

Métodos diagnósticos en alergia.

Técnicas *in vivo* e *in vitro*

M. Fernández-Benítez

Técnicas *in vivo*

Podríamos definir las técnicas *in vivo*, como aquellas técnicas diagnósticas que se realizan en el propio paciente, bien sea con el fin de determinar el alérgeno responsable de la enfermedad, o bien con el fin de llegar a un diagnóstico clínico.

Pruebas cutáneas

Se conoce como alérgeno a aquella sustancia capaz de producir anticuerpos (Ac) en un organismo sensibilizado y dar lugar a una reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) al producirse un nuevo contacto del organismo con el alérgeno. El descubrimiento del antígeno (Ag) y su correspondiente (Ac) específico, responsable de la reacción Ag-Ac y por lo tanto de la sintomatología clínica, es la base del diagnóstico etiológico en las enfermedades alérgicas. Una anamnesis detallada nos dará el grado de agresividad del antígeno que buscamos y por lo tanto una pauta para elegir la prueba diagnóstica adecuada, evitando así riesgos innecesarios para el paciente. En muchas ocasiones es difícil sospechar el alérgeno por la historia clínica y tenemos que recurrir a realizar las pruebas diagnósticas con los grupos de alérgenos que más frecuentemente sensibilizan, dependientes en ocasiones del entorno en el que vive el niño.

Podríamos clasificar los test cutáneos según el tipo de sensibilización que queremos estudiar.

1. **Sensibilización de tipo inmediato:** mediada por IgE, para lo cual utilizamos la prueba del Prick o la prueba intracutánea como métodos más habituales. La reacción objetivada con estas pruebas está inducida fundamentalmente por la degranulación de los mastocitos cutáneos al contacto con el alérgeno, con la consiguiente liberación de mediadores como la histamina, triptasa, neuromediadores etc., responsables de la respuesta inmediata. Podemos encontrar una respuesta tardía a las 6-8 horas, como consecuencia de procesos asociados a la respuesta inicial, ya que muchos de los mediadores liberados por los mastocitos activados son mediadores quimiotácticos que actúan atrayendo hacia el lugar de la reacción células inflamatorias como eosinófilos, neutrófilos macrófagos, que contribuyen a perpetuar la inflamación. Los linfocitos CD4+ juegan un papel en la puesta en marcha y regulación de la respuesta tardía, por la generación y liberación de citocinas.
2. **Sensibilización tardía** en la que interviene la inmunidad celular (linfocitos T), para lo que utilizamos las pruebas epicutáneas, también conocidas como pruebas del parche. La reacción alcanza su máxima expresión entre las 24-72 horas y las células que participan en el infiltrado son predominantemente linfocitos del tipo Th1 y monocitos.

Técnicas cutáneas de hipersensibilidad inmediata

Prick test

Descrita por primera vez por Lewis y Grant en 1924 y modificada por Pepys en 1970, ha sido desde entonces la prueba más utilizada para el diagnóstico *in vivo*.

Se realiza colocando gotas de los extractos que queremos estudiar y de la solución control sobre la superficie volar del antebrazo. Posteriormente, con una aguja, siendo las más estandarizadas las derivadas de la aguja Morrow-Brown, o bien con aguja hipodérmica, se hace una puntura a través de la gota y se inserta en la epidermis con un pequeño ángulo. Hay que tener la precaución de colocar las gotas con una separación adecuada con el fin de evitar reacciones enmascaradas. Es necesario utilizar para cada extracto una aguja diferente. El prick test es una técnica segura, en la que es raro que se desencadenen reacciones sistémicas.

Intracutánea

Era la prueba más difundida y utilizada de las pruebas cutáneas antes de que se estableciese el prick test. Fue introducida por Mantoux en 1908, y adaptada por Schloss en 1912 para el diagnóstico de las enfermedades alérgicas.

Consiste en la inyección intradérmica de 0,05-0,07 ml de extracto alergénico, formando una pápula de 2-3 mm de diámetro. Las pruebas se pueden realizar en el antebrazo o en la espalda, al igual que con el prick, manteniendo entre los diferentes alérgenos una distancia de al menos 2 cm con el fin de evitar resultados enmascarados en caso de que se produzcan positividades; si se realizan en la espalda, también hay que cuidar la distancia a

la línea vertebral ya que se pueden dar falsos positivos debido a los reflejos axónicos.

A diferencia del prick test, las pruebas intracutáneas pueden desencadenar reacciones sistémicas, en torno a un 0,5% de los pacientes testados, por lo que en la anamnesis se deben obtener los datos precisos con el fin de realizar las diluciones adecuadas de los extractos, y evitar así posibles reacciones; hay que tener en cuenta que la concentración utilizada en las pruebas intracutáneas es de 1.000 a 10.000 veces menor que la necesaria para una prueba de prick positiva. En el caso de una reacción generalizada se debe aplicar un torniquete por encima de la inyección para disminuir la absorción del antígeno, y en el brazo contrario una dosis de adrenalina 1:1.000, además de las medidas habituales en este tipo de reacciones.

Las precauciones y errores más frecuentes, así como las diferencias existentes entre las dos técnicas de pruebas cutáneas para el estudio de hipersensibilidad inmediata, podemos verlos en las tablas I y II.

Cualquier estudio con test cutáneos requiere testificar con un control negativo y un control positivo. **El control negativo** habitualmente es el conservante utilizado para los

TABLA I.
Precauciones en los test cutáneos

- Supervisión del médico
- Utilizar extractos estandarizados
- Utilizar concentraciones adecuadas
- Utilizar control negativo y positivo
- Técnica adecuada
- Control de medicación del enfermo
- Registrar reacciones

TABLA II. Diferencias prick/intracutánea

	Prick	Intracutánea
Técnica sencilla	Sí	Sí
Rapidez	Sí	—
Molesta	No	Sí
Falsos positivos	Raro	Posible
Falsos negativos	Posible	Raro
Seguridad	Sí	±
Detecta IgE	Sí	Sí

extractos alérgicos; esto nos permite valorar que no da reacción inespecífica. Por otra parte, en aquellos pacientes con importante dermatografismo, la positividad del control negativo nos sirve para evaluar los resultados con los extractos e interpretar los falsos positivos en estas circunstancias.

Para el **control positivo** habitualmente se utiliza la histamina; nos permite valorar la respuesta cutánea y comparar con el resto de positividades. Por otra parte, detecta la supresión de reactividad en aquellos pacientes que se encuentran en tratamientos con fármacos que puedan inhibir la respuesta cutánea, como por ejemplo los antihistamínicos, o pacientes con baja reactividad a la histamina; además nos permite valorar si la técnica está bien realizada.

Medición e interpretación de los test cutáneos

La respuesta cutánea inmediata frente a extractos alérgicos, caracterizada por la presencia de pápula y eritema en el lugar de la prueba, se obtiene en los primeros 20 minutos, entre 8-10 minutos para la histamina y entre 15-20 para los alérgenos. Habitualmente utilizamos una regla milimetrada y

calculamos la media entre el diámetro mayor y menor de la pápula y/o eritema. Con el fin de dejar constancia en la historia clínica del paciente, con un papel cello sobre la reacción se dibuja la pápula con un rotulador y se deja registrado en la historia; sirve para comparar de forma objetiva las respuestas posteriores. Otras mediciones más sofisticadas, como las ultrasónicas o mediante Doppler con láser, nos permiten cuantificar el grosor y volumen de la pápula y poder estudiar la diferente reactividad de las pruebas.

Los criterios de positividad de las pruebas han sido estudiados por diferentes autores, valorando la pápula, eritema o ambos. Sabemos que en prick, positividades de más de 3 mm de pápula y 10 mm de mácula eritematosa son susceptibles de sensibilización clínica, pero siempre teniendo en cuenta la reactividad cutánea individual así como la utilización de extractos estandarizados. Para las pruebas intracutáneas seguiremos los criterios de Norman valorando pápula y eritema (tabla III). Un test intracutáneo lo consideramos positivo cuando es un habón de 5 mm de diámetro, restando ya el diluyente control.

En la interpretación de las positividades encontradas hay que ser cautelosos, ya que la positividad cutánea frente a un antígeno por si sola no implica la repercusión del antígeno

TABLA III. Valoración de las pruebas intracutáneas, según Norman

Grado	Eritema	Pápula
0	< 5 mm	< 5 mm
±	5-10 mm	5-10 mm
+	11-20 mm	5-10 mm
++	21-30 mm	5-10 mm
+++	31-40 mm	5-10 mm seudópodos
++++	> 40 mm	> 10 mm seudópodos

en las manifestaciones clínicas si no hay una clara relación con la anamnesis, pudiendo tratarse de positividad subclínicas o apatógenas, que merecen seguir su evolución. En otras ocasiones nos obliga a reinterrogar al paciente y tratar de confirmar si existe repercusión clínica mediante técnicas *in vitro* o incluso una prueba de provocación controlada. No obstante, en el caso de los inhalantes podemos afirmar que los test cutáneos representan el método diagnóstico más efectivo siempre que exista una historia sugestiva.

Hay que tener en cuenta los factores que pueden modificar la respuesta; el primer factor es la edad del paciente, y se sabe que a partir de los tres meses se puede obtener por prick una pápula significativa con el control positivo (histamina); no obstante, esta pápula va a ser más pequeña que en edades posteriores, por eso cuando realizamos pruebas cutáneas en lactantes, debido a esta menor reactividad, los criterios de positividad frente a los extractos van a tener que compararse con la reactividad frente al control positivo.

Cuando realizamos un estudio con pruebas cutáneas, sabemos que los resultados pueden verse alterados por múltiples factores. En primer lugar porque la técnica no ha sido correcta; en este sentido sabemos que la reactividad cutánea no es la misma en todas las partes del cuerpo, así la espalda es más reactiva que el antebrazo, la zona cubital es más reactiva que la radial, y la zona distal de la muñeca es menos reactiva que la proximal. Por otra parte, ya hemos dicho que la utilización de los extractos influye en la reactividad. Los extractos no estandarizados dan reacciones mayores que los estandarizados, muchas de ellas inespecíficas. Hay que tener en cuenta el ritmo circadiano, existe un pico de reactividad a última hora de la tarde y la reactividad es menor en la primera hora de la mañana.

Otro factor es también, y dependiendo de los alérgenos que estemos testificando, la estación del año; así por ejemplo, en pacientes con sensibilización al polen de gramíneas, durante la primavera presentarán mayor reactividad debido a la presencia de pólenes ambientales, situación que tenemos que tener presente para tomar precauciones, sobre todo con los test intracutáneos.

También puede interferir en los resultados la toma de medicación, como ocurre con los antihistamínicos. Dependiendo del tipo de antihistamínico tendremos que suspenderlo días antes de realizar las pruebas; por ejemplo, el astemizol entre 30-60 días, cetiricina entre 3-10 días, difenhidramina 1-3 días, hidroxicina 1-10 días, ketotifeno 5 días, por nombrar algunos de ellos. Otros fármacos como los beta-adrenergicos no influyen en la respuesta; en cuanto a los corticoides, parece que únicamente influyen los administrados por vía tópica cutánea y sobre todo en la respuesta tardía, al igual que pasa cuando hay corticoterapia prolongada por vía sistémica.

La inmunoterapia específica por un tiempo prolongado también puede modificar la respuesta cutánea al alérgeno en estudio. Se ha visto disminución de la respuesta sobre todo con inmunoterapia frente a veneno de himenópteros y algunos neumoalérgenos, utilizando este parámetro para ver la respuesta al tratamiento.

Técnicas cutáneas de hipersensibilidad tardía

Pruebas epicutáneas

Estas técnicas las utilizamos para estudiar la hipersensibilidad tardía de tipo tuberculínico (reacción tipo IV de la clasificación de Gell y Coombs). Este tipo de pruebas se pueden realizar por vía intradérmica, como es el caso de

la prueba del PPD, o aplicando directamente el alérgeno sobre la piel, prueba del parche o prueba epicutánea; tienen especial interés en las dermatitis de contacto y hay estudios en las dermatitis atópicas.

El objetivo de estas pruebas es reproducir la lesión cutánea, limitando local y temporalmente la reacción.

La prueba consiste en la aplicación de una determinada sustancia, a una concentración ya establecida, sobre la piel del paciente en un lugar sensible. Para ello, utilizamos las zonas paravertebrales y la cara anterior del antebrazo. Esta sustancia se mantiene 48-72 horas.

La sustancia a testar se coloca sobre una superficie algodonosa y una capa aislante que queda fijada a la piel mediante esparadrapo; la piel debe estar limpia y libre de lesiones. Se recomendará no mojar la zona; si se presenta prurito intenso, acudir a la consulta antes de las 48 horas; no exponerse a las radiaciones solares etc., ya que pueden modificarse los resultados.

Los parches se levantan a las 48 horas, y se marcan los puntos de las diferentes pruebas con el fin de poder identificarlos al realizar la lectura pasados 15-20 minutos. Las reacciones pueden ser desde eritema hasta pápulas, vesículas o ampollas (tabla IV). En el caso de

pruebas negativas, es conveniente volver a ver al paciente a las 24 horas siguientes por si hubiera aparecido alguna reacción.

En el resultado de estas pruebas podemos obtener falsos negativos por fallos en la técnica, como mala oclusión de la prueba, dilución no adecuada de la sustancia o también cuando el enfermo se encuentra en tratamiento con corticoides.

Pruebas de función respiratoria

La exploración funcional respiratoria nos sirve para confirmar el diagnóstico de asma, cuantificar la gravedad de la enfermedad, monitorizar la evolución y objetivar la respuesta al tratamiento.

En cualquier definición que tomemos de asma bronquial, nos habla de la obstrucción al flujo aéreo reversible de forma espontánea o tras broncodilatador. En todo paciente con sospecha de asma bronquial, debería hacerse una prueba de función respiratoria, siempre que la edad del niño lo permita. En concreto, una espirometría basal y tras broncodilatador nos servirá para el diagnóstico funcional de asma bronquial. En lactantes y niños pequeños que no cooperan en este tipo de prueba, se utilizarán, si es necesario, otro tipo de pruebas como dilución de gases, pletismografía o el chaleco insuflable; no obstante son de mayor complejidad y precisan de sedación.

Espirometría

La espirometría permite el estudio de: a) **capacidad vital forzada (CVF)**, parámetro indicador del volumen pulmonar; b) **flujo espiratorio en el primer segundo (FEV₁)**, parámetro indicador del volumen pulmonar y del flujo espiratorio; c) **flujos espiratorios**

TABLA IV. Valoración de los tests epicutáneos	
Grado	Reacción
±	Eritema mínimo
+	Eritema bien definido
++	Eritema y pápulas
+++	Eritema, pápula y vesículas
++++	Eritema, pápula, vesícula, ampolla y/o necrosis

medios o mesoflujos (FEV_{25-75%}), parámetro que indica el flujo espiratorio y que es independiente del esfuerzo, tiene un inconveniente que es la gran variabilidad de un enfermo a otro, incluso de una prueba a otra en el mismo paciente, por lo que no se debe valorar de una forma aislada; d) **flujo espiratorio máximo (PEF)** pico espiratorio de flujo, y e) **Cociente FEV₁/CVF**, que es un parámetro indicador de flujo espiratorio.

Cada uno de estos parámetros nos va a dar una información de gran importancia en el asma bronquial. La disminución del FEV₁ orienta hacia una obstrucción de vía aérea central (mayor de 2 mm de diámetro), el FEV_{25-75%} informa de la vía aérea periférica (menor de 2 mm de diámetro) y la relación FEV₁/CVF nos informa del grado de obstrucción. En cuanto al PEF, al que se ha dado gran importancia en la monitorización del asma bronquial, sobre todo en la edad pediátrica, ya hay estudios suficientes que nos indican que su fiabilidad es relativa y tiene indicaciones muy precisas, como objetivar la variabilidad en un asma inestable o ver la respuesta al tratamiento de una manera puntual, pero no se puede tomar como único criterio.

La técnica de espirometría consiste en una maniobra de capacidad vital forzada; es decir, a partir de una espiración normal efectuar una inspiración máxima, unos segundos de apnea y una espiración forzada hasta el volumen residual.

Es necesario que el personal que realiza la prueba esté entrenado y sepa dar una explicación adecuada al niño. Se deben realizar un mínimo de tres maniobras de capacidad vital forzada y un máximo de ocho, escogiendo la mejor de las curvas. Hoy en día casi todos los espirómetros detectan si la prueba está bien realizada.

La posición del paciente debe ser sentado erecto, con pinzas nasales y utilizar boquillas tamaño adecuado y no deformables. Los espirómetros deben ser calibrados de forma diaria, y cada laboratorio de función pulmonar debería tener sus tablas de referencia.

Los parámetros espirométricos nos permiten clasificar las alteraciones de la capacidad ventilatoria y establecer el grado de alteración funcional. Las alteraciones de tipo obstructivo cursan con un aumento de la resistencia de vías aéreas, y las que cursan con una reducción del volumen pulmonar, es decir una capacidad vital forzada (CFV), serían alteraciones de tipo no obstructivo. Hay patologías que cursan con características de ambos tipos de alteración ventilatoria, reducción de volumen y limitación al flujo aéreo; en este caso hablaremos de alteraciones ventilatorias de tipo mixto.

De acuerdo con los criterios de la American Thoracic Society, se considera un patrón de tipo obstructivo cuando el cociente FEV₁/CVF <75% (80% en niños), permaneciendo la CVF normal o ligeramente disminuida. Dependiendo del ritmo de disminución del FEV₁, tendremos diferentes grados de obstrucción (tabla V).

TABLA V. Grados de insuficiencia ventilatoria obstructiva	
Grados	FEV ₁ previsto
Normal	100
Leve	< 100 70
Moderada	< 70 60
Moderadamente grave	< 60 50
Grave	< 50 34
Muy grave	< 34

Test de broncodilatación (TBD)

El test de broncodilatación se debería realizar en todo paciente asmático al hacer la espirometría, ya que por mínima que fuese la obstrucción, si el test es positivo significa que existe una obstrucción al flujo aéreo, y no podrá considerarse una función pulmonar normal.

No existe una normativa establecida sobre la metodología del test de broncodilatación. No obstante, el Comité de Asma de la Sociedad Española de Inmunología Clínica y Alergología Pediátrica recomienda dos dosis inhaladas de salbutamol (0,2 mg), preferiblemente con cámara espaciadora con un minuto de intervalo entre ambas, esperando 10-20 minutos con el niño sentado y repitiendo la espirometría forzada. Consideraremos un test de broncodilatación positivo cuando exista un FEV_1 12% sobre el FEV_1 basal, o bien un FEV_1 9% sobre el FEV_1 teórico, o un $FEF_{25-75\%}$ 35%.

Los porcentajes de incremento del FEV_1 respecto al valor basal, se calculan: FEV_1 post- FEV_1 pre/ FEV_1 pre 100. El porcentaje respecto al valor teórico se calcula como: FEV_1 post- FEV_1 pre/ FEV_1 teórico 100.

En algunas ocasiones podemos observar que con 0,2 mg de salbutamol el test de broncodilatación es negativo, pudiéndose recurrir a 0,4 mg, o bien a una pauta corta (10 días) de corticoides orales.

Pruebas de provocación

Las pruebas de provocación consisten en poner de manifiesto la sintomatología clínica referida por el paciente tras la exposición al alérgeno, cuando no es posible demostrarlo por otras técnicas diagnósticas. De la propia definición podemos deducir que son pruebas que conllevan un riesgo para el paciente, por lo que hay que tomar todas las precauciones.

Este tipo de pruebas las utilizamos cuando por la historia clínica y las diferentes técnicas del laboratorio es difícil encontrar el factor etiológico pese a que éste se sospecha. Otras veces existe una discordancia entre la historia clínica y los resultados de los test, *in vivo* e *in vitro* y es necesario demostrar cual de los alérgenos tiene repercusión clínica. En ocasiones, este mismo tipo de pruebas las utilizamos con el fin de demostrar una tolerancia al alérgeno.

Las pruebas de provocación pueden ser bronquiales, nasales, conjuntivales u orales, dependiendo del alérgeno que queramos estudiar y del órgano de choque.

Pruebas de provocación bronquial

En ocasiones es difícil demostrar que existe una obstrucción reversible al flujo aéreo, o bien tenemos dificultad por la historia clínica para determinar si la sintomatología es compatible con el diagnóstico de asma bronquial. Otras veces, nos encontramos con que existe una discordancia entre la historia clínica, los resultados de los tests cutáneos o las diferentes pruebas de laboratorio, debiendo recurrir entonces a las pruebas de provocación bronquial.

Este tipo de pruebas nos ponen de manifiesto la existencia de hiperreactividad bronquial (HB), que definimos como "la sensibilidad anormal de la vía aérea, expresada como un incremento de la obstrucción al flujo aéreo tras la exposición a diversos estímulos o agentes farmacológicos, químicos y físicos". Un primer tipo de HB es la **hiperreactividad bronquial inespecífica**, que sería aquella obstrucción al flujo aéreo desencadenada por estímulos farmacológicos, como la histamina o metacolina, o exposición a estímulos no farmacológicos, como el ejercicio físico, soluciones hipo

o hipertónicas e hiperventilación con aire frío. En la practica diaria en niños, la más utilizada es la prueba de ejercicio y en ocasiones la metacolina/histamina. Pese a ser una prueba de gran utilidad diagnóstica en niños, una determinación aislada de la hiperreactividad bronquial inespecífica no puede ser considerada ni muy sensible ni específica para el diagnóstico de asma, ya que existen otras patologías pulmonares como la fibrosis quística, incluso sinusitis, que pueden cursar con hiperreactividad bronquial. Un segundo tipo de HB es la **hiperreactividad bronquial específica**, que es aquella que refleja la respuesta bronquial frente a estímulos específicos (alergenos), que afectaría exclusivamente a aquellos pacientes asmáticos sensibilizados.

Prueba de provocación con ejercicio

Sirve para poner de manifiesto la hiperreactividad bronquial en niños con asma inducida por ejercicio puro, que son muy pocos casos, y en niños con asma bronquial en los que el ejercicio es un desencadenante más.

La prueba consiste en realizar una espirometría basal y a continuación un esfuerzo físico que se puede realizar sobre un tapiz rodante con 15° de inclinación o en una bicicleta ergométrica. Diferentes estudios demuestran que la carrera libre sobre tapiz rodante es más asmógena que la bicicleta. La duración del ejercicio es de 6-8 minutos, el paciente debe respirar por la boca, para lo cual utilizaremos unas pinzas nasales. La intensidad del ejercicio tiene que ser lo suficiente como para alcanzar una frecuencia cardiaca submáxima, calculándose ésta como el 80% de la frecuencia cardiaca máxima (220-edad en años). Dado que las condiciones ambientales de humedad, frío, etc., influyen sobre la hiperreactividad bronquial, debe reali-

zarse siempre en las mismas condiciones, siendo las recomendadas una temperatura ambiental de 20-25 °C y una humedad relativa del 50-60%.

El paciente debe estar asintomático en el momento del estudio con una espirometría basal normal, no debe haber tomado medicación previa (tabla VI) y no debe haber realizado ejercicio físico, por lo menos en las cuatro horas anteriores a la prueba, ya que podría resultar negativa debido al periodo refractario. No se realizará la prueba si existen otro tipo de contraindicaciones como patología cardiaca, traumatológica, etc.

Una vez realizada la prueba, se repite la espirometría a los 5, 10, 15, 20 y 30 minutos de cesar el ejercicio; se considerará positiva cuando exista una disminución del FEV₁ de un 15% o más en relación con el valor basal. Además de esta caída del FEV₁, algunos pacientes presentan tos, sibilancias y opresión torácica, siendo todo ello reversible tras la administración de un broncodilatador de acción rápida.

TABLA VI. Fármacos que modifican la respuesta bronquial

Fármaco	Evitación
2 acción corta	8 horas
2 acción retardada	48 horas
2 oral	24-48 horas
Aminofilina	12 horas
Teofilina	48 horas
Corticoides inhalados	1 semana
CGS, ketotifeno	48 horas
Nedocromil	48 horas
Hidroxicina, ceterizina	5 días
Otros antihistamínicos	48 horas
	24 horas

Prueba de provocación con metacolina/histamina

Estos dos agentes farmacológicos son los más utilizados después del ejercicio; la elección de uno u otro depende de las preferencias de cada grupo y de las posibilidades de obtener las sustancias.

La metacolina ofrece la ventaja de que se pueden administrar dosis altas sin grandes efectos colaterales, únicamente tos, sudoración y sialorrea, mientras que la histamina en concentraciones superiores a 32 mg/ml produce *flushing*, cefalea, náuseas y en ocasiones edema de vías aéreas altas.

Tanto la metacolina como la histamina se diluyen en una solución salina tamponada a la que se añade fenol al 0,4% con el fin de evitar la contaminación.

La técnica consiste en efectuar en primer lugar una espirometría basal, a continuación la inhalación del diluyente y otra espirometría, y posteriormente se administra metacolina o histamina por vía aerosólica en concentraciones crecientes, valorándose la espirometría tras cada concentración. Los resultados se comparan con la espirometría posterior a la inhalación del diluyente.

El método de inhalación puede ser a **volumen corriente**, en el que el aerosol se inhala mediante una boquilla, con la nariz ocluida y durante un periodo de tiempo determinado. El método más utilizado es el de Cockoft, en el que cada solución aerosolizada se inhala durante dos minutos y el débito del nebulizador se mantiene constante entre 0,13 y 0,16 ml/min.

Otro método es el **método dosimétrico**, en el que el aerosol se genera de forma intermitente, mediante un nebulizador conectado a un dosímetro. El aerosol se inhala mediante cinco respiraciones consecutivas a capacidad

inspiratoria; la válvula se abre coincidiendo con el comienzo de la inspiración y se cierra tras un periodo predeterminado.

En los niños hay que tener precaución al aumentar las concentraciones, debido a que la hiperrespuesta bronquial es más intensa que en los adultos.

El parámetro de elección para objetivar los resultados es el FEV₁; no obstante, pueden utilizarse otros parámetros como la resistencia de vías aéreas o su inversa, la conductancia, así como la observación de las áreas de las curvas flujo volumen. En niños que no consiguen mantener el esfuerzo y la atención que requiere la prueba, es más recomendable aconsejar que acudan a la consulta en el momento de la crisis con el fin de objetivar la obstrucción al flujo aéreo y la recuperación tras el broncodilatador.

Para la interpretación de los resultados utilizaremos el PC20 (concentración de metacolina o histamina que produce una caída del FEV₁ de un 20%). Este valor se obtiene a partir de una curva que se construye representando en abscisas las concentraciones del agonista, sin tener en cuenta las dosis acumulativas (escala logarítmica), y en las ordenadas los descensos del FEV₁ en relación con la espirometría obtenida tras el diluyente. El cálculo matemático de la PC20 se expone en la tabla VII. También se puede utilizar una fórmula matemática logarítmica, con el inconveniente de que los cálculos son más complicados. Hoy en día muchos espirómetros incluyen estos cálculos y nos representan el área de la curva. Otros resultados que se pueden obtener a partir de los datos obtenidos son el índice de reactividad, el estudio de la respuesta máxima y la pendiente de la curva dosis-respuesta, que nos sirven para identificar de una forma más exacta la hiperreactividad bronquial. La interpretación de los resultados, teniendo en cuenta el

TABLA VII. Cálculo matemático del PC20

$$PC20 \text{ mg/ml} = \frac{(20 - R1) (C2 - C1)}{(R2 - R1)} + C1$$

C1 = Concentración de agonista que produce una caída FEV₁ inmediatamente menor del 20%.

C2 = Concentración de agonista que produce una caída FEV₁ inmediatamente mayor del 20%.

R2, R1 = Caídas del FEV₁ producidas por C2 y C1.

cálculo matemático para la PC20, sería la indicada en la tabla VIII.

Debido al riesgo que entraña esta prueba es necesario en el lugar donde se realice tener preparada medicación de urgencia. Es aconsejable previo a la realización de la prueba solicitar el consentimiento informado.

Pruebas de provocación bronquial específica

Este tipo de pruebas buscan inducir el broncospasmo de forma deliberada con el fin de confirmar la etiología de la enfermedad. Se utilizan cuando existe una discordancia entre la historia clínica y los resultados de las diferentes técnicas *in vivo* e *in vitro*. No están indicadas cuando el asma está bien filiada, cuando el paciente presenta síntomas o alto grado de sensibilización, o en pacientes con otros factores de riesgo.

TABLA VIII. Interpretación de resultados en función del PC20

PC20	Interpretación
> 16 mg/ml	Normal reactividad
4-16 mg/ml	Límite reactividad
1-4 mg/ml	Leve reactividad
< 1 mg/ml	Moderada/grave

En cuanto a la metodología, es similar a la provocación con metacolina o histamina pero con un mayor riesgo, dado que vamos a administrar el alérgeno. Hay además que tener en cuenta que se pueden detectar reacciones tardías a las 4-8 horas, e incluso retardadas a las 24 horas.

La prueba se iniciará con una espirometría basal. A continuación se efectúa la inhalación del diluyente utilizado para el alérgeno. Si la espirometría permanece inalterable, se continúa la prueba administrando concentraciones crecientes del antígeno, valorando la respuesta tras cada concentración. Una caída del FEV₁ >15% del basal (el obtenido tras el diluyente) se considera una prueba positiva.

Si no ingresamos al paciente, es conveniente, con el fin de determinar las respuestas retardadas, monitorizar el PEF durante al menos 24 horas. En este tipo de pruebas, al igual que en las anteriores, es preciso contar con la medicación necesaria para tratar la crisis de asma que se nos pueda presentar, de la misma manera que es conveniente solicitar el consentimiento informado.

Prueba de provocación conjuntival

La prueba consiste en depositar en el fondo del saco conjuntival el diluyente que utilizaremos con el alérgeno, se esperan 15 minutos

y se objetiva la sintomatología. Si es negativa, empezaremos con la dilución más alta del alérgeno en estudio, depositándolo en el saco conjuntival. Para ello utilizaremos diluciones 100-1.000 veces mayores que la concentración que nos dio positivo en el test cutáneo, dependiendo de la sensibilización del enfermo, e iremos probando diferentes concentraciones; de esta forma, evitaremos reacciones importantes. Se considera una prueba positiva cuando se objetiva inyección conjuntival, epífora, prurito ocular y fotofobia.

Al igual que en otras pruebas de provocación, el enfermo debe estar asintomático y evitar fármacos que puedan enmascarar los resultados. Es recomendable solicitar el consentimiento informado, dado que es una prueba que no está libre de riesgo.

Prueba de provocación nasal

Fue introducida por primera vez por Blackley en 1873, a la vez que la prueba de provocación conjuntival, quien observó que depositando granos de polen en las cavidades nasales de pacientes con rinitis estacional se desencadenaban los síntomas típicos de estornudos, hidrorrinorrea y prurito, que podían durar horas e incluso algunos días.

La prueba consiste en hacer inhalar mediante nebulización el alérgeno en estudio, siendo los más frecuentes los inhalantes como polen, ácaros, hongos o epitelios. Hay que tener precaución debido a que pequeñas partículas del aerosol de alérgeno pueden alcanzar la vía aérea bronquial y desencadenar broncospasmo. La respuesta se puede presentar de forma inmediata a la provocación, o de forma más tardía. El enfermo tiene que estar asintomático y no seguir medicación que pueda enmascarar los resultados.

En la interpretación de la prueba podemos valorar síntomas clínicos como salvas de estornudos, rinorrea acuosa, prurito nasal y aumento de la resistencia de la vía aérea nasal mediante rinomanometría, pero también nos permite el estudio de la secreción nasal, estudio de las células, así como los diferentes mediadores que se liberan en la respuesta inmediata y tardía de las reacciones mediadas por IgE.

Prueba de provocación oral

Se utiliza fundamentalmente para el diagnóstico de la alergia alimentaria. También es provocación oral la que hacemos en la alergia a medicamentos.

En la alergia alimentaria, cualquier prueba de provocación debe ir precedida de una prueba de exclusión o eliminación del alimento que sospechamos responsable de la sensibilización, por lo menos durante una o dos semanas previas a la provocación.

Dependiendo de la edad del paciente, haremos una prueba abierta; es decir, el médico y el paciente conocen lo que se está administrando. Este tipo de prueba la utilizamos en lactantes y niños pequeños. Se puede hacer una exposición a simple ciego en la cual el paciente desconoce lo que se le administra pero no el médico, o una prueba a doble ciego, donde ambos, paciente y médico, desconocen si se administra el alimento o placebo. Esta última es la considerada por algunos autores como la prueba ideal para el diagnóstico.

La administración del alimento en la prueba abierta será tal cual, como leche, frutos secos, frutas, etc., o bien enmascarado con otros alimentos. Cuando hacemos el estudio a doble ciego, se prepara liofilizado de 25-500 mg dependiendo de la intensidad de los síntomas

o grado de sensibilización que sospechemos. La sintomatología se puede presentar de forma inmediata en los casos mediados por IgE, o de forma más tardía 24-48 horas, como ocurre en el caso de la dermatitis atópica.

Es conveniente que la prueba sea objetivada por el médico en la consulta, o bien ingresando al paciente. De esta manera podemos observar los síntomas y tratarlos, no siendo aconsejable que se realice en el domicilio, dado que no está libre de riesgo. Es por ello por lo que también debe solicitarse el consentimiento.

Técnicas *in vitro*

Los avances de la inmunología han permitido estudiar los fenómenos implicados en las reacciones de hipersensibilidad. Hoy en día contamos con una serie de técnicas que permiten establecer un correcto diagnóstico alergológico y nos sirven de ayuda en la monitorización del enfermo alérgico y su respuesta al tratamiento. No obstante, como cualquier otra técnica hay que ser conscientes de que son un complemento diagnóstico a la historia clínica y a las pruebas realizadas *in vivo*. Podríamos resumir diciendo que las pruebas *in vitro* nos confirman el diagnóstico sospechado por la historia y tests cutáneos, o bien las reservamos para cuando no se puedan realizar los tests *in vivo*, por circunstancias especiales de los pacientes. Es fundamental que las pruebas de laboratorio sean sensibles; tienen que detectar resultados positivos en los pacientes alérgicos cuando enfrentamos el suero al alérgeno específico. Por otra parte, tienen que ser específicas; es decir, tenemos que obtener un resultado negativo cuando estudiamos el suero de una persona que no es alérgica al alérgeno que le suministramos.

Podríamos clasificar las técnicas *in vitro* en dos grandes grupos: las que estudian la reac-

ción antígeno-anticuerpo, como serían la IgE sérica, IgE antígeno específica e IgG. y las que permiten determinar mediadores que se liberan en la reacción antígeno-anticuerpo, tales como el test de liberación de histamina, la determinación de leucotrienos, la determinación de triptasa, el test de activación de basófilos, la proteína catiónica del eosinófilo, etc. Otras técnicas, como el Immunoblotting, nos permiten el estudio de reacciones cruzadas de diferentes antígenos y la detección de determinantes antigénicos.

Inmunoglobulina E (IgE)

La cuantificación de esta inmunoglobulina en suero constituye hoy una técnica de rutina en el diagnóstico alergológico. Una de las propiedades del anticuerpo IgE es unirse mediante el receptor Fc a mastocitos y basófilos, sensibilizando estas células de tal forma que, cuando se encuentran nuevamente con el antígeno específico, son activadas y liberan sus mediadores inflamatorios. No obstante, hay que tener en cuenta que la elevación de la IgE no es patognomónica de los procesos alérgicos. Podemos observar elevaciones en otras patologías como son las parasitosis, algunas inmunodeficiencias, etc., e incluso es posible observar niveles normales de IgE en pacientes alérgicos, como es el caso de los sensibilizados al polen, que fuera de la estación polínica pueden presentarse valores dentro de la normalidad.

Al valorar los resultados de la cuantificación de IgE hay que tener en cuenta que se modifican con la edad, el sexo, los antecedentes familiares de patología alérgica y el propio proceso alérgico. En la tabla IX podemos observar los valores de la IgE total según la edad.

La valoración de la IgE también nos sirve para evaluar la evolución o respuesta al tratamiento etiológico; sabemos que el descenso de los

niveles de IgE se considera un criterio de remisión de la enfermedad. En los niños, el aumento de una desviación estándar en función de la edad aumenta diez veces el riesgo de desarrollar una enfermedad alérgica.

Inmunoglobulina E antígeno-específica

La determinación de IgE antígeno-específica nos permite conocer la sensibilización a un determinado alérgeno, confirmando la sospecha clínica de la historia y la prueba cutánea. Esta técnica, que en la actualidad se utiliza de rutina en el diagnóstico alergológico, hay que interpretarla con cautela, dado que puede haber resultados falsamente positivos, como ocurre en aquellos pacientes que presentan tasas muy altas de IgE, o, lo contrario, falsos negativos, por ejemplo cuando hay IgG antígeno-específica que impide la unión de la IgE. Resumiendo, podemos decir que la determinación por sí sola de la IgE antígeno-específica

no es diagnóstica, pero sí necesaria para llegar al diagnóstico etiológico que nos va a permitir poder instaurar un tratamiento adecuado de evitación y/o inmunoterapia.

Los resultados de IgE antígeno-específica se expresan en KU/l. y se consideran positivos valores por encima de 3,5 KU/l; no obstante, depende también del tipo de alérgenos que estemos estudiando (tabla X).

IgG4

La determinación de IgG4 no es una técnica de rutina. Se utiliza fundamentalmente para seguimiento de la respuesta a la inmunoterapia, observándose que los pacientes con tratamiento inmunoterápico presentan IgG4 aumentada en el curso del tratamiento frente al antígeno que se está administrando.

Los anticuerpos IgG4 se denominan también anticuerpos bloqueantes. Parece ser que tienen un efecto protector, impidiendo que el alérgeno se fije a los receptores de IgE. No obstante, algunos autores han demostrado anticuerpos específicos IgG4 frente a alérgenos alimentarios en pacientes con IgE antígeno-específica negativa.

TABLA IX.
Valores de IgE total según la edad

Edad	IgE (KU/l)	+ 1 DE	+ 2 DE
Cordón	0,3		
6 semanas	0,7	2,1	6,1
6 meses	2,7	6,6	16,3
9 meses	2,4	4,2	7,3
1 año	7	21	58
2 años	11	26	61
3 años	11	21	40
4 años	20	37	70
7 años	26	75	221
10 años	39	115	337
14 años	32	78	187

TABLA X.
Valores de IgE antígeno-específica

IgE antígeno específica (KU/l)	Valoración
> 0,35 (clase 0)	Indetectable
0,35 - 0,7 (clase 1)	Débil
0,7 - 3,5 (clase 2)	Moderada
3,5 - 17,5 (clase 3)	Elevada
17,5 - 50 (clase 4)	Muy elevada
50 - 100 (clase 5)	Muy elevada
> 100 (clase 6)	Muy elevada

Test de liberación de histamina (TLH)

Mediadores como la histamina son sustancias biológicamente activas que se liberan del mastocito de los tejidos o de los basófilos sanguíneos cuando se produce la reacción antígeno-anticuerpo. Este test nos permite estudiar de una forma directa *in vitro* la respuesta alérgica y conocer la reactividad frente a diferentes alérgenos. También se ha observado cómo en el transcurso de la inmunoterapia se producen modificaciones en la liberación de histamina antígeno-específica.

Determinación de leucotrienos

Los sulfidoleucotrienos son productos del ácido araquidónico, sintetizados por diferentes células como mastocitos, basófilos, eosinófilos, etc., y juegan un papel fundamental en las reacciones de hipersensibilidad inmediata mediadas por IgE. Se sabe que los basófilos generan leucotrienos en respuesta a un antígeno de manera IgE dependiente, en presencia de interleucina 3 (IL3), y esta liberación de leucotrienos es paralela a la liberación de histamina. No obstante, los leucotrienos pueden ser generados por otras células inflamatorias además de basófilos y mastocitos, por lo que su determinación también puede ser útil en otros procesos no mediados por IgE, como puede ser en el asma inducida por aspirina.

Proteína catiónica del eosinófilo (ECP)

La proteína catiónica del eosinófilo es una proteína que se encuentra en los gránulos de los eosinófilos junto a otras proteínas. En procesos alérgicos como el asma bronquial se ha

podido objetivar cómo la activación de los eosinófilos produce la liberación de productos oxidativos y proteínas catiónicas responsables del daño tisular y de la hiperreactividad bronquial inespecífica. El aumento de la proteína catiónica del eosinófilo se relaciona bien con el aumento de eosinófilos; por otra parte, la disminución de la ECP en sangre guarda relación con la disminución de las crisis de asma y la mejoría de la función pulmonar. Es un marcador de inflamación que nos sirve para evaluar la eficacia del tratamiento; no obstante, la elevación de la ECP se puede producir también en otras patologías en las que interviene la activación de los eosinófilos, tales como la dermatitis atópica, enfermedades parasitarias, etc.

Determinación de triptasa

La triptasa es una proteasa neutra de los mastocitos humanos, considerada un marcador de reacciones mastocitarias, que se libera después de un estímulo de tipo inflamatorio junto con la histamina. Se ha comprobado como se libera en reacciones anafilácticas y en enfermedades que implican a los mastocitos, cómo son la rinitis alérgica, el asma bronquial y la mastocitosis sistémica. Se puede detectar en suero a las 3 horas de producirse la reacción y hasta 12-14 horas después. En un individuo normal la triptasa en suero es indetectable. La determinación de triptasa hoy en día está indicada en las reacciones anafilácticas, aunque también algunos autores la utilizan en la monitorización de pruebas de provocación antígeno-específica.

Bibliografía

1. American Thoracic Society: Guidelines for Methacholine and exercise challenge Testing 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000. 161 309-329.

2. Comité de Asma SEICAP: Guía para la atención del niño asmático. Protocolo diagnóstico y terapéutico del asma infantil. *Allergol et Immunopathol*. Monográfico 1, 2000.
3. Fernández Benítez M: The role of airway resistance in the diagnosis of bronchial hyperreactivity. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1997; 7 (5): 286-287.
4. Fernández Benítez M, Córdoba H, Santos F., Oehling A: In vitro Ketotifen protection in Bronchial hyperreactivity. *J Invest Allergol Clin Immuno* 1991; 1 (6): 377-382.
5. García BE, Sanz M L, Fernández-Benítez M, Diéguez I, Oehling A: Value of IgG4 antibodies against food in atopic dermatitis. *Allergol et Immunopathol* 1990; 18 (4): 187-190.
6. Middleton Elliot Jr, Reed Charles E, Ellis Elliot, y cols.: *Allergy. Principles and Practice*. Ed. Mosby, 1998.
7. Larrad Mur L, Lasierra Díaz M P: Determinación de IgE total. Métodos de detección de IgE específica: especificidad, sensibilidad, rentabilidad e interpretación. Otros métodos de utilidad en alergia infantil. *Pediatría Integral Formación* continuada en *Alergología Infantil. Métodos diagnósticos en alergia (II)*. Técnicas *in vitro* 2000; 6: 3-39.
8. Oehling A: *Alergología e Inmunología Clínica*. Ed. Interamericana Mc Graw-Hill 1995.
9. Oehling A, Fernández Benítez M, Córdoba H: Pruebas alérgicas de diagnóstico *in vivo*". *Tratado de Medicina Interna. Medicina Alergología I* 1993; 38 (6): 1675-1680.
10. Oehling A, Fernández Benítez M; Córdoba H, Sanz M L: Skin manifestations and immunological parameters in children food allergy. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1997; 7 (3): 155-159.
11. Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica: Pruebas de provocación bronquial inespecíficas y específicas, Laboratorios ASTRA, 1993.
10. Oehling A, Fernández Benítez M; Córdoba H, Sanz M L: Skin manifestations and immunological parameters in children food allergy. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1997; 7 (3): 155-159.

NOTAS
