

UTILIDAD DE LOS ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS EN EL ASMA BRONQUIAL

P. García Ortega

Unidad de Alergia, Servicio Medicina Interna, Hospital Joan XXIII, Tarragona.

Asma y atopía

El término alergia fue introducido por Von Pirquet en 1906 para describir la faceta nociva de la activación del sistema inmune, es decir, la reacción del sistema inmune contra el huésped. Más adelante, ya en el inicio de la era inmunológica, Gell y Coombs clasificaron estas respuestas alteradas según sus mecanismos patogénicos, describiendo las clásicas reacciones de hipersensibilidad inmediata o de tipo I (mediada por reagentes), citotóxicas o de tipo II (mediada por anticuerpos), semiretardada o de tipo III (mediada por inmunocomplejos) y retardada o de tipo IV (mediada por linfocitos)¹. Por su parte, ya en 1916, Coca y Cooke^{2,3} llamaron la atención acerca de la elevada frecuencia con la que determinadas enfermedades (rinitis, asma, eczema) se presentaban en las mismas familias, suponiendo que debía existir un fondo patogénico común para todas ellas. A esta predisposición hereditaria la denominaron atopía (del griego a-topos, fuera de lugar). Hoy en día, definimos la atopía como una condición, genéticamente determinada, caracterizada por una respuesta inmune anómala que consiste en la excesiva producción de IgE ante proteínas del medio ambiente⁴.

Se estima hoy en día que la prevalencia de la atopía en la población occidental está entre unos límites aproximados del 10 al 35 % de la población general^{4,7}. Esto no significa necesariamente que estos pacientes presenten manifestaciones clínicas, sino que tienen una predisposición superior a la de la población general a las enfermedades alérgicas (diátesis alérgica hereditaria)⁵.

Aunque no ha llegado a catalogarse la alteración genética responsable, se acepta actualmente que la atopía viene regulada por dos grupos de genes distintos: un grupo de genes ligados al sistema mayor de histocompatibilidad y que gobiernan la capacidad de respuesta inmune contra un alérgeno⁸⁻¹⁰ y un segundo grupo de genes reguladores de la síntesis de IgE^{8,11,12} y que al parecer podría transmitirse por herencia autosómica recesiva¹³. La síntesis de IgE parece estar regulada por citoquinas como la interleuquina-4 y el interferón gamma, que, por otra parte, modulan la expresión de los receptores CD 23 de baja afinidad para la

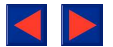
IgE en varias de las células implicadas en la respuesta inmune inmediata¹⁴. Estudios recientes han detectado que los pacientes atópicos pueden tener un aumento del número de linfocitos T capaces de sintetizar interleuquina-4 con aumento de la síntesis de IgE¹⁵.

Numerosos estudios actuales avalan la transmisión hereditaria de la atopía¹⁶⁻¹⁸. Se ha sugerido también que podría existir una predisposición genética para el desarrollo de hiperactividad bronquial inespecífica (HBI), ya que este tipo de condición es más frecuente en determinadas familias independiente de la existencia o no de atopía¹⁹⁻²⁰. Diversos autores han sugerido que ambos factores (predisposición a la HBI y condición atópica) pueden segregarse o expresarse conjuntamente, existiendo una notable tendencia a la concordancia entre ambos²¹⁻²⁴.

Un hecho notable es que pacientes con rinitis alérgica, que nunca han experimentado asma ni sibilancias, muestran grados de HBI superiores a individuos no alérgicos^{25,26}. En este sentido, la exposición a irritantes ambientales, alérgenos u otros agentes, configuraría lo que podría llamarse el factor adquirido o exógeno. Los estudios epidemiológicos de los últimos años están derivando la concepción unifactorial y genética del asma hacia la de una enfermedad multifactorial y adquirida, propia de la civilización. De hecho, se ha demostrado un notable aumento de la prevalencia de esta enfermedad en los países industrializados^{27,28}, especialmente entre la población infantil y juvenil^{29,30}. Así pues, el factor ambiental podría ser el desencadenante del inicio de las crisis asmáticas en pacientes con predisposición a la atopía y/o a la HBI^{31,32}. Esto aclararía entre otras cosas las diferencias observadas entre gemelos monocigóticos³¹ y explicaría la aparición de asma en comunidades cerradas que, habiendo estado exentas de esta enfermedad en sus regiones de origen, comienzan a presentarlo tras su traslado a zonas industrializadas o urbanas³⁴. Se ha comprobado que la introducción de nuevos alérgenos en una comunidad como consecuencia de un cambio de estilo de vida puede redundar en un aumento de la prevalencia de asma en dicha comunidad³⁵.

Fisiopatología del asma alérgica

La fisiopatología del asma alérgica extrínseca es compleja y se desarrolla en varias etapas, aunque su



base corresponde en esencia al mecanismo de hipersensibilidad inmediata de tipo I descrito por Gell y Coombs¹. En una primera fase o período de latencia, el paciente atópico se pondrá en contacto con los diversos tipos de proteínas ambientales a través del aire inhalado. La llegada de estas proteínas a la mucosa bronquial inducirá una respuesta inmune, que, en el caso de los pacientes atópicos, será de tipo IgE. Una vez sintetizada, la IgE específica se unirá a los receptores de alta afinidad de la membrana de los mastocitos³⁶. Esta fijación estará regulada por la existencia de receptores de baja afinidad (denominados receptores CD 23), presentes en la membrana de los mastocitos, y en otras células que participan en la respuesta inmune, como macrófagos, linfocitos o eosinófilos. A su vez, la expresión de los receptores de baja afinidad estará estimulada por citoquinas como interleuquina-4 o inhibida por gamma interferón o factores de captación de la IgE soluble (fragmentos del CD 23 solubilizado)³⁷. A partir de la fijación de las IgE específicas en la membrana de los mastocitos, podremos afirmar que el paciente está sensibilizado y de hecho podremos demostrar la presencia de IgE específica al alérgeno en cuestión por medio de pruebas inmunológicas tanto *in vivo* como *in vitro*.

En una segunda fase, los nuevos contactos del alérgeno con la mucosa bronquial inducirán la degranulación de los mastocitos, con la liberación de los mediadores preformados³⁸ y la rápida síntesis de los mediadores no preformados^{36, 39}. El broncoespasmo se iniciará entre los 10 y los 20 minutos de la llegada del alérgeno. A esta fase se la denomina habitualmente como reacción inmediata.

La liberación de prostaglandinas, leucotrienos, factor activador de las plaquetas y factores quimioatracantes para neutrófilos y eosinófilos mantendrá el espasmo bronquial e iniciará la reacción inflamatoria o retardada. En esta etapa, el edema de la pared bronquial, la secreción de moco, el infiltrado de células inflamatorias y la destrucción del epitelio ciliado de la mucosa por los enzimas proteolíticos liberados por las células inflamatorias serán los sucesos predominantes⁴⁰⁻⁴⁴. La reacción retardada se inicia aproximadamente a las 4 horas de la exposición, tiene su máximo entre las 4 y las 8 horas y persiste más de 12 horas.

Recientemente se especula con la posibilidad de que la intensidad de la reacción retardada esté modulada inmunológicamente por linfoquinas como la interleuquina-5, sintetizadas por células T-helper activadas localmente por el antígeno⁴⁵. De hecho, estas células T activadas aparecen tras la provocación bronquial con alérgeno⁴⁶.

Como consecuencia de esta reacción retardada, y especialmente de la disrupción del epitelio bronquial, quedarán expuestos al aire respirado nuevos mastocitos, terminaciones nerviosas colinérgicas y receptores químicos y neurohumorales de la submucosa. El efecto más dramático será la aparición del fenómeno de la HBI⁴⁷⁻⁵⁰, verdadera piedra angular de la enfermedad asmática.

Los estudios inmunológicos en el asma alérgica

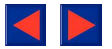
Como hemos podido ver, los estudios inmunológicos en el asma alérgica extrínseca han desempeñado un papel fundamental en el conocimiento de los mecanismos patogénicos del asma bronquial. De hecho, constituyen un excelente modelo natural y experimental para el estudio de la génesis de la HBI, común a todos los asmáticos.

Por otra parte, los estudios inmunológicos han abierto una nueva vía en el conocimiento de la epidemiología y la etiología del asma. Las interconexiones ya citadas entre la predisposición alérgica, la HBI y los factores ambientales resultan cada día más evidentes. Así, parece establecido que la atopia en la primera infancia es un importante factor de riesgo para el desarrollo de HBI persistente^{51, 52}. Se han establecido sorprendentes asociaciones entre tabaco, hiperreactividad bronquial y atopia⁵³, contaminación ambiental y asma alérgica⁵⁴, virasis respiratorias y sensibilización atópica⁵⁵, tabaco y hiperproducción de IgE⁵⁶ y asma extrínseca o intrínseca y altos niveles de IgE⁵⁷.

El asma alérgica extrínseca ha sido también un excelente modelo natural y experimental para el estudio de los fenómenos inmunes que subyacen en la patogenia del asma alérgico. Basándose en la evidencia de que la exposición natural a alérgenos^{31, 58} y las pruebas de provocación bronquial en laboratorio^{59, 60} inducen muy frecuentemente respuesta retardada e HBI posterior y en que ésta puede disminuir tras periodos de separación del alérgeno^{61, 62}, Cockcroft ha establecido su teoría sobre la patogenia del asma alérgica perenne⁵³. Sugiere que las repetidas exposiciones cotidianas a un alérgeno, presente habitualmente en el medio, puede generar un círculo vicioso de HBI que justifique la aparición de la enfermedad asmática. Más recientemente se ha sugerido que el reclutamiento preferente de linfocitos T supresores durante la respuesta inmediata podría evitar o disminuir la reacción retardada⁶³. Se conoce que la aparición de respuesta retardada está relacionada con la dosis del alérgeno, la intensidad de la reacción inmediata y el *score* de IgE específica contra el alérgeno, pero no con la HBI previa⁶⁴.

Por último, el sistema inmune interviene, no sólo en la sensibilización y activación de mastocitos y otras células implicadas en la respuesta inmediata o en el desarrollo de la respuesta retardada, sino también en la regulación antigénica del reclutamiento y activación de células T-helper y T-supresoras⁴⁶. La activación reiterada de estos linfocitos y la producción de citoquinas podrían ser las responsables de la eosinofilo-poyesis, así como de la migración de los eosinófilos al tejido bronquial y de su activación, lo que explicaría la prolongada eosinofilia del asma evolutiva⁴⁵. La respuesta inmediata en el asma podría estar también modulada por la presencia de autoanticuerpos anti-IgE⁶⁵.

Por otra parte, la catalogación de una etiología inmunológica en el asma viene avalada por razones de tipo clínico y práctico, especialmente si se trata de



asma de inicio reciente. Tradicionalmente, sigue considerándose al asma bronquial dividida en dos grandes bloques: asma extrínseca y asma intrínseca. Aunque contestada recientemente⁵⁷, esta clasificación tiene un interés pronóstico y terapéutico: el neumólogo podrá orientar al paciente acerca de las características y la posible evolución de su enfermedad e incluso recomendar o no determinados fármacos, como el cromoglicato disódico, el nedocromil sódico o el ketotifeno. Teniendo en cuenta la naturaleza recidivante y crónica de esta enfermedad, el enfoque pronóstico que el neumólogo pueda hacer para cada paciente puede ser de gran utilidad a fin de evitar tanto falsas esperanzas de curación y abandono de tratamientos como sentimientos de depresión y gravedad injustificados.

Tal vez la mayor utilidad de un estudio inmunológico de los pacientes asmáticos esté en aquellos casos en los que pueda detectarse una causa no reconocida por el médico o el paciente y que pueda ser evitada en el futuro. Este es el caso de la alergia a epitelios de animales que conviven con el paciente o de alérgenos procedentes de su ambiente profesional u ocupacional. En estos últimos casos, la demostración de la sensibilización y reactividad a un determinado alérgeno puede tener consecuencias no sólo terapéuticas sino económicas o sociolaborales. En este sentido, la detección de pacientes atópicos que acceden por primera vez a ocupaciones con riesgo sensibilizante es un tema de interés actual en el área de la medicina laboral. En menor grado, la detección de sensibilización a un alérgeno sobre el que pueda efectuarse una manipulación ambiental, puede disminuir la frecuencia e intensidad de las crisis del paciente con una alteración mínima de su calidad de vida^{61,62}. Asimismo, es importante recordar que en los lactantes o niños pequeños, la detección de sensibilización a proteínas con elevada capacidad alérgica y presentes en su dieta diaria (proteínas de la leche de vaca, cereales, ovoalbúmina, frutas, etc) puede alterar radicalmente la evolución de la enfermedad.

Por último, el conocimiento e identificación del alérgeno es de vital importancia en los casos en los que se considere la posibilidad de indicar una inmunoterapia específica. El advenimiento reciente de extractos alérgicos purificados y estandarizados en actividad biológica⁶⁶, la posibilidad de monitorización del tratamiento⁶⁷ y el establecimiento de unas bases racionales para su uso, está atrayendo el interés de los profesionales hacia esta modalidad terapéutica⁶⁸⁻⁷¹.

Métodos diagnósticos inmunológicos en el asma bronquial

Pruebas que miden sensibilización

Pruebas cutáneas

Las pruebas cutáneas son el método más sencillo, sensible y práctico para establecer una sensibilización atópica en un paciente con asma bronquial^{72,73}. Debido al frecuente uso inadecuado de esta técnica por

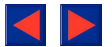
parte de profesionales sin la suficiente preparación y conocimientos o con intereses económicos prioritarios, las pruebas cutáneas han sufrido un notable e injustificado descrédito entre muchos neumólogos. Sin embargo, los excelentes preparados alérgicos de que puede disponerse hoy en día, la estandarización de la técnica y los procedimientos cuantitativos que las pruebas cutáneas pueden ofrecer en manos de alergólogos experimentados, permiten recomendarlas como el mejor método para detectar la sensibilización a neuroalérgenos en el asma bronquial^{72,73}.

Las pruebas cutáneas se basan en la reproducción *in vivo* en la dermis del paciente de la reacción de hipersensibilidad de Gell y Coombs, aprovechando la propiedad de la IgE de fijarse prioritariamente en las membranas de los mastocitos, la abundancia de este tipo de células en la dermis y la accesibilidad de la piel como lugar de estudio. Una pequeña cantidad de alérgeno es introducido a través de la epidermis y reconocido por la IgE específica fijada en los mastocitos. Como consecuencia de la reacción inmune, se liberarán los mediadores contenidos en los gránulos intracitoplasmáticos (entre ellos la histamina). Los efectos biológicos de esta amina vasoactiva (vasodilatación, extravasación de fluido), se manifiestan como eritema y pápula respectivamente, pudiendo ser medidos y comparados con la respuesta cutánea producida por una concentración conocida de histamina. Esto permitirá una valoración cualitativa y semicuantitativa para cada paciente que será suficiente para el diagnóstico en la mayoría de los casos.

Para que las pruebas cutáneas cumplan unas condiciones de fiabilidad deben de cumplir unos criterios estrictos que se expresan en la tabla I.

Así, será preciso suprimir los tratamientos antihistamínicos con la suficiente antelación, que puede llegar a ser superior a treinta días en algunos antihistamínicos de segunda generación⁷⁵. En segundo lugar, es fundamental descartar dermatosis, urticarias físicas, dermatografismo o cualquier tipo de hiperreactividad cutánea silente que pueda dar lugar a falsos positivos. El tercer punto a considerar son los controles de la respuesta cutánea individual a la histamina, tanto positivos como negativos. Como control positivo pueden emplearse degranuladores inespecíficos de los mastocitos, como el fosfato de codeína, el ionóforo 48/80 o el mismo clorhidrato de histamina⁷⁶. Como control negativo debe utilizarse el disolvente de los alérgenos empleados (en general, solución de albúmina fenolada y glicerolada). La presencia de eritema o pápula producida por el diluyente es suficiente para invalidar las pruebas, aun cuando no pueda demostrarse dermatografismo.

La calidad de los alérgenos empleados es también de crucial importancia. Hoy en día deben emplearse en lo posible alérgenos de procedencia comercial garantizada, estables y con reproductibilidad comparada entre los lotes de un mismo alérgeno. Deben estar valorados en actividad biológica referenciada con estándares internacionales, como las Nordic Biological Units (BU/ml)⁷⁷ o las Allergy Units(AU/ml)⁷⁸. En de-



terminados casos (ácaros, algunos pólenes, determinados extractos de animales domésticos) es ya posible utilizar extractos de alérgenos valorados en unidades internacionales de la OMS (IUIS/WHO) en los que consta la cantidad de antígeno mayor expresado en nanogramos e incluso una relación de los alérgenos menores presentes⁷². Las pruebas cutáneas efectuadas con extractos no valorados en actividad biológica deben ser evaluadas de manera crítica, contrastándose en varias ocasiones o con extractos de diferente procedencia. Sus resultados deben ser considerados sólo como probables u orientativos. Es interesante conocer que los comités de expertos han catalogado a más de 300 extractos alérgenos como inútiles, peligrosos o equívocos⁷⁹.

La técnica de las pruebas cutáneas es otro de los puntos de mayor interés. Debe rechazarse la práctica de la intradermorreacción, fuente frecuente de falsos positivos y de reacciones adversas y que tanto ha contribuido al descrédito de las pruebas cutáneas⁸⁰. Esta técnica debe reservarse hoy día para trabajos de investigación. La prueba de escarificación o *scratch* debe ser asimismo abandonada a causa de su escasa sensibilidad y especificidad⁷². La técnica diagnóstica de elección es el *prick test* o *punctura*^{72-74, 81} que introduce a través de la epidermis una cantidad muy pequeña del alérgeno (aproximadamente unos 3 microlitros). Debe ser efectuada por un técnico experto, que debe controlar la reproductibilidad de su técnica por medio de pruebas por duplicado, no debiendo exceder el coeficiente de variabilidad el 20%⁷². El uso de lancetas estandarizadas, de 1 mm de bisel, disminuye considerablemente las posibles variaciones individuales del técnico, por lo que su uso es altamente recomendable⁸², siendo el único inconveniente su mayor precio. Existen también, lancetas estandarizadas recubiertas con alérgenos⁸³.

La medición de las pruebas cutáneas puede efectuarse a los 15-20 minutos por medida directa de los diámetros transversales de pápula y eritema con regla milimetrada transparente o bien por planimetría, transfiriendo el área de la pápula a una hoja de papel milimetrado por medio de cinta adhesiva transparente o plantillas⁷².

La evaluación e interpretación de las pruebas cutáneas es otro de los factores clave en el rendimiento de esta técnica diagnóstica. Deben de ser valoradas siempre por facultativos expertos en esta técnica⁷². A pesar de una medición objetiva y cuantificada, un alergólogo experto podrá considerar dudosas o no valorables determinadas pápulas o eritemas, dependiendo de la potencia relativa de unos y otros extractos alérgenos, de la procedencia del extracto, la concentración empleada, el tiempo transcurrido desde la preparación del extracto a su estado de conservación. También factores propios del huésped, como la edad del paciente, la respuesta fisiológica a los controles o la zona de la piel en la que se ha efectuado la prueba, pueden influir en el resultado. Todos estos factores hacen difícil establecer unos límites de positividad de las pruebas cutáneas. Será responsabilidad del alergó-

TABLA I
Criterios de validez de las pruebas cutáneas

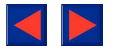
Supresión de antihistamínicos
Ausencia de dermatosis e hiperreactividad cutánea
Alérgenos bien caracterizados y estandarizados en actividad biológica
Técnica de <i>prick test</i>
Uso paralelo de controles positivo y negativo
Medidas en unidades cuantificadas y reproducibles
Interpretación por médico experto
Valoración con respecto a la historia clínica
Son aconsejables: uso de lancetas estandarizadas y práctica de pruebas por duplicado

logo contrastar las pruebas dudosas o de difícil interpretación por los medios a su alcance. A nuestro entender, es preferible calificar unas pruebas cutáneas de no valorables que arriesgarse a interpretar arbitrariamente una respuesta biológica para la que no se dispone de patrones⁸⁴.

La elección del panel de alérgenos es de suma importancia. Debe de contener una muestra representativa de los alérgenos inhalantes presentes en el medio habitual para cada área geográfica y además debe individualizarse parcialmente en muchos casos, dependiendo de la edad del paciente, su hábitat, ocupación, aficiones o lugar y momento de la aparición de los síntomas. Una incorrecta elección del panel de alérgenos en unas pruebas cutáneas es una fuente frecuente de falsos negativos y por tanto de errores diagnósticos. La información reciente de que un número muy elevado de asmáticos pueden tener un origen extrínseco y que probablemente no conocemos aún muchos posibles alérgenos patógenos⁸⁵ hace más interesante esta observación de cara al futuro.

Por último, el alergólogo debe distinguir claramente entre sensibilización a un alérgeno (prueba cutánea positiva) y relevancia clínica de dicha sensibilización. Una historia clínica alergológica simultánea a la práctica de las pruebas es fundamental para su interpretación⁷⁴. Son frecuentes los pacientes con asma de origen extrínseco alérgico, en los que el componente de HBI se ha hecho primordial a lo largo de los años. Asimismo, la interpretación del alergólogo es básica en los casos de asma de inicio relativamente reciente, en las que exista discordancia entre la historia clínica y las pruebas cutáneas y también en los pacientes polisensibilizados. En estos casos, el alergólogo deberá aconsejar pruebas de exposición o separación temporal de una determinada fuente alérgica o pruebas de provocación bronquial para llegar al diagnóstico etiológico correcto.

Las pruebas cutáneas no son sólo útiles para el diagnóstico inmunoalérgico del asma, sino también para otros propósitos, como investigación en alergia, estandarización y preparación de alérgenos y monitorización de tratamientos inmunológicos. Es en estos campos donde tienen aplicación técnicas cuantificables de las pruebas cutáneas como el punto de titulación final (*end point titration*), la prueba de líneas paralelas (*parallel line bioassay*) o el estudio de las



reacciones cutáneas retardadas. El punto de titulación final consiste en la práctica de pruebas cutáneas con diluciones crecientes del alérgeno hasta definir la mínima concentración que produce una pápula visible y cuantificable^{73,74}. La prueba de líneas paralelas selecciona las concentraciones de alérgenos que siguen una relación dosis-respuesta lineal con el área de la pápula cutánea según un modelo matemático⁸⁶. Estas concentraciones podrán ser utilizadas de nuevo tras la inmunoterapia para comprobar los posibles cambios⁷². La respuesta retardada cutánea precisa dosis muy elevadas de alérgeno, se desarrolla a partir de las 4 horas y tiene características infiltrativas. Se usa especialmente en investigación y en el seguimiento de la inmunoterapia⁸⁷.

Contaje de eosinófilos en sangre o en esputo

La eosinofilia en sangre periférica (250-2.500 eosinófilos/mm³) o en el esputo es una manifestación común pero no invariable en el asma⁸⁸, habiendo sido tradicionalmente considerada como un criterio de etiología inmunoalérgica. Hoy en día se conoce el papel relevante del eosinófilo en la respuesta inflamatoria retardada, independientemente de cual sea la causa que la genere⁴⁴, por lo que debe modificarse el uso de este criterio diagnóstico⁸⁸. Por otra parte, el contaje de eosinófilos en sangre periférica puede oscilar por múltiples causas, entre las que se encuentran el ejercicio, el estrés, los tratamientos broncodilatadores y la corticoterapia, amén de otras enfermedades concomitantes o intercurrentes como infecciones o parasitosis.

Determinación de IgE sérica total

En la población occidental, relativamente libre de parasitosis, la elevación de los niveles de IgE sérica total por encima de 100 kUI/ml se utiliza como criterio diagnóstico de diátesis alérgica. Sin embargo, este concepto tiene siempre sus limitaciones. La IgE es una proteína importante en la respuesta inmune primaria, especialmente en la defensa natural contra parásitos y virus. Por ello, aumenta bruscamente en la infancia, llega a un pico en la preadolescencia y desciende levemente en la edad adulta⁸⁹. Los niveles de IgE sérica total deben, por tanto, referirse al grupo de edad correspondiente. Por otra parte, las concentraciones de IgE muestran una distribución logarítmica de tipo normal con amplios límites en el percentil 95, lo que dificulta establecer unas cifras estrictas, que, sin perder sensibilidad, no cataloguen de atopia a individuos normales^{72,90}. La IgE puede elevarse por factores ambientales, como son el hábito tabáquico^{56,91}, las infecciones o la residencia en áreas industrializadas⁵⁴. Más importante aún, la IgE está también elevada en el asma intrínseca⁵⁷, en la aspergilosis y en parasitosis. Por otra parte son frecuentes los niveles normales de IgE sérica total en pacientes con asma alérgica a pólenes⁹², probablemente porque la exposi-

ción es intermitente. De una manera práctica podríamos establecer que niveles muy elevados de IgE sérica total son muy sugestivos de etiología alérgica, niveles moderadamente elevados son compatibles con ella y niveles inferiores a 100 kUI/ml no la descartan, lo que a nuestro entender limita mucho la rentabilidad de este parámetro con usos diagnósticos. Sin embargo, en el caso de los neonatos, la asociación de antecedentes de atopia en uno de los padres y de niveles de IgE en sangre de cordón superiores a 0,9 kUI/ml, se correlaciona con aparición de diátesis atópica clínica durante la infancia⁸⁹, resultando un excelente indicador para el establecimiento de medidas preventivas.

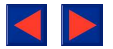
Determinación de IgE específica en suero

En los casos en los que las pruebas cutáneas no puedan realizarse (niños de muy corta edad, respuesta cutánea a la histamina alterada, dermatitis, tratamiento antihistamínico) o resulten dudosas, disponemos de varios métodos de laboratorio para el estudio de la presencia de anticuerpos IgE específicos contra neuroalérgenos. Los inconvenientes inherentes a todas ellas son una menor sensibilidad al respecto de las pruebas cutáneas, un precio elevado, la necesidad de disponer de un laboratorio convenientemente equipado, el tiempo requerido para la obtención de resultados y la limitación que significa el restringir la búsqueda a un número de alérgenos limitado orientado por la historia clínica^{74,90}.

Los métodos más utilizados son el radioinmunoensayo y el enzimoimmunoensayo^{90,93,94}. Ambos tienen en común la fase previa en la que se produce la incubación del suero del paciente con el alérgeno sospechoso, en general fijado a una fase sólida. Tras la reacción inmunológica, el anticuerpo IgE fijado es revelado por medio de un anticuerpo anti-IgE marcado isotópicamente (radioinmunoensayo) o por medio de una enzima (enzimoimmunoensayo). Ambas técnicas se evalúan de manera semicuantitativa (*scores* o unidades arbitrarias) al respecto de una curva patrón construida con sueros de referencia^{74,90}.

Al igual que en las pruebas cutáneas, deberá conocerse a fondo el rendimiento de la técnica, ya que determinados resultados en el límite de la positividad pueden variar dependiendo de los puntajes de los sueros de referencia, así como de las potencias de los alérgenos que se comparan obligadamente con una referencia común^{74,90}. La cantidad absoluta de IgE y la existencia de IgE específica pueden asimismo interferir con los resultados^{74,90}.

La interpretación de la determinación de la IgE específica debe ser, por tanto, crítica y en algunas ocasiones el neumólogo deberá consultar con el inmunólogo o el alergólogo antes de considerar como positivo o negativo un resultado. El radioinmunoensayo, más conocido (RAST)⁹³ se utiliza frecuentemente en investigación alergológica, especialmente en identificación y estandarización de alérgenos, estudios de reactividad cruzada, etc, por medio de la prueba de la inhibición del RAST⁷³.



Liberación de histamina

Consiste en la cuantificación de la histamina liberada por una muestra de sangre total incubada con diferentes concentraciones del alérgeno a estudiar. El resultado se evalúa al respecto del total de histamina presente en una muestra de sangre análoga, en la que las membranas de los basófilos se han destruido mediante la incubación con ácido perclórico. La cuantificación de histamina, muy laboriosa por el clásico método fluorimétrico, se ha simplificado con el uso de automatizadores o con la técnica de enzoinmunoensayo^{90,94}. De gran sensibilidad y especificidad, el mayor inconveniente de esta técnica es su elevado coste, por lo que es asequible únicamente a laboratorios especializados.

Determinación de IgG específica y sus subclases en suero

Los niveles de IgG específica aumentan significativamente tras inmunoterapia, sin que este hecho tenga relación con una mejoría clínica en el caso del asma⁹⁰. Algunas subclases, especialmente la IgG4 han sido estudiadas con más atención ya que sus propiedades biológicas le confieren una capacidad de sensibilización similar a la de la IgE⁹⁰. Sin embargo, hasta la fecha, no ha sido aclarado si su papel en la respuesta inmune es sensibilizante (anticuerpos de corto período de sensibilización o STS-A) o protector (aumento pronunciado durante la inmunoterapia)⁹⁵.

Métodos obsoletos o de utilidad limitada

El test de Prausnitz-Küstner (PK) utiliza la dermis de un receptor sano como lugar de reproducción de la reacción de hipersensibilidad inmediata, a través de la infiltración local con suero del paciente que contiene IgE específica y la posterior inyección de diferentes concentraciones del alérgeno. Aunque científicamente válido, las posibilidades de transmisión de enfermedades lo hacen éticamente inaceptable hoy en día⁷³.

El test de degranulación de basófilos reproduce la reacción de hipersensibilidad en una muestra de sangre o una suspensión enriquecida en basófilos que se incuban con el alérgeno sospechoso. Se considera positiva la prueba cuando se observa al microscopio óptico una degranulación de los basófilos de más de un 20 % de los presentes al inicio de la prueba, siempre que la muestra incubada con suero no muestre degranulación significativa. Aunque de bajo coste, la falta de sensibilidad y especificidad de la prueba, el escaso número de basófilos en sangre periférica y la experiencia necesaria para una correcta identificación e interpretación han relegado este test hoy en día en el panel de pruebas diagnósticas de la alergia respiratoria^{74,90}.

El test de transformación de linfocitos (TTL) es una prueba que mide la transformación de linfocitos en linfoblastos activos tras su incubación con el alérgeno, a través de la cuantificación de timidina tritiada in-

corporada al cultivo⁷⁴. Es, pues, una prueba de escasa significación en el diagnóstico de las alergias respiratorias a pesar del uso excesivo y erróneo que se han hecho de ella. No existe indicación para su uso diagnóstico, aunque puede utilizarse en investigación. La misma afirmación es aplicable para la prueba de inhibición de la migración de macrófagos (MIF).

La prueba de neutralización consiste en administrar por vía subcutánea concentraciones crecientes del alérgeno hasta neutralizar los síntomas producidos por una prueba de provocación. Sus resultados no han sido nunca contrastados científicamente⁹⁶.

Métodos que miden sensibilización del órgano diana

Pruebas de exposición y separación

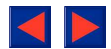
En los casos en los que la historia clínica y las pruebas cutáneas no sean suficientes para establecer la relación causal entre la exposición y la aparición de las crisis o en los casos en los que se detecta una polisensibilización, las pruebas selectivas de exposición o separación de uno de los alérgenos pueden aclarar el diagnóstico. Estas pruebas son muy útiles en los casos de alérgenos ocupacionales, animales domésticos o pólenes no coincidentes estacionalmente.

Pruebas de provocación bronquial

Por el contrario, en los casos en los que no es posible individualizar los alérgenos o en los que la historia clínica y las pruebas cutáneas no son diagnósticas o resultan discordantes, la única posibilidad de llegar a un diagnóstico etiológico es la prueba de provocación bronquial^{74,97}. Dado que presenta un riesgo para el paciente y que debe practicarse en ambiente hospitalario, deberá indicarse tan sólo en los casos en los que de su resultado se deriven consecuencias beneficiosas para el paciente. Será preciso obtener su consentimiento explícito y deberán ser realizadas por facultativos experimentados en su técnica y manejo⁷⁴.

Las condiciones para una correcta práctica de pruebas de provocación bronquial incluyen el uso de alérgenos bien caracterizados, valorados en potencia biológica y el uso de protocolos estandarizados y reproductibles^{97,99}. Es preceptivo realizarlos en ausencia de fármacos capaces de modificar la respuesta bronquial, en ausencia de exposición ambiental al alérgeno o a irritantes inespecíficos y evitando los períodos en los que el paciente pueda mostrar un aumento de su HBI⁹⁹.

La prueba incluirá la nebulización de diluyente del alérgeno a estudiar y para ser considerada positiva deberá producirse un descenso del FEV₁ de un 20 % con respecto al FEV₁ obtenido tras inhalación del diluyente. No existe un consenso absoluto acerca de la concentración máxima a administrar, ya que en general se desconocen las concentraciones de alérgenos a las que habitualmente está expuesto el paciente de

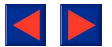


manera natural. Por otra parte, Cockcroft ha mostrado recientemente que la concentración a la que un paciente presenta respuesta inmediata positiva puede ser predicha a partir de su nivel de HBI y su nivel de sensibilización al alérgeno¹⁰⁰.

La prueba deberá incluir la vigilancia y detección de reacciones retardadas por medio de espirometrías horarias entre las 4 y las 12 horas de la administración de la última concentración de alérgeno⁹⁸. Deberá interrumpirse si el paciente presenta disnea o sibilancias en reposo o si se comprueba descenso del FEV₁ o del flujo espiratorio compatible con obstrucción severa, administrándose el correspondiente tratamiento sintomático. Es recomendable advertir al paciente de un posible aumento de su HBI los días posteriores a la prueba.

BIBLIOGRAFÍA

- Coombs RRA, Gell PGH. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. En: PGH Gell, RRA Coombs, PJ Lachmann, eds. Clinical aspects of immunology. Oxford: Blackwell Scientific Publications 1975; 761.
- Cooke RA, VanderVeer A Jr. Human sensitization. *J Immunol* 1916; 1:201-205.
- Coca AF, Cooke RA. On the classification of the phenomena of hypersensitization. *J Immunol* 1923; 8:162-182.
- Bellanti JA, Kadlec JV. ¿Qué es el estado atópico? En: Weiss EB, Segal MS, Stein M, eds. Asma bronquial. Mecanismos y terapéutica. Madrid: Intermédica Española SA 1986; 37-40.
- Montgomery Smith J. Epidemiology and natural history of asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis (eczema). En: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson Jr NF, Yunginger JW, eds. Allergy. Principles and practice. St. Louis: CV Mosby Co 1988; 891-929.
- Barbee RA, Lebowitz MD, Thompson HC, Burrows B. Immediate skin- test reactivity in a general population sample. *Ann Intern Med* 1976; 84:129-133.
- Cline MG, Borrows B. Distribution of allergy in a population sample residing in Tucson, Arizona. *Thorax* 1989; 44:425-432.
- Marsh DG. Immunogenetics of atopic disease. En: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson Jr NF, Yunginger JW, eds. Allergy. Principles and practice. St. Louis: CV Mosby Co 1988; 94-105.
- Zwollo P, Ansari AA, Marsh DG. Association of class II DNA restriction fragments with responsiveness to *Ambrosia artemisiifolia* (short ragweed)- pollen allergen Amb a V in ragweed allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83:45-54.
- O'Heir R, Young D, Kay AB, Lamb J. Clonal analysis of the cellular immune response to the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Int Arch Allergy App Immunol* 1989; 88:170-172.
- Meyers DA, Beaty TH, Freidhoff LR, Marsh DG. Inheritance of total serum IgE (basal level) in man. *Am J Hum Genet* 1987; 41:51-62.
- Hasstedt SJ, Meyers DA, Marsh DG. Inheritance of immunoglobulin E: genetic model fitting. *Am J Genet* 1983; 14:61-66.
- Cookson WCH, Hopkin JH. Dominant inheritance of atopic immunoglobulin-E responsiveness. *Lancet* 1988; 1: 8577:86-88.
- Vercelli D, Leung DYM, Jabara HH, Geha RS. Interleukin-4 dependent induction of IgE synthesis and CD 23 expression by the supernatants of human helper T cell clone. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989; 88:119-121.
- Romagnanai S, Maggi E, Del Prete GF et al. Role of interleukin-4 and gamma interferon in the regulation of human IgE synthesis: possible alterations in atopic patients. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989; 88:111-113.
- Edfors-Lubs ML. Allergy in 7000 twin pairs. *Acta Allergol* 1971; 61:249-285.
- Hopp RJ, Bewtra AK, Watt GD, Nair NM, Townley RG. Genetic analysis of allergic disease in twins. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73:265-170.
- Van Asperen P, Kemp AS, Mellis CM. A prospective study of the clinical manifestations of atopic disease in infancy. *Acta Paediatr Scand* 1984; 73:80-85.
- Hoop RJ, Bewtra AK, Watt GD, Biven R, Nair NM, Townley RG. Bronchial reactivity pattern in nonasthmatic parents of asthmatics. *Ann Allergy* 1988; 61:184-186.
- Longo G, Strinati R, Poli F, Fumi F. Genetic factors in non-specific bronchial hyperreactivity. *Am J Dis Child* 1987; 141:331-334.
- Witt C, Stuckey MS, Woolcock AJ. Positive allergy prick tests associated with bronchial histamine responsiveness in an unselected population. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77:698-702.
- Cookson WCH, Musk AW, Ryan G. Associations between asthma history, atopy, and non-specific bronchial responsiveness in young adults. *Clin Allergy* 1986; 16:425-432.
- Burney PG, Britton JP, Chinn S et al. Descriptive epidemiology of bronchial reactivity in an adult population: results from a community study. *Thorax* 1987; 42:38-44.
- Cockcroft DW, Murdock KY, Berscheid BA. Relationship between atopy and bronchial responsiveness to histamine in a random population. *Ann Allergy* 1984; 53:26-29.
- Madonini E, Briatico-Vangosa G, Pappacoda A, Maccacni G, Cardani A, Saporiti F. Seasonal increase of bronchial reactivity in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79:358-363.
- Bryant DH, Burns WM. The relationship between bronchial histamine reactivity and atopic status. *Clin Allergy* 1976; 6:373-381.
- Hendrick DJ. Asthma: epidemics and epidemiology. *Thorax* 1989; 44:609-613.
- Evans R III, Mullally DI, Wilson RW et al. National trends in the morbidity and mortality of asthma in the US. Prevalence, hospitalization and death from asthma over two decades: 1965-84. *Chest* 1987; 91 (suppl):65-74S.
- Anderson HR. Increase in hospital admissions for childhood asthma: trends in referral, severity and readmissions from 1970 to 1985 in a health region of UK. *Thorax* 1989; 44:614-619.
- Mitchel EA. International trends in hospital admission rate for asthma. *Arch Dis Child* 1985; 60:376-378.
- Boulet LP, Cartier A, Thompson NC, Roberts SR, Dolovich J, Hargreave FE. Asthma and increases in nonallergic bronchial responsiveness from seasonal pollen exposure. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 71:399-406.
- Busse J. The relationship between viral infections and onset of allergic diseases and asthma. *Clin Exp Allergy* 1989; 19:1-9.
- Svartengren M, Ericsson CH, Mossberg B, Camner P. Bronchial reactivity and atopy in asthma discordant monozygotic twins. *Ann Allergy* 1990; 64:124-128.
- Van Niekerk CH, Weinberg RG, Shore SC, Heese H de V, Van Schalkwyk DJ. Prevalence of asthma: a comparative study of urban and rural Xhosa children. *Clin Allergy* 1979; 9:319-324.
- Dowse GK, Turner KJ, Stewart GA, Alpers MP, Woolcock AJ. The association between Dermatophagoides mites and the increasing prevalence of asthma in village communities within the Papua New Guinea highlands. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75:75-83.
- Kaliner M. Asthma and mast cell activation. *A Allergy Clin Immunol* 1989; 83:510-520.
- Bujanowski-Weber J, Brings H, Knoller I et al. Expression of low-affinity receptor for IgE (Fc epsilon R-II, CD 23) and IgE-BF (soluble CD 23) release by lymphoblastoid B-cell line RPMI-8866 and human peripheral lymphocytes of normal and atopic donors. *Immunology* 1989; 66:505-511.
- White MV, Siater JE, Kaliner MA. Histamine and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:1.165-1.176.
- Friedman MM, Kaliner MA. Human mast cells and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:1.157-1.164.
- O'Byrne PM, Dolovich J, Hargreave FE. Late asthmatic responses. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:740-751.
- Nsouli TM, Nsouli SM, Bellanti JA. Neuroimmunoallergic inflammation: new pathogenetic concepts and future perspectives of immediate and late allergic reactions: part I (first of two parts). *Ann Allergy* 1988; 60:379-389.
- Townley RG, Hopp RJ, Agrawai DK, Bewtra AK. Platelet-activating factor and airway reactivity. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83:997-1.010.
- Lundgren JD, Schelhamer JH. Pathogenesis of airways mucus hypersecretion. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85:399-417.
- Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85:422-436.
- Kay AB. Inflammatory cells in bronchial asthma. *J Asthma* 1989; 26:335-344.



46. Gerblich AA, Campbell AE, Schyler MR. Changes in T-lymphocyte subpopulations after antigenic bronchial provocation in asthmatics. *N Engl J Med* 1984; 310:1.349-1.352.
47. Cockcroft DW. Modulation of airway hyperresponsiveness. *Ann Allergy* 1988; 60:465-471.
48. Barnes PJ. New concepts in the pathogenesis of bronchial hyperresponsiveness and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83:1.013-1.026.
49. Holgate ST. Report of the meeting on "The role of inflammatory processes in airway hyperresponsiveness", Boca Ratón, Florida USA, 3-5 November 1988. *Clin Exp Allergy* 1989; 19:349-365.
50. Cockcroft DW. Mechanism of perennial asthma. *Lancet* 1983; 1:253-256.
51. Peat JK, Salome CM, Woolcock AJ. Longitudinal changes in atopy during a 4-year period: Relation to bronchial hyperresponsiveness and respiratory symptoms in a population sample of Australian schoolchildren. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85:65-74.
52. Van Asperen PP, Kemp AS, Mukki A. Atopy in infancy predicts the severity of bronchial hyperresponsiveness in later childhood. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85:790-795.
53. Tager IB. Passive smoking, bronchial responsiveness and atopy. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138:507-509.
54. Barciano FA, Domínguez J, Álvarez FV. Influence of air pollution on extrinsic childhood asthma. *Ann Allergy* 1989; 62:135-141.
55. Frick OL, German DF, Mills J. Development of allergy in children: association with virus infection. *J Allergy Clin Immunol* 1979; 64:228-241.
56. Warren CP, Holford-Strevens V, Wong C, Manfreda J. The relationship between smoking and total immunoglobulin E levels. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 69:370-375.
57. Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG. Association of asthma with serum IgE levels and skin test reactivity to allergens. *N Engl J Med* 1989; 320:271-277.
58. Sotomayor H, Badler M, Vervloet D, Orehek J. Seasonal increase of carbachol airway responsiveness in patients allergic to grass pollen. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130:56-58.
59. Cartier A, Thomson NC, Frith PA, Roberts R, Hargreave FE. Allergen-induced increase in bronchial responsiveness to histamine: relationship to the late asthmatic response and change in airways caliber. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 70:170-177.
60. Cockcroft DW, Murdock KY. Changes in bronchial responsiveness to histamine at intervals after allergen challenge. *Thorax* 1987; 42:302-308.
61. Platts-Mills TAE, Tovey ER, Mitchell EB, Moszoro H, Nock P, Wilkins S. Reduction of bronchial hyperreactivity during prolonged allergen avoidance. *Lancet* 1982; 2:675-678.
62. Dorward AJ, Colloff MJ, Mc Kay NS, Mc Sharry C, Thomson NC. Effect of house dust mite avoidance measures on adult atopic asthma. *Thorax* 1988; 43:98-102.
63. González MC, Diaz P, Galleguillos FR, Ancic P, Cromwell O, Kay AB. Allergen-induced recruitment of bronchoalveolar helper (OKT4) and suppressor (OKT8) T-cells in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:600-604.
64. Machado L, Stalenheim G. Factors influencing the occurrence of late bronchial reactions after allergen challenge. *Allergy* 1990; 45:268-274.
65. Iwamoto I, Nawata Y, Koike T et al. Relationship between anti-IgE autoantibodies and bronchial asthma. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989; 90:414-416.
66. Dreborg S, Basomba A, Belin L et al. Biological equilibration of allergen preparations: methodological aspects and reproducibility. *Clinical Allergy* 1987; 17:537-550.
67. Immunotherapy Subcommittee of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Immunotherapy: position paper. *Allergy* 1988; 43 (suppl.6): 7-33.
68. Ohman JL. Allergen immunotherapy in asthma: evidence for efficacy. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84:133-140.
69. WHO/IUIS Working Group. The current status of allergen immunotherapy (hyposensitization). *Allergy* 1989; 44: 369-379.
70. Picado C. Inmunoterapia en el asma bronquial: realidad o ficción. *Med Clin* 1984; 83:584-586.
71. Duce F. Inmunoterapia en el asma bronquial. *Arch Bronconeumol* 1990; 26:137-139.
72. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Skin tests used in type I allergy testing. Position paper. *Allergy* 1989; 44 (Suppl 10).
73. Council on Scientific Affairs, American Medical Association. *In vivo* diagnostic testing and immunotherapy for allergy. Report I, part I, of the allergy panel. *JAMA* 1987; 258:1.363-1.367.
74. Van Arsdal Jr PP, Larson EB. Diagnostic tests for patients with suspected allergic disease. Utility and limitations. *Ann Intern Med* 1989; 110:304-312.
75. Almind M, Dirksen A, Nielsen NH, Svendsen UG. Duration of the inhibitory activity on histamine-induced skin wheals of sedative and non-sedative antihistamines. *Allergy* 1988; 43:593-596.
76. Dreborg S, Holgersson M, Nilsson G. Dose response relationship of allergen, histamine, and histamine releasers in skin prick test and the precision of the method. *Allergy* 1987; 42:117-125.
77. Nordic Council on Medicines: Uppsala, NLN Publications, No 23, ed. 2 1989; 1-34.
78. Turkeltaub PC. Biological standardization of allergenic extracts. *Allergol et Immunopathol* 1989; 17:53-65.
79. Schaeffer M, Sisk LC. Allergenic extracts: a review of their safety and efficacy. *Ann Allergy* 1984; 52:2-14.
80. Lockey RF, Benedict LM, Turkeltaub PC, Bukantz SC. Fatalities from immunotherapy (IT) and skin testing (ST). *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79:660-677.
81. Dreborg S. The skin prick test. Methodological studies and clinical applications. Linköping University Medical Dissertations. No 239, Linköping 1987.
82. Basomba A, Sastre A, Pelaez A, Romar A, Campos A, García-Villalmanzo A. Standardization of the prick test. A comparative study of three methods. *Allergy* 1985; 40:395-399.
83. Østerballe O, Nielsen JP. Allergen-coated (Phazet) for skin prick testing in children. *Allergy* 1989; 44:356-362.
84. Rodríguez GE, Dyson MC, Mohagheghi. The art and science of allergy skin testing. *Ann Allergy* 1988; 61:428-432.
85. Chapman MD, Pollart SM, Luczynska CM. Hidden allergic factors in the etiology of asthma. *Chest* 1988; 94:185-190.
86. Dreborg S. Immunotherapy today and in the future demands on clinical investigations. Second Nordic Research Symposium regarding immunological and pharmacological mechanisms in allergy/non allergy. University of Copenhagen 1984; 38-40.
87. Fling JA, Ruff ME, Parker WA et al. Suppression of the late cutaneous response by immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83:101-109.
88. Kay AB. Eosinófilos y neutrófilos en la patogenia del asma. En: Weiss EB, Segal MS, Stein M. *Asma bronquial. Mecanismos y terapéuticas*. Madrid: Intermedica España SA; 254-262.
89. Kjellman MN, Croner S. Cord blood IgE determination for allergy prediction: a follow up of seven years of age in 1651 children. *Ann Allergy* 1984; 53:167-171.
90. Homburger HA, Katzmann JA. Methods in laboratory immunology. En: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson Jr NF, Yunginger JW. *Allergy. Principles and practice*. St Louis: CV Mosby Co 1988; 403-418.
91. Burrows B, Halonen M, Barbee RA, Lebowitz MD. The relationship of serum immunoglobulin E to cigarette smoking. *Am Rev Respir Dis* 1981; 124:523-525.
92. García-Ortega P, Cadania A, Kurdi F. Diagnosis of parietaria pollenosis. *Ann Allergy* 1984; 53:347-350.
93. Wide L, Bennich H, Johansson SG. Diagnosis of allergy by an *in vitro* test for allergen antibodies. *Lancet* 1967; 2:1.105-1.107.
94. Council on Scientific Affairs, American Medical Association. *In vitro* testing for allergy. Report II of the allergy panel. *JAMA* 1987; 258:1.639-1.643.
95. Perelmutter L. IgG4: non-IgE mediated atopic disease. *Ann Allergy* 1984; 52:64-69.
96. Council on Scientific Affairs, American Medical Association. *In vitro* diagnostic testing and immunotherapy for allergy. Report I, part II of the Allergy Panel. *JAMA* 1987; 258:1.505-1.508.
97. Spector S, Farr R. Bronchial inhalation challenge with antigens. *J Allergy Clin Immunol* 1979; 64:580-586.
98. Frølund L, Madsen F, Svendsen UG, Weeke B. Reproducibility of standardized bronchial allergen provocation test. *Allergy* 1986; 41:30-36.
99. Cockcroft DW. Bronchial inhalation tests. II. Measurement of allergic (and occupational) bronchial responsiveness. *Ann Allergy* 1987; 59:89-98.
100. Cockcroft DW et al. Prediction of airway responsiveness to allergen from skin sensitivity to allergen and airway responsiveness to histamine. *Ann Rev Respir Dis* 1987; 135:264-267.