LAS REACCIONES DE AGLUTINACION EN EL DIAGNOSTICO DE LA ALERGIA A MEDICAMENTOS¹

DR. CARLOS CANSECO JR.²

El empleo de partículas de carbono activadas por el vapor de agua permite emplearlo como sustrato de una variante de la técnica de aglutinación indirecta, la carboaglutinación. La sensibilidad en esta prueba compara favorablemente con la de hema aglutinación indirecta. En un grupo de 30 sueros investigados, en 27 (90%) se encontraron anticuerpos aglutinantes, y de 74 pruebas realizadas con estos sueros se obtuvieron 43 reacciones positivas, la mayoría de interés clínico en los enfermos estudiados. Además se investigó la posibilidad de determinar sensibilizaciones cruzadas en 17 sueros con resultados positivos en 10 para 1 o más medicamentos de estructura química semejante. Se menciona la posibilidad de emplear esta técnica para determinar anticuerpos de tipo bloqueador en pacientes atópicos en tratamientos específicos de desensibilización. La técnica en sí es sencilla, requiere de poco equipo especializado, la suspensión del carbono es estable (3 meses) y la lectura se hace en 5 minutos. (GAC. MÉD MÉX. 97: 636, 1967).

LAS REACCIONES alérgicas a medicamentos pueden corresponder a cualquiera de los 4 mecanismos principales mediadores de las reacciones alérgicas descritas por Gell y Coombs¹ y por lo tanto la búsqueda de los anticuerpos responsables de las mismas, deberá intentarse de acuerdo con la clasificación de estos autores.

La respuesta alérgica a un medica-

mento en particular no es estereotipada. De un enfermo a otro y a veces en el mismo enfermo se pueden encontrar distintos mecanismos alérgicos en juego. Schwartz y Vaughan² describen anticuerpos sensibilizantes de la piel y anticuerpos aglutinantes en enfermos que presentaban reacciones alérgicas a la penicilina, hecho frecuentemente observado en el grupo de enfermos alérgicos a medicamentos motivo de esta comunicación.

Samter³ se muestra escéptico de los resultados prácticos de la investigación de anticuerpos en estos enfermos al re-

¹ Trabajo de ingreso a la Academia Nacional de Medicina, presentado en la sesión ordinaria del 28 de septiembre de 1966.

² Académico correspondiente, Hospital Universitario, Facultad de Medicina de la Universidad de Nuevo León, Monterrey.

cordar que la mayoría de los medicamentos empleados no son antigénicos per-se sino que requieren una biotransformación previa y por lo tanto la búsqueda de anticuerpos es problemática si no conocemos la estructura real del antígeno.

A pesar de esta posición pesimista de Samter, la búsqueda de métodos sensibles para demostrar anticuerpos en las reacciones alérgicas a medicamentos, ha sido intensa y continúa día a día aumentando el número de pruebas *in vitro* e *in vivo* que permiten la identificación de anticuerpos en estos enfermos. Nos interesa en particular señalar las pruebas *in vitro* actualmente en uso para la investigación de estos anticuerpos y presentar al final una modificación a la técnica de la aglutinación indirecta, la carboaglutinación.

Katz y Cohen⁴ describen la técnica de la liberación histamina *in vitro*, Shelly⁵ la ruptura de los basófilos, y Hirshorn⁶ las alteraciones mitóticas de los lincocitos en presencia de complejos antígeno anticuerpo. Ley⁷ presenta la técnica de la aglutinación directa que Boyden⁸ modifica al emplear hematíes previamente tratados con ácido tánico (hemaaglutinación indirecta) y Stavitsky⁹ hematíes tratados con enlaces diazoados.

Cambiando el sustrato de la reacción, los hematíes, por otras sustancias como el poliestireno¹⁰ el colodión¹¹ y la bentonita¹² se reportan resultados comparables con la hema aglutinación indirecta.

Heidelberger y Kabat¹³ en 1937 se-

ñalaron la posibilidad de emplear como sustrato de una reacción de aglutinación las partículas de carbón vegetal, pero desistieron de su empleo al reportar que, aunque teóricamente las partículas de carbón serían ideales como sustrato de una reacción de aglutinación, su bajo poder de absorción las hacía poco prácticas. Posteriormente Hiall en 1953¹⁴ señala que las partículas de carbón pueden convertirse en una buena superficie de adsorción. Si recomendamos que las partículas de carbón están cubiertas con una capa de hidrógeno o de grupos hidrocarbonados retenidos tenazmente en la superficie de la partícula, siendo la adsorción de las partículas inversamente proporcional a la cantidad de iones de hidrógeno retenidos, pero que si se hace pasar una corriente de vapor de agua a una temperatura elevada aumenta la superficie de adsorción por oxidación del propio carbón, convirtiéndose así las partículas de carbón vegetal en un sustrato ideal para las reacciones de aglutinación.

Resuelto el problema técnico que impedía el uso de las partículas de carbón en este tipo de reacciones, comenzamos a usarlos como sustrato de una reacción de aglutinación indirecta, la *carbo-aglutinación* que a continuación se describe.

TÉCNICA DE LA CARBO-AGLUTINACIÓN

Se pesa un gramo de carbón vegetal q. p., se coloca en un matraz, se le pasa una corriente de vapor durante una hora, transcurrido este tiempo se suspende el carbón en 100 cc. de agua

destilada, de esta manera el carbón está listo para ser usado en la prueba.

Preparación de los tubos de carbón. Se agita vigorosamente el reactivo por 5 minutos y después se deja reposar durante 1 hora, se toman 15 cc. de sobrenadante para cada antígeno y se llevan a tubos de ensayo de 18 por 150 mm. Se centrifugan por 5 minutos a 200 r.p.m. El sobrenadante se decanta a otro tubo y se centrifuga a 800 r.p.m., durante 5 minutos y las partículas que quedan en el fondo del tubo son las que se emplean en esta técnica.

Preparación del medicamento. Se disuelve un g. del medicamento en 10 cc. de agua destilada, se agita fuertemente y se deja en reposo 24 Hs., agitándolo varias veces durante el día, si hay sustancias y partículas sobrenadantes, se eliminan por centrifugación o filtración. Este medicamento tiene una dilución de 1 a 10, pudiéndose preparar a partir de ésta, las diluciones decimales empleadas en las pruebas.

Sensibilización de las partículas de carbón. Se toman los tubos de carbón previamente preparados como se indicó anteriormente, se añaden 5 cc. de agua destilada y se centrifugan a 1,300 r.p.m. durante 5 minutos, se elimina el sobrenadante. Se añade 1 cc. de agua destilada más de 3 cc. del antígeno medicamentoso previamente preparado y se llevan los tubos a incubar durante media hora a 37 grados; terminado este tiempo se centrifuga a 1,300 r.p.m. durante 5 minutos, se decantan y se lavan con 5 cc. de agua destilada y se repite el procedimiento anterior. Se

añaden 2.5 cc. de solución reguladora del pH (7.2)* y se añaden 0.1 cc. de polisorbato al 1 por ciento (Tween 80).

Los sueros que van a ser investigados se incuban a 64 grados por 4 minutos y medio. En tubos previamente lavados y secos se añade 0.5 de suero problema, más 0.5 cc. de la solución reguladora del P.h. 7.2.

Se toma 0.1 cc. de cada uno de los sueros diluidos y se colocan en las cavidades que contiene la placa serológica, se les añade una gota de las partículas de carbón cubiertas con antígeno (en dilución 1:10, 1:100, 1:1,000 etc.). La placa se agita por rotación durante 5 minutos (30-50 r.p.m.). Se ven al microscopio a bajo aumento (seco débil).

Lectura. La reacción es positiva cuando se observa aglutinación de las partículas de carbón sensibilizados. Diapositivas (1 al 5). Testigos. Se llevaron los siguientes testigos.

Testigos negativos.

Testigo N° 1. Partículas sensibilizantes tween, solución buffer, (en la placa se depositó suero).

Testigo N° 2. Partículas sensibilizantes, solución buffer, tween. (en la placa se depositó agua).

Testigo N° 3. Medicamento, partículas de carbón, solución buffer, tween (en la placa se depositó suero).

Testigo N° 4. Tween, solución buffer, (en la placa se depositó suero).

Testigo N° 5. Medicamento, partículas de carbón sensibilizante, tween.

* Soluciones. Solución reguladora de pH 7.2.
20.4 gr. Na 2 HPO 4 1.3 gr. Na 2 HPO 4
1.3 gr. KH 2 PO 4 3000 ccv. de H2.

solución buffer. (en la placa se depositó agua).

Prueba de inhibición. Se depositaron los sueros en las concavidades de la placa serológica, se les agrega una gota de medicamento en solución correspondiente y después otra gota con el medicamento y carbón sensibilizado dando resultados negativos a la carboaglutinación.

Debe poder efectuarse una prueba de inhibición poniendo previamente el suero problema en contacto con una solución adecuada del antígeno que se sospecha provoca la reacción alérgica. Las partículas de carbón activadas reúnen los requisitos mencionados anteriormente.

MATERIAL

En esta comunicación empleamos el suero de 30 enfermos alérgicos a medicamentos que reunían las condiciones mínimas señaladas por Gell y Coombs¹⁵ para clasificar a un enfermo como alérgico a medicamento.

En una comunicación anterior¹⁶ presentamos un estudio comparativo de la sensibilidad de las técnicas de carboaglutinación y la hema aglutinación indirecta de Boyden, comparando favorablemente con esta última y por lo tanto en este grupo de enfermos no se empleó como control le hema aglutinación indirecta.

Edad. Dividimos los enfermos en 4 grupos de 1 a 10 años, de 11 a 20 años, de 31 a 50 años y de 51 a 75 años. En el primer grupo encontramos 7, 5 en el segundo, 13 en el tercero y 5 en el cuarto. La distribución de eda-

des señala simplemente un hecho por demás conocido o sea la mayor frecuencia de ingestión de medicinas durante los primeros años de vida y en las terceras y cuartas décadas de la vida.

Sexo. Se registraron 20 enfermos de sexo femenino y 10 del sexo masculino. La preferencia por el sexo femenino en este grupo de enfermos limitado podría señalar simplemente la mayor frecuencia con que las mujeres ingieren medicinas analgésicas, tranquilizantes etc.

Antecedentes atópicos. 15 de los enfermos presentaban antecedentes atópicos previos a la consulta que motivó este examen y de éstos 11 tenían además anticuerpos sensibilizantes de la piel para otros alérgenos distintos al medicamento.

Evolución. Se presentaron a la consulta antes de 1 año de presentar manifestaciones alérgicas 20 enfermos, entre 1 y 2 años 4 enfermos, entre 2 y 6 años, 5 enfermos y después de 6 años de evolución, 1 enfermo.

Clasificación clínica. Distinguimos 4 grupos principales de manifestaciones clínicas: 1º urticaria y edema angio-neurótico, presentes en 17 enfermos. 2º púrpura anafiláctica, en 5 ocasiones. 3º choque anafiláctico, en 4 ocasiones y lesiones dermatológicas varias (erupción iterativa, erupciones exantemáticas), en 4 casos.

De los 30 sueros 27 dieron una o más reacciones positivas de carboaglutinación, los 3 restantes aunque clínicamente fueron considerados como alérgicos a determinados medicamentos, no mostraron anticuerpos aglutinantes, pe-

ro en dos de ellos se encontraron anticuerpos sensibilizantes de la piel para la peniciloil polilisina ya que ambos enfermos habían presentado sus manifestaciones alérgicas (choque anafiláctico) después de la inyección de penicilina benzilica.

RESULTADOS

Se practicaron con estos sueros 74 reacciones de carbo aglutinación para medicamentos empleados recientemente por estos enfermos, en particular aquellos que habían ingerido un mes antes de la presentación del cuadro clínico. De las 74 reacciones practicadas 43 fueron positivas para los medicamentos empleados por los enfermos.

Medicamentos responsables de las reacciones alérgicas. De las 43 reacciones de aglutinación positivas, ocupa el primer lugar con 11 respuestas positivas el ácido acetil salicílico, le siguen la aminopirina con 10, la penicilina con 4, la sulfadiazina con 3 y otras con 2 o menos respuestas positivas (ácido paramino salicílico, hidrazida del ácido isonicotínico, estreptomina, suero de caballo, cloromicetina, tranilcipromina y fenil butazona).

Respuesta clínica. La eliminación de los medicamentos señalados por los resultados de la carbo aglutinación permitieron el control de las manifestaciones clínicas en 25 de los 30 enfermos estudiados, 5 de ellos accidentalmente ingirieron medicamentos que contenían los medicamentos a que eran alérgicos y presentaron de nuevo sus síntomas alérgicos. Estos enfermos fueron observados después de haberse realizado las

pruebas de carbo aglutinación un promedio de 6 meses.

Sensibilizaciones cruzadas. Se dice que ocurre sensibilización cruzada cuando la reacción alérgica inducida por un medicamento es producida posteriormente por el empleo de uno o más medicamentos de estructura química semejantes.

Baer¹⁷ y Mayer¹⁸ describen ejemplos ahora clásicos de sensibilizaciones cruzadas. Se escogieron para estudiar esta posibilidad en estos enfermos seis compuestos químicos, todos ellos comprendidos en el grupo de las aminas aromáticas.¹⁸

La aminopirina, el ácido acetil salicílico, la fenil butazona, la sulfadiazina, el ácido paraminosalicílico y la hidrazina del ácido isonicotínico. En cualesquiera de los sueros investigados que daban reacción de carboaglutinación positiva para alguno de los compuestos anteriores, se hacían pruebas complementarias para los otros cinco.

Destacamos mayor frecuencia de sensibilizaciones cruzadas entre la aminopirina y el ácido acetil salicílico, (5 casos): del ácido aminosalicílico y la hidrazida del ácido isonicotínico (2 casos); del ácido acetil salicílico y la sulfadiazina (2 casos) de la aminopirina y la sulfadiazina (2 casos); de la aminopirina y la fenil butazona (1 caso).

DISCUSIÓN

La diferencia fundamental entre una reacción de precipitación y otra de aglutinación reside en el estado de dispersión del antígeno. Mientras en la primera éste se encuentra en solución

libre, en la segunda se encuentra absorbido o fijado por medios químicos o partículas que lo soportan (glóbulos rojos, colodión, bentonita, carbono, etcétera).

Esta diferencia afecta fundamentalmente la sensibilidad de la reacción, siendo la segunda hasta 10,000 veces más sensible que la primera.¹⁹

Las reacciones de aglutinación sirven para determinar anticuerpos di- o multivalentes, por lo tanto, los anticuerpos sensibilizantes de la piel o reagentes que se consideran univalentes no será posible determinarlos con estas reacciones.

En trabajo anterior¹⁰ señalamos la posibilidad de determinar, además de anticuerpos aglutinantes, anticuerpos del tipo bloqueador que aparecen en los enfermos atópicos o no atópicos después de la inyección por vía subcutánea de diluciones de antígeno proteicos, polisacáridos etc. pudiendo considerarse esta prueba con posibilidades para investigar la respuesta al tratamiento de sensibilización específica en un enfermo atópico.

La selección de las células o partículas que sirven de sustrato en las reacciones de aglutinación, exige las siguientes condiciones:²⁰

Primero. Las células o partículas deben absorber o fijar antígeno de diferente naturaleza química (proteínas, polisacáridos, radicales químicos etc.). Segundo. Los determinantes antigénicos deben quedar libres para poder reaccionar con los anticuerpos correspondientes. Tercero. Las células o partículas deben formar suspensiones es-

tables y de fácil aglutinación. Cuarto. Las células o partículas deben poderse conservar listas para ser usadas un período razonable de tiempo (3 meses).

Quinto. Se debe realizar prueba de inhibición, ésta se efectúa poniendo en contacto previamente el suero problema con una solución adecuada del antígeno que se sospeche provoque la reacción alérgica.

Las partículas de carbono activadas reúnen los requisitos mencionados anteriormente.

REFERENCIAS

- Gell y Coombs: *Clinical aspects of immunology*. F. A. Davis, 1964, p. 320.
- Schwartz, R. H. and De Vaughan, J.: *Immunological responsiveness of man to penicillin*. J.A.M.A. 185: 1151, 1963.
- Samter, M. and Markowitz, A. S.: *Antigens and antibodies in drug allergy*. Alergologia, Ed. Paz Montalvo, 1964.
- Katz, G. and Cohen, S.: *Experimental evidence of histamine release in allergy*. J.A.M.A. 117: 1782, 1941.
- Shelley, W. B.: *Indirect basophil degranulation test to allergy to penicillin and other drugs*. J.A.M.A. 184: 171, 1963.
- Hirshorn, K.: *Immune response and mitosis of human peripheral blood Lymphocytes in-vitro*. Science 142: 1185, 1963.
- Ley, A. B.: *Circulation antibodies directed against penicillin*. Science, 127: 1118, 1958.
- Boyden, S. V.: *The adsorption of protein in erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by anti-protein sera*. J. Exper. Med. 93: 107, 1951.
- Stavitsky, A. B. y Argill, E. R.: *Micro methods for the study of proteins and antibodies*. J. Immunol. 74: 306, 1955.
- Singer, J. M. y Plotz, C. M.: *The latex fixation test. I Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis*. Am. J. Med. 21: 888, 1956.
- Cannon, R. R. y Marshall, C. E.: *An improved serologic method for the determination of the precipitative titers of antisera*. J. Immunol. 38: 365, 1940.

12. Bozicevich, J.: *Bentonite flocculation test for rheumatoid arthritis*. Proc. Soc. Exp. Biol. 97: 190, 1958.
13. Heidelberger, M. y Kabat, E. A.: *Flocculation tests*. J. Exper. Med. 65: 385, 1937.
14. Hiall, S. y Hiall, H. M.: *Diccionario de Química*, 1953, p. 206.
15. Gell y Coombs: *Clinical aspects of immunology*. F. A. Davis, 1964, p. 449.
16. Canseco, C. y Aguado, T.: *La carboaglutinación en el diagnóstico de alergia a medicamentos*. XXV Reunión de la Sociedad Mexicana de Alergistas, Tuxtla Gutiérrez, 1966.
17. Baer, R. L.: *Cross sensitization phenomena*. En: *Modern treatment of dermatology*. Mackenna, 1954, p. 232.
18. Mayer, R. L.: *Compounds of quinone structure as allergens and cancerogenic agents*. *Experientia* 6: 241, 1950.
19. Kabat, E. A. y Mayer, M. M.: *Experimental immunochemistry*. Springfield, C. A. Thomas 1966, p. 99.
20. Gell y Coombs: *Clinical aspects of immunology*. Pág. 24. F. A. Davis, 1964, p. 24.

COMENTARIO OFICIAL

DR. JULIO CUEVA VELÁZQUEZ¹

ES PARA mí un placer dar la bienvenida en el seno de la H. Academia de Medicina al Dr. Carlos Canseco, compañero en mis años estudiantiles y profesional distinguido de la misma especialidad.

Su formación de graduado al lado de Feinberg en la Northwestern University, hacía esperar de él los frutos que pronto habría de cosechar en su iniciación profesional en provincia, primero en Tampico y después en Monterrey, donde fundó los servicios de alergia e inmunología en el Hospital Universitario, y donde investigó la etiología de la alergia reportando principalmente los pólenes y hongos de la región noroeste de nuestra patria.

El problema de la alergia a medicamentos es aún un reto a la investigación. Constituye un problema creciente debido al hecho de que cada año aumenta el número de medicamentos y la producción de éstos. Pero en tanto algunos medicamentos rara vez provocan reacciones alérgicas, otros pueden provocarlas en un porcentaje muy im-

portante. La estructura química en relación con la capacidad de sensibilización no es posible que sea determinante si desconocemos la intimidad de su mecanismo de sensibilización y los resultados de su metabolismo.

En México se han hecho intentos de investigación con enfermos alérgicos a penicilina, sulfadrogas y ácido acetil salicílico por Salazar Mallén y Cuéllar, sensibilizando partículas de colodión con resultados inconstantes. Vilchis y Venegas, realizaron pruebas directas de penicilina con los mismos resultados.

Salazar Mallén empleó eritrocitos humanos unidos a penicilina por medio de bendicina, con reacciones positivas en 25 de 27 casos de alergia a penicilina. Martínez Cortés en 1962 describe un método de anafilaxia cutánea pasiva inspirado en la técnica de Ovary con resultados positivos en 40 de 43 enfermos.

Canseco nos presenta en su trabajo un resumen de los intentos aparecidos en la literatura médica para la investigación de anticuerpos in vitro para demostrar la alergia a medicamentos haciendo énfasis en las

¹ Académico numerario. Hospital General de México.

pruebas directas de liberación de histamina de Katz y Cotten, la ruptura y degranulación de los basófilos de Shelly, etc., así como las pruebas de aglutinación indirecta empleando hematies y otras substancias como poliestireno, colodion y bentonita.

Basándose en los experimentos de Kabat y Heidelberger y las orientaciones de Hail, emplea partículas de carbón vegetal sometidos a oxidación la cual aumenta en éstas su superficie de adsorción. Describe la técnica empleada con partículas de carbón sensibilizado y los resultados con 30 sueros con reacciones positivas en 27 y después hace aplicaciones clínicas de los resultados obtenidos en el control de la alergia a medicamentos, en casos de reacciones cruzados con otros medicamentos de estructura química básicamente semejante y en la determinación de anticuerpos bloqueadores, producidos en los enfermos sometidos a tratamiento hiposensibilizante. La técnica es ingeniosa en su concepción y sencilla en su aplicación así como de costo bajo.

Si sus observaciones son empleadas en otro tipo de manifestaciones de alergia a medicamentos y sus resultados son comparables, tendremos en nuestro poder una técnica de laboratorio, que aplicada razonablemente, nos dará datos en un porcentaje muy

importante acerca de la existencia de alergia a muchas substancias, sin exponer la salud y la vida del paciente.

La preocupación general del especialista en alergia e inmunología es determinar con cierto grado de exactitud el diagnóstico por el primero y la presencia de anticuerpos por el segundo en la alergia por medicamentos. Las pruebas cutáneas y del parche exponen al paciente a la reproducción de su sintomatología y la mayoría de las pruebas in vitro no dan resultados uniformes en manos de diferentes investigadores; es por lo tanto sumamente interesante el trabajo y los resultados obtenidos por el Dr. Canseco. Solamente sugiero que en el trabajo se incluya en el control de testigos suero de personas normales o se aclare si se utilizaron éstos.

Felicito al Dr. Canseco por su trabajo en el arduo problema de la investigación de la alergia a medicamentos y me felicito por recibirlo en esta Academia, ya que fue aceptado por sus merecimientos y su labor en la especialidad donde ha formado centros de investigación y alumnos, y ha reportado sus observaciones y experiencias. Que su incorporación a esta corporación sea un estímulo a su capacidad y madurez, y que siga presentando trabajos científicos en este campo de la medicina.