

Estandarización de extractos bacterianos para el uso en los servicios alergológicos.

Edilberto Machado del Risco¹, Elisabet Nicolau Pestana², Carmen Monde Enrique³

1. Máster en Enfermedades Infecciosas. Especialista de II Grado en Alergia. Profesor Auxiliar. Hospital Provincial Amalia Simoni, Camagüey. Avenida Finlay Km 3 ½ Camagüey. edilberto@finlay.cmw.sld.cu.
2. Máster en Bacteriología. Profesor Asistente. Centro de Inmunología y Productos Biológicos de la Universidad de Ciencias Médicas de Camagüey. enicolau@finlay.cmw.sld.cu.
3. Licenciada en Enfermería. Hospital Provincial Amalia Simoni, Camagüey. Avenida Finlay Km 3 ½ Camagüey. cmonde@finlay.cmw.sld.cu.

Resumen.

Introducción: La producción industrial de extractos alérgicos purificados y estandarizados tiene un gran avance en los últimos años, lo que permite un mejor diagnóstico etiológico en pruebas cutáneas. **Objetivo:** Estandarizar extractos bacterianos para la elaboración de vacunas, destinadas a los servicios de alergia.

Material y métodos: Se efectuó un ensayo clínico, en el Centro de Inmunología y Productos Biológicos (CENIPBI) de la Universidad Médica y el Hospital Amalia Simoni, de Camagüey en el periodo comprendido desde enero del 2012 a abril del 2015. La investigación se desarrolló en dos etapas en la primera se obtuvo el extracto y en la segunda se midió la reactividad in vivo. **Resultados:** Se obtuvieron extractos bacterianos de *pseudomonas aeruginosas*, *streptococcus β hemolítico*, *streptococcus α hemolítico*, *staphylococcus albus*, *staphylococcus aureo*, a partir de cepas de referencias ATTC. La positividad general de la prueba cutánea demorada fue del 78,33 % en los pacientes con dermatitis atópica y un 13,33 % en los sanos. En los enfermos de dermatitis atópica se obtuvo respuestas positivas mayoritaria a *Staphylococcus aureus* con el 81,6 %. Las reacciones adversas encontradas fueron mínimas, en un 6,67 %. **Conclusiones:** Con el trabajo conjunto con el CENIPBI aplicando las Buenas Prácticas Clínicas y bajo estándares internacionales se logra producir extractos bacterianos aptos para el uso alergológico. Al probar estos extractos en pacientes con

dermatitis atópica se obtiene una respuesta cutánea con alto grado de especificidad, donde la mayor respuesta recae en el *staphylococcus aureus*, germen con mayor exposición en la dermatitis atópica.

Palabras clave: extractos bacterianos; servicios alergológicos; vacunas; ensayo clínico.

Introducción

La producción industrial de extractos alergénicos purificados y estandarizados tiene un gran avance en los últimos años, lo que permite un mejor diagnóstico etiológico en pruebas cutáneas¹, aspecto que condesciende un desarrollo notable de la inmunoterapia específica (ITE), técnica terapéutica ampliamente utilizada en los servicios dedicados al tratamiento de las alergias.^{2,3}

Con el propósito de encontrar la vacuna adecuada, se ha avanzado en la producción industrial de extractos alergénicos. En igual sentido, se han desarrollado las técnicas de alergia molecular diferenciando aquellas moléculas responsables de los síntomas, para lograr el manejo apropiado de los pacientes que padecen enfermedades alérgicas⁴; técnica que aún no está disponible para todos los servicios de alergología y resulta poco conocida en muchos países.

Sin embargo, los extractos alergénicos industriales pueden ser usados por cualquier especialista. Se trata de productos de calidad, purificados y estandarizados con una potencia alergénica determinada en los laboratorios productores acorde los estándares internacionales.

A pesar de que cada laboratorio tiene sus referencias internas, se ha comprobado que la potencia relativa con extractos alergénicos es similar en varias industrias productoras a ciclo completo, lo que proporciona resultados análogos en las pruebas cutáneas y en la ITA.⁵

Cuba en los últimos veinte años ha mantenido un desarrollo alentador en la obtención de extractos alergénicos, en lo referente a ácaros, hongos, pólenes y alimentos⁶⁻⁸, no así en los extractos bacterianos que requieren de mayor atención con vista a lograr una producción estable con estándares certificados en su elaboración.

Se plantea que las bacterias tienen la capacidad de secretar toxinas muchas de las cuales pueden desempeñarse como superantígenos y en estas condiciones pueden modular la síntesis de IgE. Existen diversos ejemplos como es el caso del *Staphylococcus aureus* quien es capaz de estimular los procesos inflamatorios mediante una activación excesiva de células T y macrófagos⁹ evidencia de un nuevo mecanismo de estimulación inmunológica en interacción con células presentadoras de antígenos a través del MHC clase II.¹⁰

En Cuba, se viene trabajando en este sentido y se están haciendo esfuerzos en la obtención de extractos bacterianos para el uso alergológico, aspecto para el que se han encontrado evidencias científicas.^{11, 12}

Es reconocido por el gremio alergológico el uso de las vacunas bacterianas desensibilizantes en el tratamiento de la sensibilización alérgica bacteriana específica, pero para su confección se requiere un proceso de estandarización que garantice la inmunogenicidad del producto, estabilidad, reproductividad y buena respuesta clínica; oportunidad que se halla en el Centro de Inmunología y Productos Biológicos (CENIPBI) de la Universidad Médica de Camagüey; motivo por el que el objetivo de la presente investigación fue estandarizar extractos bacterianos para la elaboración de vacunas, destinadas a los servicios de alergia.

Material y métodos

Se efectuó un trabajo de investigación-desarrollo en forma de ensayo clínico, en conjunto entre el Centro de Inmunología y Productos Biológicos (CENIPBI) de la Universidad Médica de Camagüey y el Hospital Amalia Simoni, de igual localidad, durante el periodo comprendido desde enero del 2012 a abril del 2015.

La investigación se desarrolló en dos etapas en la primera se obtuvo el extracto y en la segunda se midió la reactividad in vivo.

Primera etapa (obtención del extracto): Se utilizaron cepas de referencia ATCC aportadas por el Centro de Ingeniería genética y biotecnología, y el centro provincial de higiene y epidemiología de Camagüey. El cultivo se efectuó en agar cerebro corazón, la muerte con formol al 40% y el arrastre se hizo con fenol al 4%. En todos los casos se midió esterilidad del producto mediante resiembra en cuñas y técnica de thioglicolato.

Una vez obtenido el producto el conteo celular se realizó por método nefelométrico visual y automatizado.

Para la concentración final del millonaje de bacterias por ml se empleó la fórmula:
 $CI \times VI = CD \times VD$

Donde:

CI= concentración inicial.

VI= volumen inicial.

CD= concentración deseada.

VD= volumen deseado.

Segunda etapa: se midió in vivo la reactividad cutánea mediante pruebas cutáneas demoradas con extractos bacterianos obtenidos en la primera etapa.

Universo estuvo dado por 74 enfermos de dermatitis atópica que asistieron al servicio de alergia del hospital Amalia Simoni en este periodo y la muestra se conformo por 60 pacientes que cumplieron los criterios de selección con igual número de controles sanos.

Criterios de inclusión:

- Edad superior a 18 años y menor de 65.
- Ambos sexos.
- Diagnóstico de dermatitis atópica.
- Consentimiento de participación.

Criterios de exclusión:

- Enfermedades que contraindiquen la realización de pruebas bacterianas demoradas.

La información recopilada se procesó en forma computarizada para lo cual se creó una base de datos en una computadora Pentium IV utilizando el paquete SPSS versión 10.6, lo que permitió la confección de tablas estadísticas.

Resultados

Se obtuvieron extractos bacterianos de pseudomonas aeruginosas, streptococcus β hemolítico, streptococcus α hemolítico, staphylococcus albus, staphylococcus aureo, con certificación de esterilidad y fecha de caducidad reconocidas a partir de cepas de

referencias ATTC, avalados por certificado de obtención del CENIPBI de la Universidad Medica de Camagüey.

Tabla 1. Positividad general de la prueba cutánea demorada a bacterias.

Positividad	Casos		Controles	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Si	47	78,33	14	23,33
No	13	21,67	46	76,67
Total	60	100	60	100

($p < 0.05$)

Fuente: Registro de datos.

La positividad general de la prueba cutánea demorada a bacterias fue del 78,33 % en los pacientes con dermatitis atópica y un 23,33 % en los sanos ($p < 0.05$).

Tabla 2. Sensibilización cutáneo celular in vivo para los diferentes antígenos bacterianos.

Tipo de bacteria	Grupo Casos		Grupo Control	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Staphylococcus aureus	49	81,66 %*	8	13,33%
Staphylococcus albus	15	25 %	5	8,33 %
Streptococcus α Hemolítico.	13	21,66 %	7	11,66 %
Streptococcus β Hemolítico.	22	36,66 %	20	33,33 %
Pseudomona aeruginosa	5	8,33 %	-	-

* $p < 0.05$

Fuente: Registro de datos.

Hubo pacientes con reacción positiva en más de un antígeno bacteriano. En los enfermos de dermatitis atópica se obtuvo respuestas positivas mayoritaria a

Staphylococcus aureus con el 81,6 %, seguido por el *streptococcus β hemolítico* con un 36,6 %, con respuesta en los controles de 13,3 y 33,3 % respectivamente.

Tabla 3. Sensibilidad cutánea para los diferentes antígenos bacterianos atendiendo al diámetro del nódulo a las 72 horas de realizada la prueba.

Grupos de estudio	1	2	3	4	5
	Staphylococcus aureus	Staphylococcus albus	Streptococcus α Hemolítico	Streptococcus β Hemolítico	Pseudomona aeruginosa
Casos	12,50	3,70	2,10	4,20	1,30
Control	3,5	1,5	0,30	2,80	

Las media del tamaño del nódulo fueron mayor para el *Staphylococcus aureus* con 12.50, seguido por el *streptococcus β hemolítico* con 6.7.

Tabla 4. Reacciones adversas.

Reacciones adversas	Casos		Controles		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
Leve	2	3,33	1	1,67	3	5
Moderadas	1	1,67	-	-	1	1,67
severas	-	-	-	-	-	-
Total	3	5	1	1,67	4	6,67

Fuente: Registro de datos.

Las reacciones adversas encontradas fueron mínimas, solo en un 6.67 % de ellos 5 % en los enfermos de dermatitis atópica y 1.67 % en los controles.

Discusión

Las enfermedades alérgicas son muy frecuentes y dentro de ellas la dermatitis atópica ocupa un lugar importante^{13,14}, padecimiento en el que se sufre con frecuencia infección bacteriana en las lesiones cutáneas lo que facilita el proceso de sensibilización.¹⁵

Concomitante a la aparición de una respuesta celular hacia estos antígenos bacterianos, se puede mostrar daño causado por la presencia del antígeno, en la que el

daño se debe más a la respuesta del huésped que a la acción misma del microorganismo.¹⁶

Al igual que en otras alergias, en la dermatitis atópica, las pruebas dérmicas ofrecen una biovaloración sobre la presencia o ausencia de una respuesta inmunitaria a un antígeno específico que activa un mecanismo efector particular de inflamación y origina una lesión transitoria, visible y/o palpable. La piel es un órgano conveniente para probar, ya que está equipada con todos los elementos necesarios para despertar una reacción de hipersensibilidad localizada y controlada.¹⁷

De ellas las pruebas demoradas con antígenos microbianos (prueba de tuberculina) es una prueba intradérmica para hipersensibilidad mediada por células que se utiliza para detectar inmunidad en ciertas infecciones y para evaluar sensibilización celular específica, técnica aplicable en la dermatitis atópica por el alto grado de exposición bacteriana en las lesiones cutáneas.¹⁷

La prueba de tuberculina se utiliza para medir sensibilización celular in vivo, debido a que las reacciones de hipersensibilidad tardías dependen de la respuesta inmunológica mediadas por el linfocito T.¹⁷

Del análisis de estos resultados se puede argüir que la alta sensibilización cutáneo celular a *Staphylococcus aureus* en los pacientes con dermatitis atópica, está determinada por la alta exposición a este germen en las lesiones cutáneas propias de la enfermedad, situación descrita en varias investigaciones y en relación con el reporte a nivel internacional de una mayor infección a *Staphylococcus aureus* en las lesiones de piel.¹⁸

Los estudios realizados con *staphylococcus aureus* proporcionan evidencias de un mecanismo de estimulación inmunológica, considerado como el prototipo de los superantígenos, fracciones peptídicas del microorganismo al unirse a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (QH II) de los monocitos y las células dendríticas induce la liberación de un determinado número de moléculas pro inflamatorias (p. Ej.: IL1 y factor alfa de necrosis tumoral).¹⁹

Además algunas células T presentan receptores formados por cadenas alfa y beta, que pueden estimularse, proliferar y secretar citocinas como respuesta a los

superantígenos, sistema a través del cual se puede mantener la respuesta relacionarse a la reducción de los superantígenos existentes a nivel de la piel.¹⁹

Se ha descrito que algunas toxinas bacterianas pueden estimular la activación de grandes cantidades de linfocitos TCD4+ y cualquiera de estas toxinas puede estimular todas las células T en individuos que expresan un “juego” particular de genes relacionado con los receptores de células T. Dichas toxinas son consideradas superantígenos y su importancia radica en la capacidad de estimular mecanismos efectores de la respuesta inmune de tipo adaptativo con la subsiguiente aparición de anomalías clínico patológicas.²⁰

Conclusiones

- Con el trabajo conjunto con el CENIPBI aplicando las Buenas prácticas clínicas y bajo estándares internacionales se logra producir extractos bacterianos aptos para el uso alergológico.
- Al probar estos extractos en pacientes con dermatitis atópica se obtiene una respuesta cutánea con alto grado de especificidad, donde la mayor respuesta recae en el staphylococcus aureus germen con mayor exposición en este grupo de enfermos.

Referencias bibliográficas

1. Rodríguez Santos O, Celio Murillo R, Lurrabaquio Miranda A. Beneficios y riesgos de la inmunoterapia subcutánea con extractos de ácaros en rinoconjuntivitis alérgica y en asma bronquial. Vaccimonitor [Internet]. 2014 [citado 17 mar 2016]; 23 (3): [aprox. 10 p.]. Disponible en: http://scieloprueba.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2014000300007&lng=es&nrm=iso.
2. Li P, Li Q, Huang Z, Chen W, Lu Y, Tian M. Efficacy and safety of house dust mite sublingual immunotherapy in monosensitized and polysensitized children with respiratory allergic diseases. Int Forum Allergy Rhinol 2014; 4(10):796-801.

3. Diaz R A, Labrada R A, Castro A RL, Alvarez C M. Current status and future perspectives of immunotherapy in Latin America and Cuba. *World Allergy Organization Journal* 2014, 7:28.
4. Frati F, Cecchi L, Scala E, Ridolo E, Dell'Albani I, Makrì E, et al. New product development with the innovative biomolecular sublingual immunotherapy formulations for the management of allergic rhinitis. *Biologics* 2014; 8:221-6.
5. Rodríguez O, Labrada A, Célio R, Aboukhair F, Meli VR, Barata HJ, et al. Comparación de la potencia de extractos alergénicos de ácaros en pacientes con asma y rinitis alérgica. *VacciMonitor* [Internet] 2012 [citado 17 mar 2016]; 21(1):25-9. Disponible en: http://scieloprueba.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2012000100006&lng=es&nrm=iso.
6. Rodríguez Santos O, Reyes Almaguer M. Eficacia y seguridad de la inmunoterapia sublingual en niños de 6 a 24 meses de edad con rinitis y asma bronquial sensibilizados a los ácaros domésticos. *Vaccimonitor* [Internet]. 2015 [citado 17 mar 2016]: 24 (2): [aprox. 10 p.]. Disponible en: http://scieloprueba.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2015000200005&lng=es&nrm=iso.
7. Lázaro Castro R, Rodríguez J, Ronquillo M, Álvarez M, González M, Rodríguez J, Navarro B, Mateo M, Oliva Y, Enríquez I, Labrada A. Sensibilidad y especificidad de la prueba cutánea por punción con extractos alergénicos estandarizados de *Dermatophagoides pteronyssinus* en adultos. *Vaccimonitor* [Internet]. 2013 [citado 17 mar 2016] 22(2): [aprox. 10 p.]. Disponible en: http://scieloprueba.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2013000200005&lng=es&nrm=iso.
8. Castro RL, González M, Labrada A, Navarro B. Sensibilización a *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides siboney* y *Blomia tropicalis* en niños de tres consultorios. *Rev Cubana Med Gen Integr* [Internet]. 2005 [citado 17 mar 2016]; 21:3-4. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252005000300022&lng=es&nrm=iso&tlng=es.

9. Campell DE, Kemp AS. Proliferation and production of interferon gamma and IL 4 in response to staphilococeal superantigen and staphilococcus aureus in chilhood atópic dermatitis. Clin. Exp Immunol 1997; 107(2): 392-97.
10. Andrew J, Walter N. Circulating Adhesion molecule in disease. Immune today 2003; 14: 504-12.
11. Machado del Risco E, Romero González A, Nicolau Pestana E. Sensibilidad celular a bacterias en pacientes con diagnóstico de dermatitis atópica. AMC Machado del Risco E, Romero González A, Nicolau Pestana E. Sensibilidad celular a bacterias en pacientes con diagnóstico de dermatitis atópica. AMC [Internet]. 2009 [citado 17 mar 2016], 13 (2): [aprox. 10 p.]. Disponible en: http://scieloprueba.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552009000200003&lng=es&nrm=iso.
12. Naranjo Rodríguez SA, García Menéndez R, Naranjo Rodríguez L, Negret Hernández M. Empleo de inmunoterapia en pacientes con infección producida por *Staphylococcus aureus*. Rev méd electrón [Internet] 2011 [citado 17 mar 2016]; 33(2): [aprox. 10 p.]. Disponible en URL: <http://www.revmatanzas.sld.cu/revista%20medica/ano%202011/vol2%202011/tema10.htm>.
13. Rieker Schwiembacher J, Nell MJ, Diamant Z, van R, Distler A, Boot JD, et al. Open-label parallel dose tolerability study of three subcutaneous immunotherapy regimens in house dust mite allergic patients. ClinTransl Allergy 2013; 3 (1):16-27.
14. Eifan AO, Calderon MA, Durham SR. Allergen immunotherapy for house dust mite: clinical efficacy and immunological mechanisms in allergic rhinitis and asthma. Expert Opin Biol Ther 2013; 13(11):1543-56.
15. Varona Pérez, Patricia; Fabré Ortiz, Dania; Águila, Roberto; Corona, Beatriz; Venero Fernández, Silvia; Suárez Medina, Ramón. Prevalencia de síntomas de dermatitis atópica en niños y adolescentes en La Habana. Rev. cuba. med. gen. Integr [Internet], 2012 [citado 17 mar 2016] 28(1):42-51. Disponible en <http://iah.bmn.sld.cu/cgi-bin/wxis.exe/iah/>.

16. Aguilar T. Manual de curso teórico práctico de inmunología. México: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; 2005 p.14-5.
17. Hamann C, Sullivan K. Natural rubber latex hypersensitivity. En: Charlesworth EN, editores. Cutaneous allergy. Cambridge: Blackwell Science; 1997. p. 155.
18. Hanifin J. Tacrolimus ointment: Advancing the treatment of atopic dermatitis. J Am Acad Dermatol 2004; 44: 1.
19. Campell D.E, Kemp A.S. Proliferation and production of interferon gamma and IL 4 in response to staphylococcal superantigen and staphylococcus aureus in childhood atopic dermatitis. Clin. Exp Immunol. 1997; 107 (2): 392-7.
20. Ochoa F, Lerva T. Mecanismos de defensa frente a diferentes bacterias. En: Llop A, Valdez M, Zuazo J, editores. Microbiología y parasitología médica. La Habana: Ciencias médicas; 2001. p.147-52.