reactive allergens.
- 104 PORNEY, J. CHAMPMAN, J. BURGE, H. MUILEMBERG, M. Epicoccum allergy: skin reaction patterns and spore/mycelium disparities recognized by IgG and IgE ELISA inhibition. *Annals of Allergy* 59:39-43. 1987.
- 116
- 105 PUIG SANZ, L. Alternarosis Humanas. *Revista Ibérica de Micología* 1: 57-67 1.984.
- 117
- 106 QUINDOS, G. PONTOS, J. CISTERNA, R. Efecto de los antifungicos sobre la respuesta del inmune. *Revista Ibérica de Micología* 3:47-59 1.986
- 118
- 119 SHAWIN, R.G. HUTCHESON, P.S. KNUTSEN, A.P. *Parasitoides* *collared* mediated.
- 107 RICKETTI, A.J. GREENBERGER, P.A. PATTERSON, R. Immediate-type reactions in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis *Allergy and clinical immunology* 71:541-545. 1983.
- 118
- 108 RIJCKAERT, G. BROERS, J.L.V. Time dependent release of Allergens from some Xophilic fungi *Allergy* 35:679-682. 1980.
- 119
- 109 RUFFER, M.A. The palaeopathology of Ancien Egypt The Chicago. Univ. Press. 1921.
- 120
- 121
- 110 SALVA MIQUEL, J.A. Tecnicas farmacoterapéuticas. (Medicación antialérgica). *Historia Universal de la Medicina VII*:244-245. Pedro Lain Entralgo 1975.
- 122
- 123
- 111 SALVAGGIO, J. AUKRUST, L. Mould-induced asthma. *Journal Allergy and Clinical Immunology* 68: 327-346 1.981
- 124
- 112 SALVAGGIO, J. SEABURY, J. SCHOENHARDT, E. New Orleans asthma V. relationship between Charity Hospital Asthma admission rates, semiquantitative pollen and fungal s pore counts, and total particulate aerometric sampling data. *J. Allergy Clin. Immunol.* 48:96-114. 1971.
- 125
- 126
- 113 SAMTER, M. Excerpts from classics in Allergy. Columbus. Ross Laboratories. 1969.
- 127
- 128
- 114 SAN MARTIN BREA, C. Concentración de polen y esporas de hongos en Santiago de Compostela (1986-1987). Estudio estacional. *Revista Española de Alergología e Inmunología Clínica* 3. 2:77. 1988.
- 129
- 130
- 131
- 132
- 133
- 134
- 135
- 136
- 137
- 138
- 139
- 140
- 141
- 142
- 143
- 144
- 145
- 146
- 147
- 148
- 149
- 150
- 151
- 152
- 153
- 154
- 155
- 156
- 157
- 158
- 159
- 160
- 161
- 162
- 163
- 164
- 165
- 166
- 167
- 168
- 169
- 170
- 171
- 172
- 173
- 174
- 175
- 176
- 177
- 178
- 179
- 180
- 181
- 182
- 183
- 184
- 185
- 186
- 187
- 188
- 189
- 190
- 191
- 192
- 193
- 194
- 195
- 196
- 197
- 198
- 199
- 200

- 115 SANTILLI, J. ROCKWELL, W.J. COLLINS, R.B. Copriuns micaceus, fuligo septica, and alternaria alternata spore allergy in highly ragweed-sensitive subjects. J. Allergy Clin. Immunol. 75:118. 1985
- 116 SERRA, J. Rinitis y asma. Jano 3: 15-23. 1989.
- 117 SHAW, A.F.B. J. Path. Bact. 47:115 1938.
- 118 SIGERIST, M.S. Primitive and Archaic Medicine. New York 1967.
- 119 SLAVIN, R.G. HUTCHESON, P.S. KNUTSEN, A.P. Participation of Cell-mediated Immunity in Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. International Archives of Allergy and Applied Immunology 83:337-340. 1987.
- 120 SOLE, A. MARTORELL, A. MICHAVILA, A. CERDA, J.C. DIAZ, C. ALVAREZ, V. DAMIA, A. Estudio del test de provocación bronquial con alternaria en el diagnóstico del asma infantil: sensibilidad, especificidad, Allergologia et Immunopathologia 14:303-309. 1986.
- 121 SOLOMON, W.R. Fungus aerosols arising from cold-mist vaporizers. J. Allergy Clin. Immunol. 54:222-228.
- 122 SWARD, M. ALMELANO, T. L. AUKRUST, L. Variability in different strains of Cladosporium Herbarum with special attention to carbohydrates and contents of two important allergens (Ag-32 and Ag-54). Allergy 39: 387-394 1.984.
- 123 SWARD, M. WOLD, J.K. SMESTAD, B. AUKRUST, L. Purification and partial characterization of the allergen Ag54 from cladosporium herbarum. Int. Archs. Allergy Appl. Immunol. 78:249. 1985.
- 124 TARRAF, H. EKLADIUS, E. NASR, M. ELBOROLOSSY, H. The role of prevalent moulds causing asthma in Egypt. The European Respiratory Journal. Abstracts 8th Congress of SEP. 863s. 1013. 1989.
- 125 TAYLOR, G. WALKER, J. A detailed description of the astonishing achievement of Blackley in describing the cause of hay fever. Clinical Allergy 3:103-108. 1973.
- 126 THOMPSON, R.C. Assyrian medical text from the original in the British Museum. Londres. 1923.

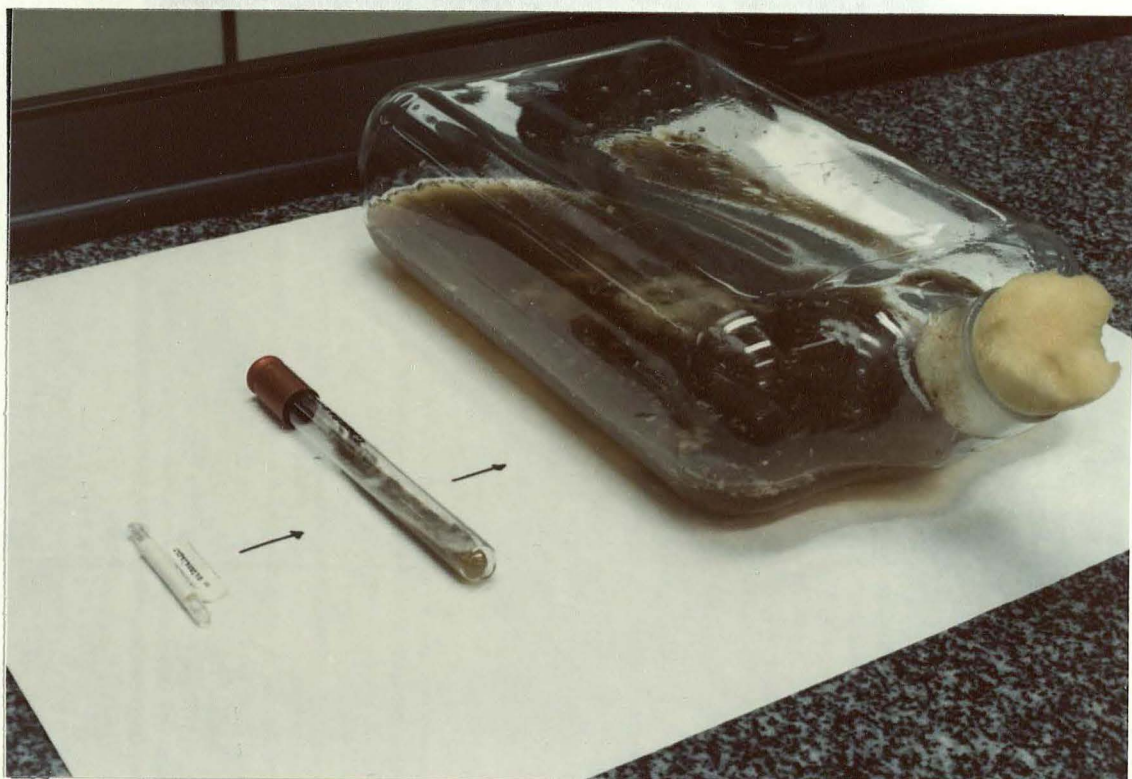
- 127 THOM, RAPER. Manual of the aspergilli. 1965.
- 128 TORRES RODRIGUEZ, J.M. Alergia a Hongos III. Ponencia. Congreso de la SEA e IC, Madrid 1986.
- 129 TORRES RODRIGUEZ, J.M. Hongos y patologia respiratoria en nuestro medio. Archivos de Bronconeumologia. 25:18-24. 1989.
- 130 TURKELTAUB, P.C. Biological standardization of Allergens Extracts. Allergologia et Immunopathologia 17:53-56. 1989.
- 131 VIJAY, H.M. HUANG, H. YOUNG, N.M. BERNSTEIN, I.L. Studies on Alternaria Alternata. International Archives of Allergy and Applied Immunology 74:256-261. 1984.
- 132 VIJAY, H.M. HUANG, H. YOUNG, N.H. BERNSTEIN, I.L. Studies on Alternaria Alternata. International Archives of Allergy and Applied Immunology 60:229-239. 1989.
- 133 VIJAY, H.M. YOUNG, N.M. BERNSTEIN, I.L. Studies on Alternaria Allergens. International Archives of Allergy and Applied Immunology 83:325-328. 1987.
- 134 WALLENBECK, I. AUKRUST, L. EINARSSON, R. Antigenic variability of different strains of aspergillus fumigatus. Int. Archs. Allergy Appl. Immunol. 73:166. 1984.
- 135 WILKERS, J. GRAVESEN, S. Atlas of moulds in Europe causing respiratory allergy. ASK. Publishing. 1984.
- 136 YAMAZAKI, H. FUJIMOTO, H. Fumitremogin B, a tremogin toxin from aspergillus fumigatus. Tetrahedron Lett. 1:27 1975.
- 137 YUNGIGER, J. W. JONES, R. T. NESHEIM, M. E. ELLER, M. Studies of alternaria alternata. III. Isolation of a major allergenic fraction. J. Allergy. Clin. Immunol. 66,138. 1980.
- 138 ZARAGOZA, J.R. Medicina en los pueblos Mesopotámicos. Historia Universal de la Medicina I-78. Pedro Lain Entralgo 1972.

- 139 ZUGAZAGA, M.A. ANTEPARA, I. FERNANDEZ, J.C. Recuento de esporas de hongos de los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Helminthosporium* y *Ustilago* en la atmósfera de Bilbao. Revista Española de Alergología e Inmunología Clínica 3. 2:69. 1988.

124

XV.- ICONOGRAFIA.

Cepa liofilizada - Tipo de cepa de cultivo de tipo

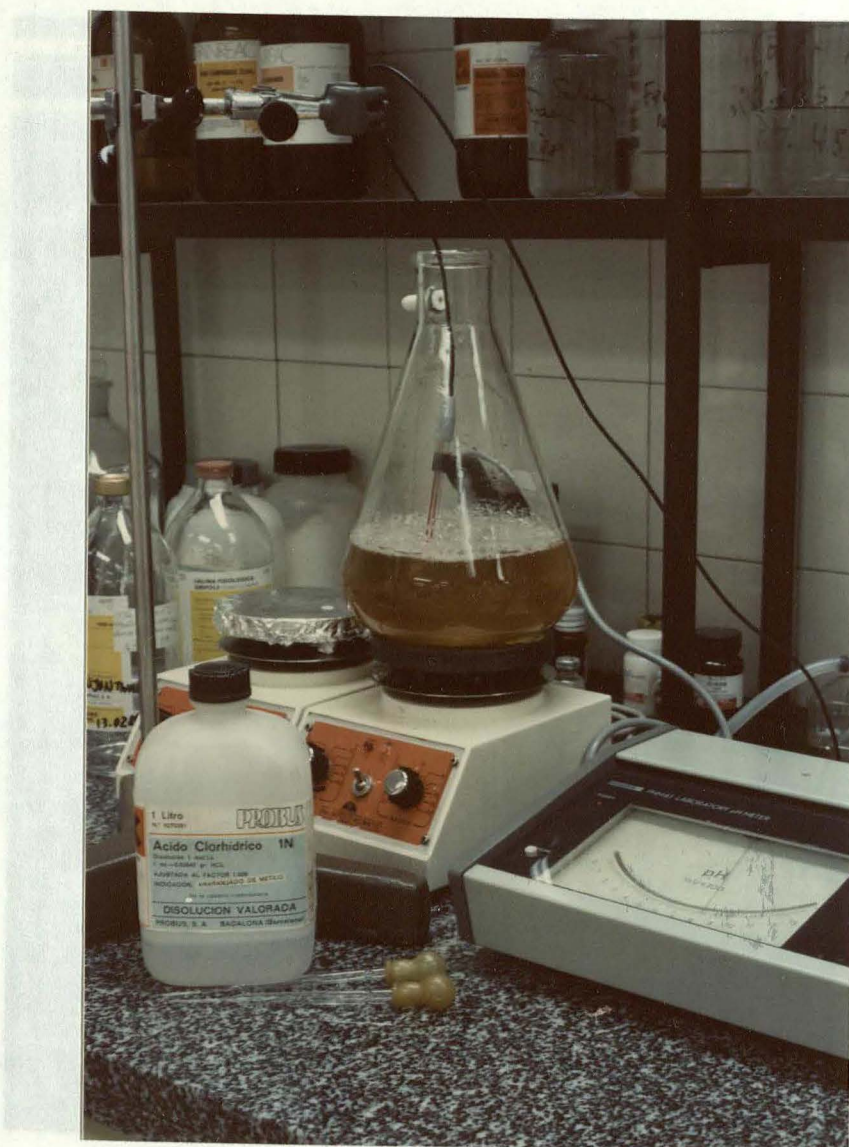
F O T O 1

Cepa liofilizada => Tubo de Slant => Matraz de Roux

Separación de Micelio y medio de cultivo.

F O T O 2

Separación de Micelio y medio de cultivo.

FOTO 3

Ajuste de pH a 3,0 - 3,5.

de acetona, a 4 - 5°C.

FOTO 4

Precipitación de antígenos metabólicos con 4 volúmenes de acetona, a 4 - 8°C.

FOTO 5

Decantado de la Acetona con los componentes no precipitados.

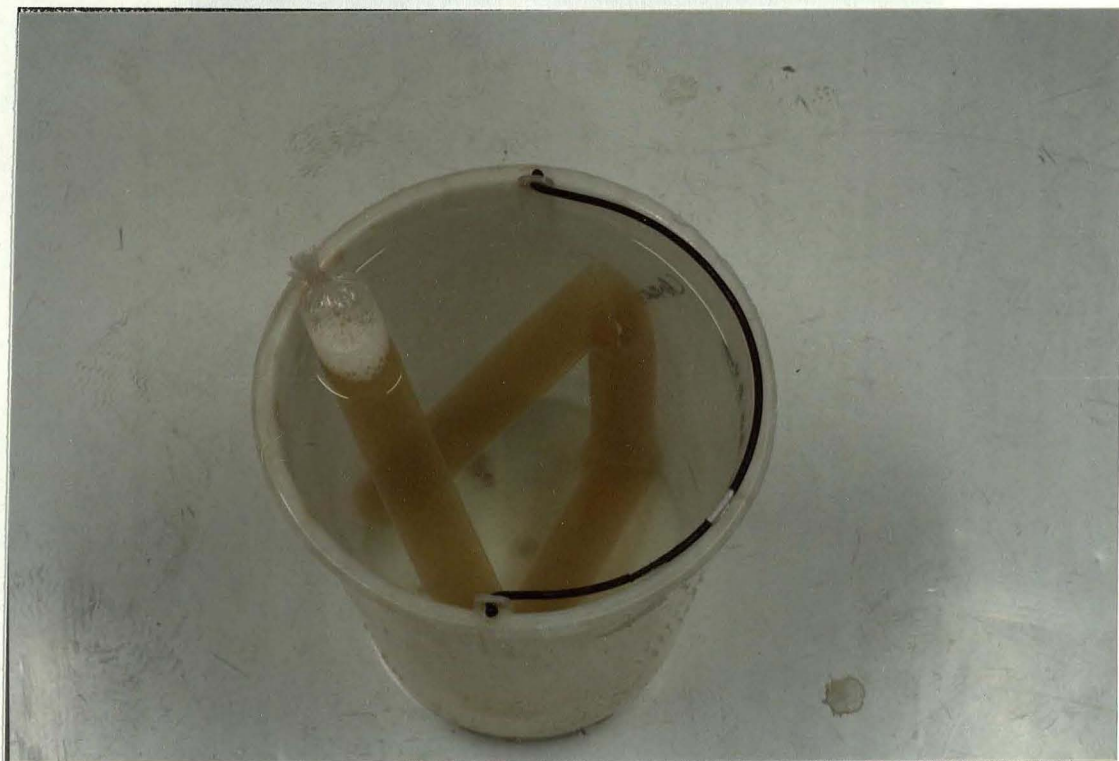
F O T O 6

Redisolución de los antígenos metabólicos precipitados, por agitación magnética en líquido de Coca.

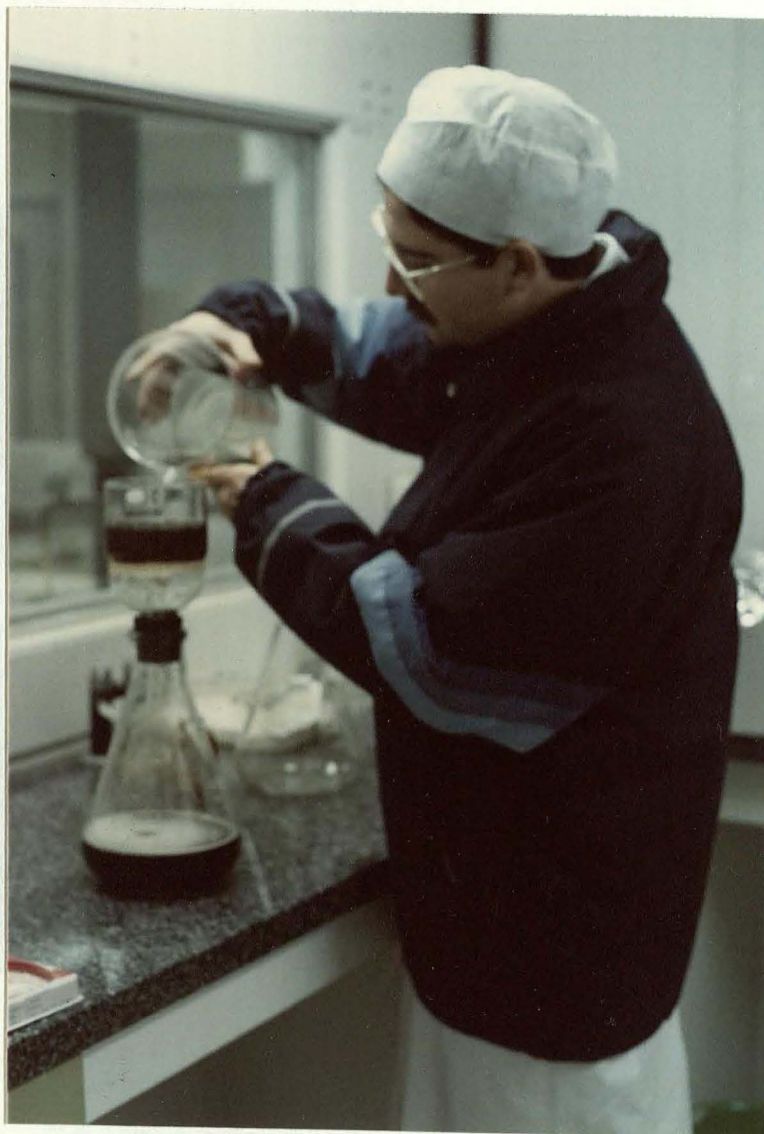
F O T O 7

Calentamiento del extracto durante 20 minutos a 70°C
para desnaturalización de Celulasas.

F O T O 8



Filtración por 0.22 micras del suero
Diálisis frente a agua de inyección.

F O T O 9

Filtración por 0,22 micras del dializado.

F O T O 10

Alicuotado para congelación.

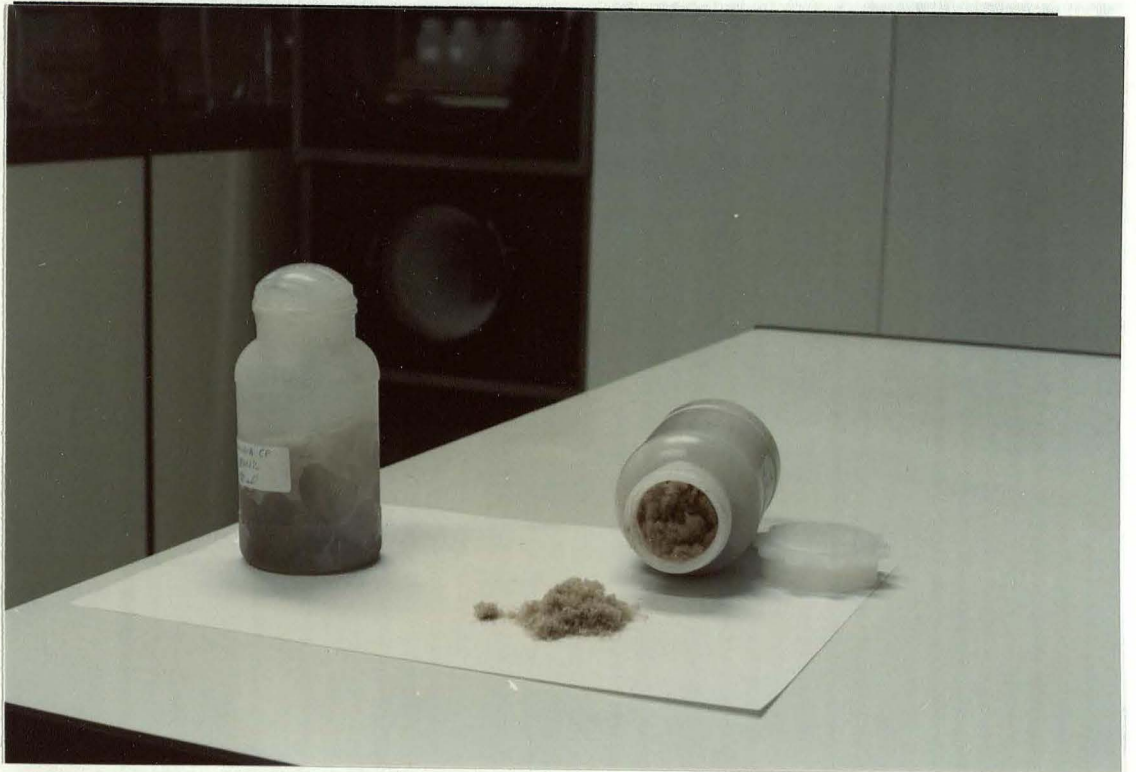
Consul-12.

F O T O 11

Liofilización en Liofilizador VIRTIS, Modelo Consul-12.

Extracto antes y después de liofilizar.

F O T O 12



Control-identificación de cultivo: *Alternaria alternata*.
cópico de *Alternaria alternata*.

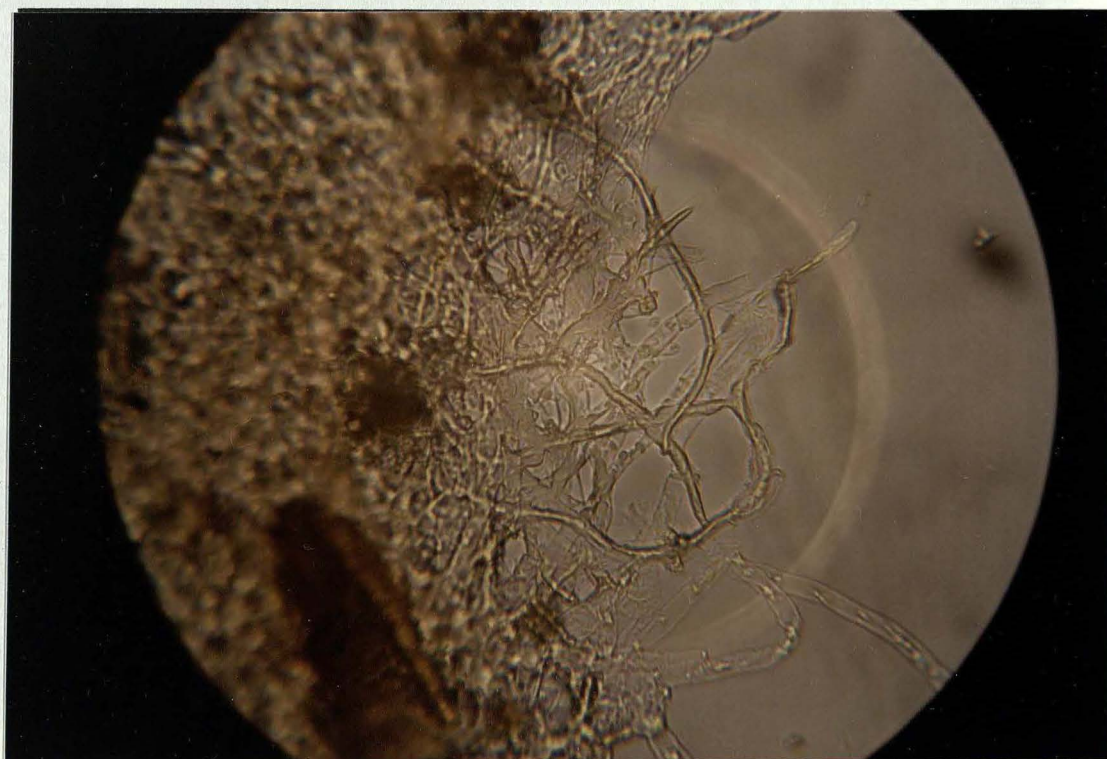
Extracto antes y después de liofilizar.

F O T O 13

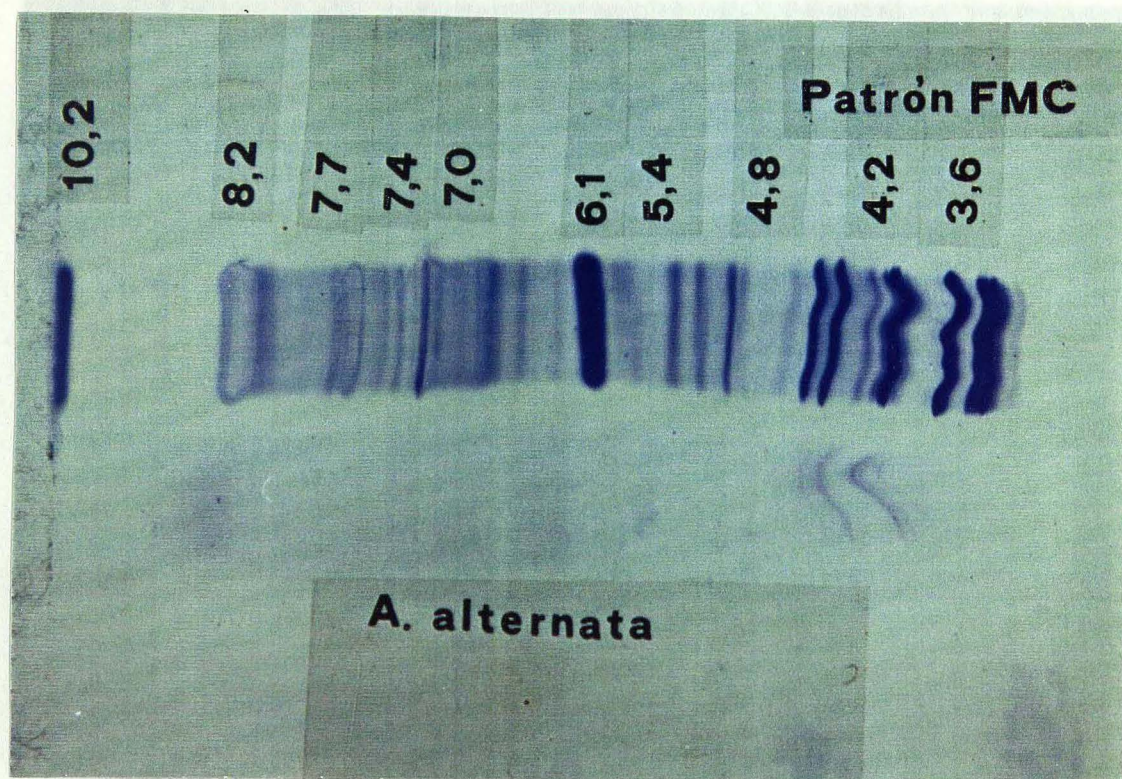


Control-identificación de cultivo: Observación microscópica de *Alternaria Alternata*.

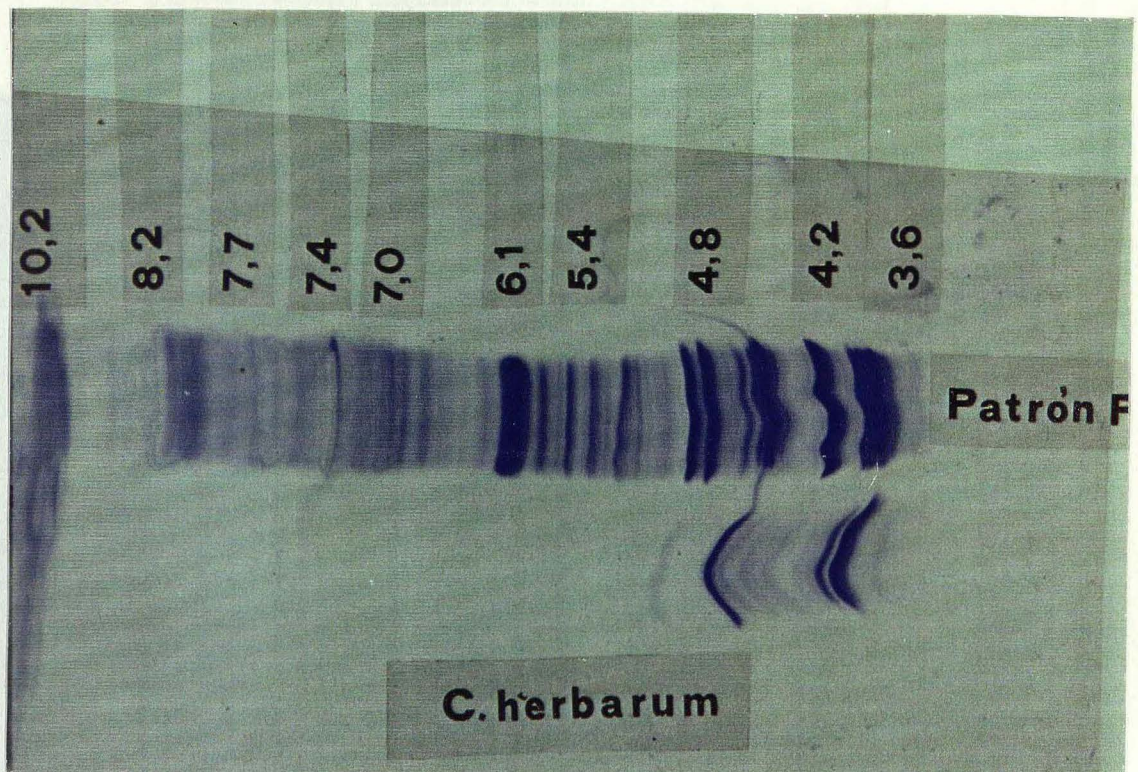
F O T O 14



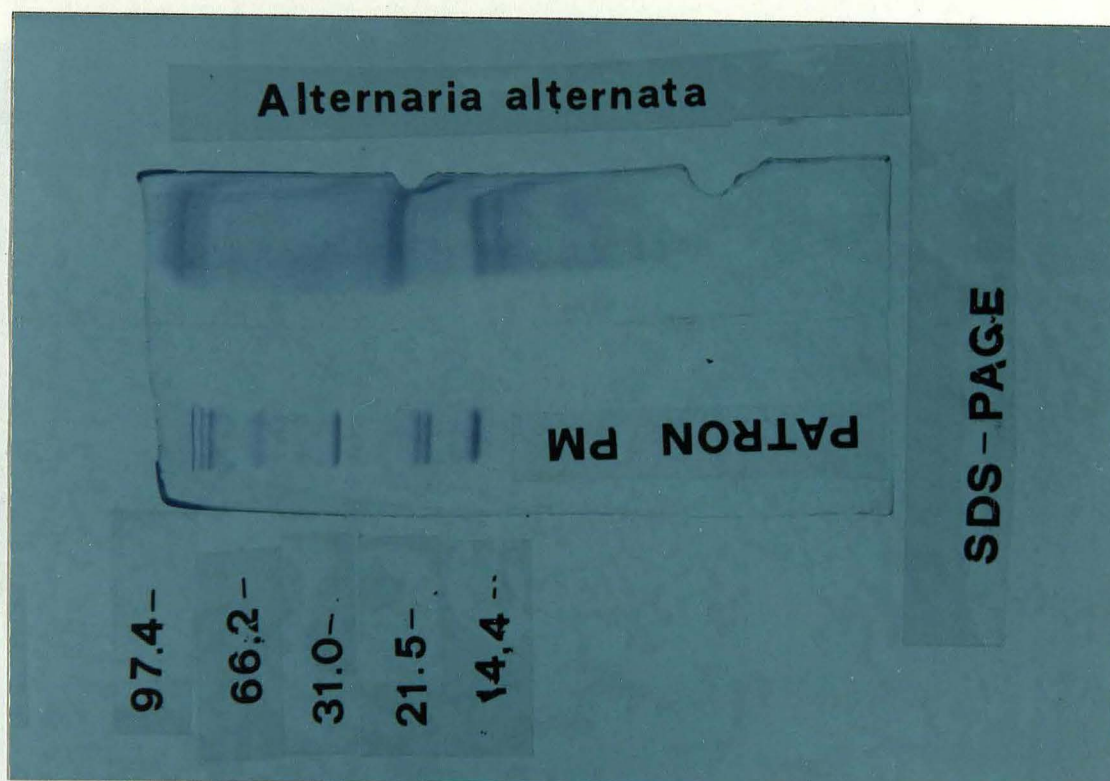
Control-identificación de Cultivo: Observación microscópica de *Cladosporium Herbarum*.

F O T O 15

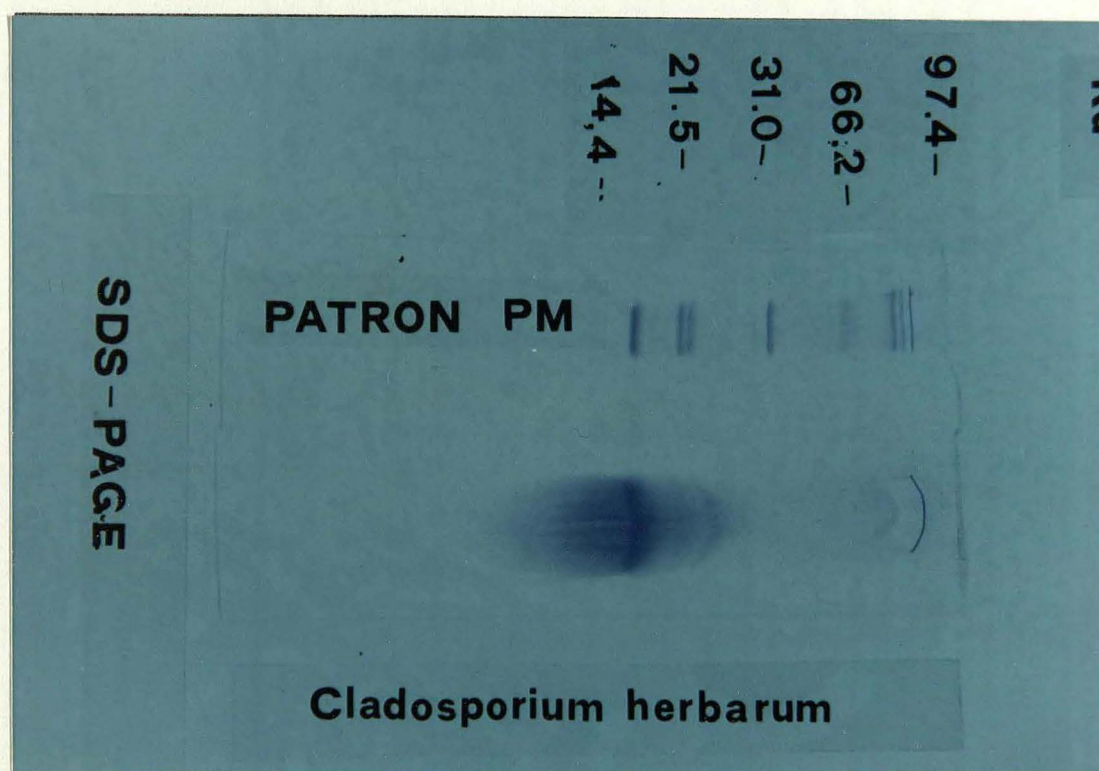
Punto isoeléctico para el extracto de Alternaria
Alternata.

F O T O 16

Punto isoeléctrico para el extracto de *Cladosporium*
Herbarum.



SDS-PAGE para el extracto de Alternaria Alternata.

FOTO 18SDS-PAGE para el extracto de *Cladosporium Herbarum*

