

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

**UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD**

**“DR. ANTONIO FRAGA MOURET”**

**CENTRO MEDICO NACIONAL “LA RAZA”**

**ESTANDARIZACIÓN DE LA POTENCIA BIOLÓGICA DE EXTRACTOS  
ALERGÉNICOS DE DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS PARA  
INMUNOTERAPIA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN ALERGIA E  
INMUNOLOGÍA CLÍNICA**

**P R E S E N T A**

**Dra. Cristina Moctezuma Trejo**

**Asesor: Dr. Martín Becerril Angeles**

.....  
**MEXICO D. F. ABRIL 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Jesús Arenas Ozuna  
Jefe de Educación en Salud Hospital de Especialidades “Antonio Fraga Mouret”  
UMAE Centro Médico Nacional “La Raza” IMSS

Dr. Martín Becerril Ángeles  
Jefe de Servicio y titular de la Especialidad de Alergia e Inmunología Clínica  
UMAE Hospital de Especialidades  
“Dr. Antonio Fraga Mouret” Centro Médico Nacional “La Raza”

Dra, Cristina Moctezuma Trejo  
Médico Residente de la Especialidad de Alergia e Inmunología Clínica

Protocolo No.  
R-2013-3501-31

## INDICE

I.	RESUMEN	4
II.	ANTECEDENTES	6
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	8
IV.	RESULTADOS	11
V.	DISCUSION	17
VI.	CONCLUSIÓN	19
VII.	BIBLIOGRAFIA	20
VIII.	ANEXOS	24

## I. RESUMEN.

### **Estandarización de la Potencia Biológica De Extractos Alergénicos de *Dermatophagoides pteronyssinus* para Inmunoterapia**

Los extractos alergénicos con más relevancia clínica son el *Dermatophagoides pteronyssinus*.

**Objetivos:** Estandarizar la potencia biológica en Unidades Alergénicas Bioequivalentes (BAU) de extractos alergénicos de *Dermatophagoides pteronyssinus* de tres laboratorios nacionales.

**Material y Métodos:** Estudio experimental, prospectivo, transversal, cuantitativo realizado en pacientes diagnosticados con alergia a *Dermatophagoides pt* del Servicio de Alergia e Inmunología del Centro Médico Nacional La Raza. Se aplicaron los extractos por vía intradérmica de los laboratorios mexicanos Allergomex, Allerquim y Allerstand en diluciones por triplicado a partir de la dilución 15 en orden decreciente, hasta obtener un eritema con  $\Sigma \geq 50$  mm. El análisis estadístico se hizo mediante regresión logística, análisis de varianza de una vía y la prueba de Bonferroni.

**Resultados:** Se incluyeron 20 pacientes adultos, 11 mujeres y 9 hombres, con edades entre 16 y 45 años. Cuatro pacientes tenían rinitis más asma alérgica y 16 sólo tenían rinitis alérgica. No se presentaron reacciones anafilácticas sistémicas. Los coeficientes de correlación de la regresión lineal de la dosis/respuesta fueron para Allerstand  $r = 0.55$ , Allergomex  $r = 0.54$  y Allerquim  $r = 0.57$  ( $p = 0.001$ ). Las diluciones calculadas correspondientes a 100 000 BAU/mL para cada extracto fueron: Allerstand 1:26 195, Allergomex 1:26 341 y Allerquim 1:73 993.

**Conclusiones:** Se estableció la potencia biológica de cada extracto probado. El extracto del laboratorio Allerquim mostró una equivalencia biológica a una dilución mayor comparado con los extractos de los otros laboratorios. La prueba mostró un margen de seguridad adecuado.

**Palabras clave:** Alergenos, estandarización, potencia biológica, unidades alérgicas bioequivalentes, *Dermatophagoides*

## SUMMARY

### **Standardization of the biological potency of *Dermatophagoides pteronyssinus* allergenic extracts for immunotherapy**

Among the more clinically relevant allergens is the *Dermatophagoides pteronyssinus*

**Objectives:** To standardize the biological potency Allergenic Bioequivalent Units (BAU) of *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen extracts of three national laboratories.

**Material and methods:** Experimental, prospective, transversal, quantitative study of patients diagnosed with an allergy to *Dermatophagoides pteronyssinus* of Allergy and Immunology Service of Centro Médico La Raza. Extracts were applied in triplicate dilutions from 15 dilution in descending order until a erythema with 50mm, intradermally from Mexican laboratories: Allergomex, Allerstand and Allerquim. Statistical analysis was done using logistic regression, one way analysis of variance and Bonferroni test.

**Results:** We included 20 adult patients, 11 women and 9 men, aged between 16 and 45 years. Four patients had allergic asthma and rhinitis and 16 only had allergic rhinitis. There were no systemic anaphylactic reactions. Correlation coefficients of linear regression of the dose/response were to Allerstand  $r=0.55$ , Allergomex  $r=0.54$  and Allerquim  $r=0.57$  ( $p=0.001$ ). Dilutions calculated for 100,000 BAU/ml for each extract were Allerstand 1:26295, Allergomex 1:26341 and Allerquim 1:73993,

**Conclusions:** It was established biological potency of each tested extract. Allerquim laboratory extract showed equivalence greater dilution biological extracts compared to other laboratories. The test showed an adequate safety margin.

**Keywords:** Allergens, standardization, biological potency, bioequivalent allergy units, *Dermatophagoides*.

## ANTECEDENTES

### EXTRACTOS ALERGÉNICOS

Son mezclas heterogéneas de composición variable, formados por productos biológicos solubles como proteínas alergénicas y no alergénicas

La terapia específica con alergenos, es el único tratamiento específico y capaz de modificar el curso de las enfermedades alérgicas que aqueja al 30% de la población de países industrializados (1). Sin embargo, tiene desventajas que limitan su aplicabilidad, como los efectos adversos, fallas en la eficacia y efectividad, relacionados con la baja calidad de extractos alergénicos naturales, que son ingredientes activos de todas las inmunoterapias disponibles. Esto se ha modificado con el creciente avance de la tecnología molecular, que permite clonar proteínas altamente alergénicas para crear extractos recombinantes de alta calidad que reducen los efectos adversos al seleccionar solo aquellas proteínas de importancia biológica y mejorar la eficacia y efectividad del tratamiento.(2,3,4)

Entre los alérgenos de mayor relevancia clínica, se encuentra el ácaro del polvo *Dermatophagoides pteronyssinus*,(2,3,5,6,7,8) del cual se conocen las principales proteínas involucradas en la producción de enfermedades alérgicas, denominadas alergenos mayores. Der p 1, el primer alérgeno clonado, es una cisteín-proteasa (9,10) y cerca del 80% de las personas con alergia a los ácaros poseen IgE contra el grupo 1 y más del 90% contra el grupo 2. (8,11,12,13,14)

Desde su descripción en 1911 por Noon,(15,16) los extractos alergénicos utilizados son un factor determinante para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas (17,18). Sin embargo; dichos extractos, en sus presentaciones utilizables, contienen diferentes cantidades de constituyentes alergénicos y no alergénicos, difieren en su concentración protéica y potencia biológica y una mayor diversidad de productos alergénicos resulta de los procesos

diferentes de manufactura, los cuales pueden ser naturales o recombinantes obtenidos mediante ingeniería genética. Por lo que se requiere conocer la concentración protéica y potencia biológica, para utilizar productos seguros, de alta calidad y eficaces en la práctica clínica. Dicho proceso se denomina estandarización.(19,20,21,22,23)

Los métodos bioquímicos e inmunoquímicos usados para el control de lotes de extractos alérgicos, se basan en la unión de IgE a moléculas de alérgenos; sin embargo, estas mediciones no se relacionan con la habilidad que tiene una proteína de inducir una reacción alérgica de tipo I en vivo, es decir: la potencia biológica. Por lo tanto, es necesario realizar un ensayo biológico basado en los mecanismos de la alergia, para evaluar la capacidad de entrecruzamiento de alérgenos y la consecuente producción de la reacción alérgica de tipo I. (22.23.24)

La Academia Americana de Alergia Asma e Inmunología (AAAAI) (25) reconoce dos formas principales para la estandarización en vivo de los extractos: en pruebas cutáneas y cuantificación de IgE específicos para el alérgeno. Así mismo, el Centro para la Evaluación e Investigación de Biológicos (CBER), regulado por la FDA (Food and Drug Administration) en Estados Unidos, desarrolló un programa de estandarización de alérgenos basado en la potencia de los extractos, utilizando pruebas cutáneas intradérmicas cuantitativas y expresando los resultados en Unidades Alérgicas Bioequivalentes (BAU). La dilución del alérgeno aplicado en forma intradérmica para determinadas BAU, que produzca 50mm en sus diámetros transversos sumados de eritema ( $ID_{50}EAL$ ). Es el sistema utilizado para establecer la referencia de los extractos alérgicos. (26,27)



## MATERIAL Y METODOS

### OBJETIVO.

El objetivo del estudio fue estandarizar la potencia biológica en Unidades Alergénicas Bioequivalentes (BAU) de extractos alergénicos de *Dermatophagoides pteronyssinus* de los laboratorios nacionales Allergomex, Allerquim y Allerstand.

### DISEÑO DEL ESTUDIO

**Observacional, prospectivo, transversal, cuantitativo, analítico y descriptivo.**

El estudio se realizó en el servicio de Alergia e Inmunología de la UMAE Especialidades “Dr. Fraga Mouret” Centro Médico Nacional “La Raza” del IMSS. Del periodo comprendido entre Noviembre 2012-Febrero 2013.

Población de estudio:

Se identificaron pacientes con diagnóstico de asma y/o rinitis alérgica confirmados por pruebas cutáneas, que cumplieron con los criterios de selección, en el consultorio de procedimientos en la consulta externa de Alergología. Se realizó una entrevista por el investigador para plantear los objetivos del estudio, se entregó hoja de consentimiento informado y de recolección de datos donde se recabaron los datos de identificación del paciente, número de filiación institucional, sexo, edad, diagnóstico. Los investigadores recabaron los resultados de las pruebas en la hoja de recolección de datos para su análisis. Se reunió un número de veinte pacientes para realizar el estudio.

Método: Previa asepsia y antisepsia de la piel del brazo, se marcó con un número, que corresponde a la dilución del extracto y una letra que identificó a cada uno de los tres laboratorios (M,Q,ó S: Allergomex, Allerquim ó Allerstand) , los sitios a probar con marcas no permanentes. Se inyectó en la dermis del brazo un volumen de 0.05ml del alérgeno a diluciones por triplicado a partir de la dilución 15 en

orden decreciente, (tabla 1) con el bisel de la aguja hacia arriba, de tal manera que produjo una induración de 3mm de diámetro, posterior a lo cual se hizo la lectura del resultado transcurridos 15 minutos.

Para validar los resultados, éstos se compararon con un control positivo y uno negativo. El control positivo se realizó con la aplicación intradérmica de histamina (0.01mcg/ml) con lo cual se evitan resultados falsos negativos.

El control negativo se realizó con la aplicación intradérmica de solución diluyente.

Después de 15 minutos de inyectados los extractos y controles, el contorno del eritema se midió y se dibujó sobre cinta adhesiva transparente sobre la piel, la cual después se pegó a la hoja de resultados.

Se midieron los diámetros del eritema en yuxtaposición y la suma de ambos se utilizó para los cálculos finales. La dilución del extracto que produjo la suma de diámetros de 50mm indica la unidad.. Dado que la curva termina en cero, la pendiente es gradual y la determinación es precisa.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó un análisis descriptivo de las variables "suma de diámetros", "diámetro menor" y "diámetro mayor" mediante medidas de tendencia central y dispersión (promedio y error estándar). También se realizó el conteo de los sujetos en cada una de las diluciones de cada uno de los extractos.

Con la finalidad de comparar los promedios de dichas variables, a través de los grupos de extractos y a través de las diluciones, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA).

Con la finalidad de obtener la dilución que produce una suma de diámetros de 50mm, se realizaron los siguientes cálculos:

- a) Se generó un gráfico de diámetros mínimos, promedio y máximos para cada una de las diluciones de los diferentes extractos.

b) Se obtuvo el promedio de dilución con el que se alcanza la suma de los diámetros.

TABLA 1. TABLA DE DILUCIONES SERIADAS

NUMERO DE DILUCION	CONCENTRADO FINAL mcg/ml
1	1/300
2	1/900
3	1/2 700
4	1/8 100
5	1/24 300
6	1/72 900
7	1/218 700
8	1/696 100
9	1/1 968 300
10	1/5 904 900
11	1/17 714 700
12	1/53 144 100
13	1/159 432 300
14	1/478 296 900
15	1/1 434 891 000

## RESULTADOS

Se incluyeron 20 pacientes adultos con edades entre 16 y 45 años (media 28 años), de los cuales fueron 11 mujeres y 9 hombres. Todos los pacientes tenían diagnóstico previo de alergia a *Dermatophagoides pt.* realizado mediante pruebas cutáneas. Cuatro pacientes tenían diagnóstico de rinitis con asma alérgica y 16 pacientes sólo tenían rinitis alérgica

Durante la realización de las pruebas no se registraron eventos adversos. Todos los pacientes manifestaron sólo prurito local que cedió una vez que concluyó la prueba.

Se observó respuesta a la histamina en todos los pacientes.

Tabla 1. Medición de los diámetros del eritema y el promedio de dilución con que se alcanza la suma de los diámetros

Laboratorios	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Desv. típ.	Promedio de Dilución*
Allergomex Diámetro Mayor	29.975	30	11	64	10.15	
Allergomex Diámetro menor	21.7	22	10	35	6.47	
Allergomex Suma de los diámetros	48.825	46.5	20	75	14.68	4.3 ± 0.85
Allerquim Diámetro Mayor	28.05	28	14	40	7.73	
Allerquim Diámetro menor	20.625	22	10	33	5.74	
Allerquim Suma de los diámetros	48.675	50.5	24	71	12.51	6.6 ± 0.87
Allerstand Diámetro Mayor	30.25	29.5	18	48		6.1 ± 0.9

9.15

Allerstand Diámetro menor	21.325	20	10	40	7.05
Allerstand Suma de los diámetros	51.575	49.5	30	83	15.33
Histamina Diámetro Mayor	52.75	50.5	40	75	9.63
Histamina Diámetro menor	37.85	35	27	100	15.45
Histamina Suma de los diámetros	90.35	87	70	140	15.67

\*El promedio de dilución para cada laboratorio es el calculado para obtener la suma promedio de los diámetros que se alcanzaron para los 3 laboratorios. La cual fue diferente para cada uno de ellos

En la tabla 2 se esquematiza el coeficiente de correlación entre las diluciones del extracto alergénico y la producción del eritema que provoca una sumatoria de diámetros de 50mm. La cual fue  $\Sigma E=50$  mm para Allerstand  $r= 0.55$ , para Allergomex fue  $r= 0.54$  y para Allerquim  $r= 0.57$  (0.00). La respuesta biológica atribuible a los pacientes fue para Allerstand: 0.45, para Allergomex: 0.46 y para Allerquim: 0.43. Se observó una relación inversamente proporcional entre las diluciones de los extractos y los diámetros del eritema. La mediana de  $\Sigma E=50$  mm fue significativamente menor con el extracto de Allergomex, La potencia biológica equivalente a 100 000 BAU/mL con el laboratorio Allerstand fue con la dilución logarítmica con base 3  $=5.39$ , correspondiente a una dilución p/v de: 26 195; con Allergomex fue con la dilución logarítmica con base 3  $= 5.42$ , correspondiente a una dilución p/v de: 26 341 y con Allerquim fue con la dilución logarítmica con base 3  $= 6.09$ , correspondiente a una dilución p/v de: 73 993.

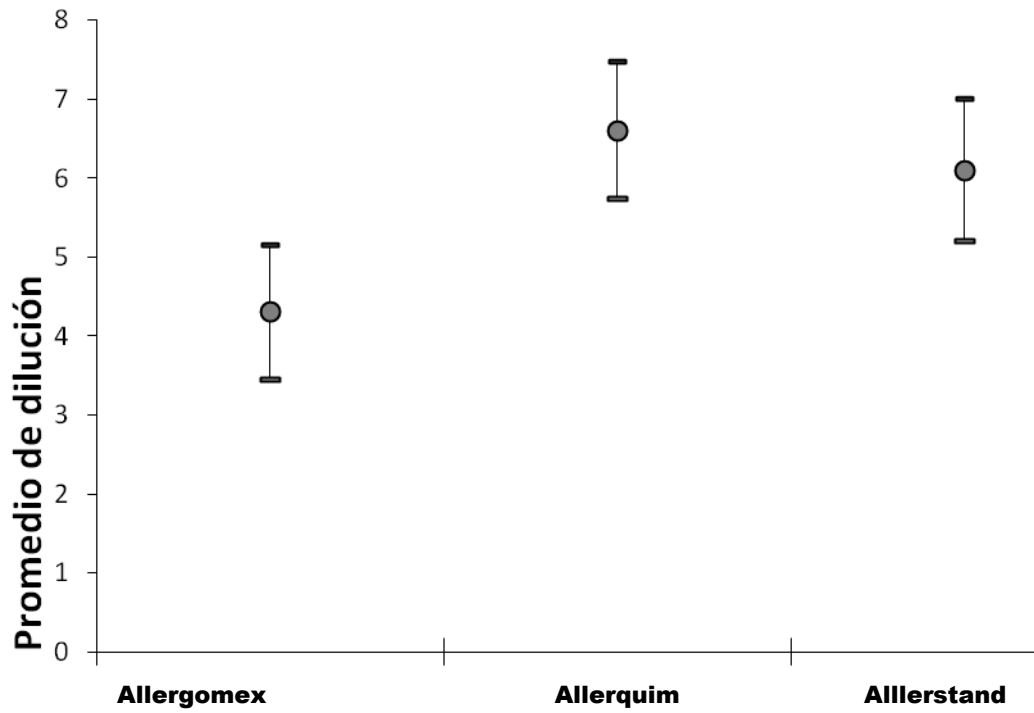
Se realizó prueba de ANOVA de una vía con análisis de Bonferroni para determinar la diferencia en el promedio de la dilución entre los diferentes extractos. Se encontraron diferencias significativas en el promedio de dilución de los extractos Allergomex vs. Allerquim ( $p<0.001$ ), entre Allergomex y Allerstand ( $p<0.001$ ) y entre Allerquim y Allerstand ( $p=0.018$ ) [Tabla 3

Tabla 2. Coeficiente de regresión (B) y correlación (R) de las diluciones de los alergenos; cálculo de la dilución requerida para una sumatoria (S) de 50 mm.

<b>Modelo</b>	<b>B</b>	<b>Error típ. B</b>	<b>R</b>	<b>Pb Respuesta individual</b>	<b>Cálculo de la dilución*</b>	<b>Sig.</b>
Allergomex	-				-	
Dilución	9.22	2.36	0.54	0.46	5.42	0.00
Allerquim	-				-	
Dilución	8.22	1.91	0.57	0.43	6.09	0.00
Allerstand	-				-	
Dilución	9.28	2.30	0.55	0.45	5.39	0.00

\*Smm/B±Error típ. B

Tabla 3. Prueba de ANOVA y análisis de Bonferroni para determinar las diferencias singinificativas entre los 3 laboratorios.



Se encontraron diferencias significativas en el promedio de dilución de los extractos Allergomex vs. Allerquim ( $p < 0.001$ ), entre Allergomex y Allerstand ( $p < 0.001$ ) y entre Allerquim y Allerstand ( $p = 0.018$ )

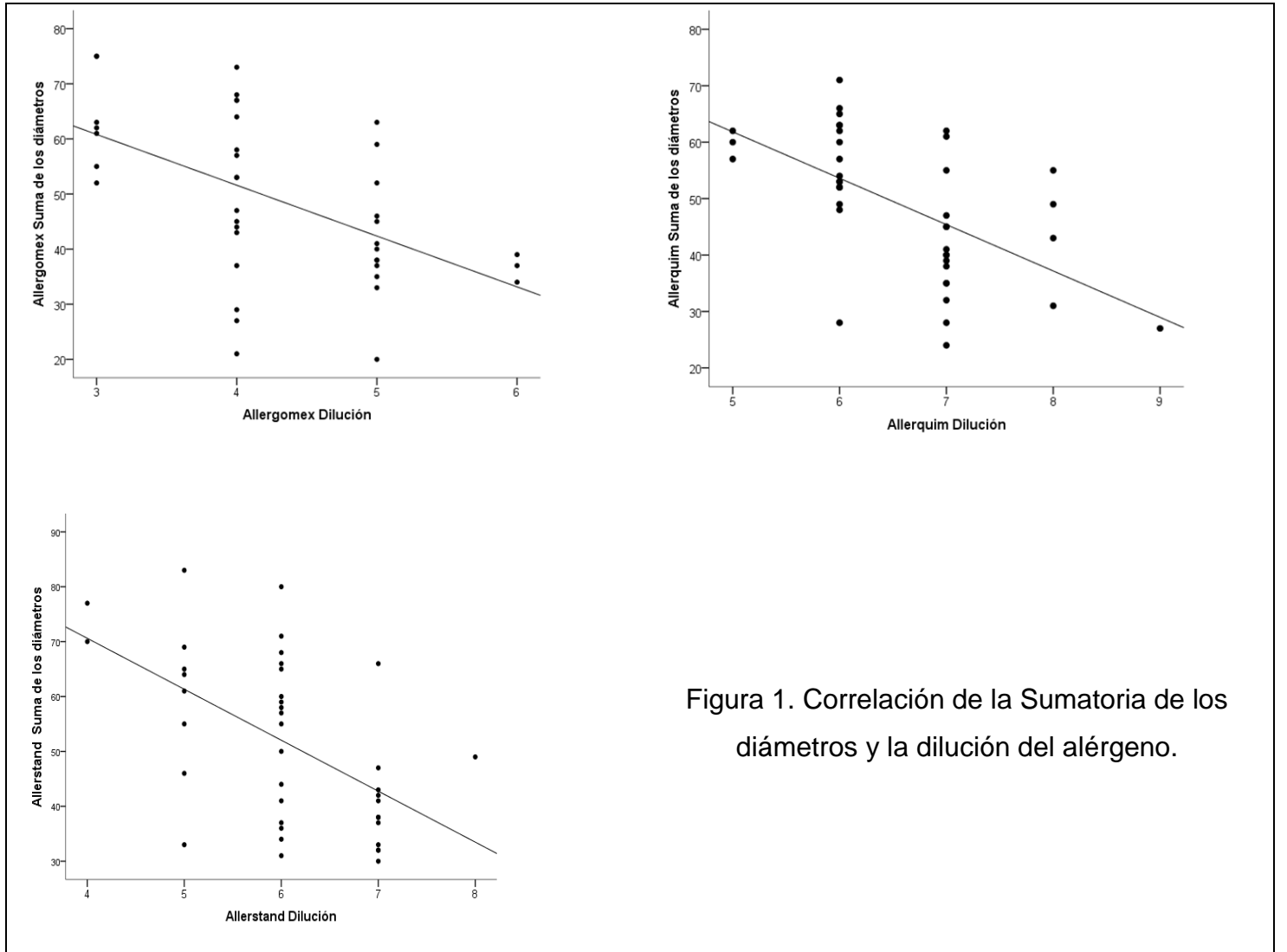


Figura 1. Correlación de la Sumatoria de los diámetros y la dilución del alérgeno.



## DISCUSIÓN

El éxito de la inmunoterapia depende del uso de vacunas alergénicas de alta calidad, estandarizadas de forma adecuada, y que puedan ser fabricadas de forma homogénea

La meta de la estandarización de los extractos alergénicos, es determinar su potencia biológica para el uso seguro y eficaz en la práctica clínica alergológica.<sup>(2,3,4)</sup> Se propone que los fabricantes de alergenos introduzcan vacunas en las que se haya probado su homogeneidad de acuerdo a un estándar de referencia interno <sup>(34)</sup>

La estandarización biológica, tiene la finalidad de establecer la unidad, (en este caso 100,000 BAU), indicando una actividad alergénica similar para todos los extractos, de tal manera que al conocer la potencia biológica de cada uno de ellos<sup>(29)</sup>, puedan utilizarse de forma intercambiable, sin descartar ninguno y así manejarlos de forma segura en la práctica clínica, considerando que el estudio *in vivo* se acerca más a la respuesta real, lo que es más importante, previene reacciones anafilácticas al conocerse el comportamiento biológico<sup>(2,3,4)</sup>. Por eso es recomendable realizar los estudios en pacientes sensibilizados, aunque pueden y están aprobados los protocolos de pruebas *in vitro* como isoelectroenfoque, la electroforesis SDS-PAGE, el inmunoblotting de IgE y la radioinmuno electroforesis cruzada (CRIE), que se aproximan más a la concentración de alergenos contenidos en el extracto e indirectamente a la respuesta en el individuo<sup>(33)</sup>.

La precisión de estos métodos dependerá, sin embargo, de la disponibilidad de un suero humano adecuado<sup>(33)</sup>, de la composición del “pool” de sueros y de la vacuna alergénica utilizada como estándar de referencia. <sup>(24-33)</sup>

La correlación de coeficientes de la regresión lineal para la relación dosis/respuesta reportada en este estudio fue baja  $r > 0.5$  para los tres extractos, siendo ésta por debajo de los estudios publicados para otros alergenos como pólenes, que en su mayoría han sido  $> 0.85$ .<sup>(29)</sup> Lo que confirma la amplia variabilidad para los diferentes extractos alergénicos.

Otra ventaja de conocer los resultados de la potencia biológica, es que son útiles como referencia para estandarizar otros lotes, así como otros laboratorios siempre que sean del mismo alérgeno, al compararlos con los ya estandarizados.<sup>(29)</sup>

En el análisis final del presente estudio, se pudo constatar que la respuesta atribuible al paciente presentó un rango variable que va desde el 43 hasta el 45% pero se matuvo el más alto porcentaje de la respuesta atribuible al extracto (57%), lo cual quiere decir que la prueba en las condiciones establecidas fue adecuada. Esto es explicable porque existe cierta variabilidad con las pruebas in vivo e in vitro, correspondiente a la sensibilidad de cada individuo, por lo que puede ser difícil comparar la potencia alérgica total de las vacunas cuando éstas son producidas por distintos fabricantes.<sup>(24, 33)</sup>

El tamaño promedio de las reacciones fue diferente entre los productos, lo que indica una actividad biológica diferente.

Vemos que el resultado de la estandarización BAU de los extractos, es la reducción de la variabilidad, seleccionando los lotes que cumplen criterios de calidad más estrictos con una clara significación clínica (eficacia/seguridad).

Hasta la fecha, no se conocen estudios realizados con alérgenos de manufactura nacional que pudieran compararse y es posible que nuevos estudios arrojen resultados diferentes. Se eligió el método utilizado en EEUU, que usa el diámetro del eritema para estandarizar y tanto como en otros estudios emplea el método de diluciones por triplicado en 15 concentraciones para obtener resultados confiables al cubrir un amplio rango de diluciones.<sup>(28)</sup> pudiéndose encontrar la unidad estandarizada para cada uno de los extractos utilizados.

En el futuro, es probable que los alérgenos recombinantes proporcionen estándares primarios para el análisis de alérgenos que no necesiten de un protocolo extra de estandarización, y una base para el desarrollo de nuevos productos para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas.<sup>(30,31,32)</sup> .que por el momento no están disponibles.

La posibilidad de contar con productos nacionales estandarizados, sin duda tendrá un impacto positivo en la mejora de los índices de eficacia y seguridad en el tratamiento enfermedades alérgicas. Siendo importante, por lo tanto, estar familiarizados con los distintos métodos de estandarización y sus unidades para el uso correcto de los extractos en la práctica clínica.

## CONCLUSIONES

El extracto alergénico de Allerquim mostró una potencia biológica significativamente mayor (5.39, correspondiente a una dilución calculada p/v de 1: 73,993)( $p=0.001$ ) que los extractos de los otros dos laboratorios..

Se pudo establecer la unidad de estandarización (100,000 BAU) para cada uno de los tres laboratorios. Siendo Allerquim el laboratorio que mostró una equivalencia biológica a una dilución mayor comparado con los extractos de Allerstand y Allergomex. La prueba mostró un margen de seguridad adecuado y puede reproducirse para otros alergenos de relevancia clínica

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Cox Et Al. Allergen Immunotherapy: A Practice Parameter Third Update. J Allergy Clin Immunol 2010; 127(1): S1-S55
2. Van Ree R. Indoor allergens: relevance of major allergen measurements and standardization. J Allergy Clin Immunol 2007;119: 270-7.
3. Grier TJ, Hazelhurst DM, Duncan EA, West TK, Esch RE. Major allergen measurements: sources of variability, validation, quality assurance, and utility for laboratories, manufacturers, and clinics. Allergy Asthma Proc 2002;23:125-31.
4. Burazer L, Milovanovic K, Milovanovic M, Vuckovic O, Velickovic TC, Gavrovic-Jankulovic M. Impact of *Dermatophagoides pteronyssinus* mite body raw material on house dust mite allergy diagnosis in a Serbian population. Med Vet Entomol 2011; 25:77-83
5. Jeong KY, Kim C, Yong TS. Enzymatic activities of allergen extracts from three species of dust mites and cockroaches commonly found in Korean home. Korean J Parasitol 2010;48:151-5.
6. Gough L, Sewell HF, Shakib F. The proteolytic activity of the major dust mite allergen Der p 1 enhances the IgE antibody response to a bystander antigen. Clin Exp Allergy 2001;31:1594-8.
7. Jacquet A. The Role of the House Dust Mite-Induced Innate Immunity in Development of Allergic Response. Int Arch Allergy Immunol 2010;155:95-105.
8. Smith WA, Hales BJ, Jarnicki AG, Thomas WR. Allergens of wild house dust mites: environmental Der p 1 and Der p 2 sequence polymorphisms. J Allergy Clin Immunol 2001;107:985-92.
9. Chapman MD, Wünschmann S, Pomés A. Proteases as Th2 adjuvants. Curr Allergy Asthma Rep 2007;7:363-7.
10. Smith PK, Harper JI. Serine proteases, their inhibitors and allergy. Allergy 2006;61:1441-7.

11. Park JW, Kim KS, Jin HS, Kim CW, Kang DB, Choi SY, et al. Der p 2 isoallergens have different allergenicity, and quantification with 2-site ELISA using monoclonal antibodies is influenced by the isoallergens. *Clin Exp Allergy* 2002;32:1042-7.
12. Piboonpocanun S, Malainual N, Jirapongsananuruk O, Vichyanond P, Thomas WR. Genetic polymorphisms of major house dust mite allergens. *Clin Exp Allergy* 2006;36:510-6.
13. Weghofer M, Thomas WR, Kronqvist M, Mari A, Purohit A, Pauli G, et al. Variability of IgE reactivity profiles among European mite allergic patients. *Eur J Clin Invest* 2008;38:959-65.
14. Hewitt CR, Brown AP, Hart BJ, Pritchard DI. A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: innate protection by antiproteases. *J Exp Med* 1995;182:1537-44.
15. Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* 1911;1:1572-3.
16. Freeman J, Noon L. Further observation on the treatment of hay fever by hypodermic inoculation of pollen vaccine. *Lancet* 1911;2:814-7.
17. Jeong KY, Hong CS, Yong TS. Recombinant allergens for diagnosis and immunotherapy of allergic disorders, with emphasis on cockroach allergy. *Curr Protein Pept Sci* 2006;7:57-71.
18. Ferreira F, Briza P, Inführ D, Schmidt G, Wallner M, Wopfner N, et al. Modified recombinant allergens for safer immunotherapy. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2006;5:5-14.
19. Himly et al. Standardization of allergen products: 1. Detailed characterization of GMP-produce recombinant Bet v 1.0101 as biological reference preparation. *Allergy* 2009; 64: 1038–1045
20. Grier TJ. Laboratory methods for allergen extract analysis and quality control. *Clin Rev Allergy Immunol* 2001;21:111-40
21. Van Ree R, Dorpema JW, Vieths S. Allergy vaccines: a need for standardization in mass units of major allergen. *Pharmeuropa Bio* 2005;2005:27-30.

22. Brunetto B, Tinghino R, Braschi MC, Antonicelli L, Pini C, Iacovacci P. Characterization and comparison of commercially available mite extracts for in vivo diagnosis. *Allergy* 2010;65:184-90.
23. Larsen JN, Dreborg S. Standardization of allergen extracts. *Methods Mol Med* 2008;138:133-45.
24. Kyoung Yong Jeong, et al. Optimization of Allergen Standardization *Yonsei Med J* 2011; 52(3):393-400.
25. Larenas-Linnemann D, Cox LS; Immunotherapy and Allergy Diagnostics Committee of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. European allergen extract units and potency: review of available information. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008;100:137-45
26. Canonica et al. Recommendations for Standardization of Clinical Trials with Allergen Specific Immunotherapy for Respiratory Allergy. A Statement Of A World Allergy Organization (WAO) taskforce. *Allergy* 2007; 62: 317–324
27. Chapman Et Al. The European Union CREATE Project: A model for international standardization of allergy diagnostics and vaccines. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 122,(5): 882-889
28. The use of standardized allergen extracts. Position Statement. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (AAAAI). *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:583-6.
29. S. Dreborg Et Al. Results of biological standardization with standardized allergen preparations. *Allergy* 1987;42 : 109-11
30. Mohapatra SS. Recombinant allergens and allergen standardization. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:921-2.
31. Kraft D, Schon A. *Molecular Biology and Immunology of Allergens*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1992.
32. Bousquet J. Clinical use of recombinant allergens and epitopes. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt. Sera Impfstoffe Frankf A M* 1994;87:257-62.
33. Maasch HJ, Wihl JA, Schultze-Werninghaus G, Geissler W, Wahl R. A manufacturer's criteria for in-house reference preparations for RAST inhibition. *Ann Allergy* 1987;59:29-33.

34. Allergen products (Producta allergenica). European Pharmacopeia  
1997;1063-8.



**II. ANEXOS**  
**HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

Nombre \_\_\_\_\_ NSS \_\_\_\_\_

Edad \_\_\_\_\_ años      Sexo: M \_\_\_ F \_\_\_\_\_

Fecha de ingreso: \_\_\_\_\_

Diagnóstico: \_\_\_\_\_

HISTAMINA	PAPULA (mm)	ERITEMA(mm)
(control positivo)		

EXTRACTO 1

EXTRACTO 2

EXTRACTO 3

EVANS  
(control negativo)