

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

DEPARTAMENT DE MEDICINA INTERNA



**AEROBIOLOGIA D'ESPORES D'*ALTERNARIA* ATMOSFÈRIQUES I
PREVALENCIA DE SENSIBILITZACIÓ A *ALTERNARIA ALTERNATA* EN
POBLACIÓ AMB RINITIS I/O ASMA AL·LÈRGIC A CATALUNYA**

Treball d'investigació que presenta el Llicenciat en Medicina i Cirurgia Joan Bartra Tomàs per a optar al Grau de Doctor en Medicina i Cirurgia.

**AEROBIOLOGIA D'ESPORES D'*ALTERNARIA* ATMOSFÈRIQUES I
PREVALENÇA DE SENSIBILITZACIÓ A *ALTERNARIA ALTERNATA* EN
POBLACIÓ AMB RINITIS I/O ASMA AL·LÈRGIC A CATALUNYA**

ANNA CISTERÓ BAHIMA, Doctora en Medicina i Cirurgia per la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICA: Que el present treball d'investigació "**AEROBIOLOGIA D'ESPORES D'ALTERNARIA ATMOSFÈRIQUES I PREVALENÇA DE SENSIBILITZACIÓ A ALTERNARIA ALTERNATA EN POBLACIÓ AMB RINITIS I/O ASMA AL·LÈRGIC A CATALUNYA**" ha estat realitzat per Joan Bartra Tomàs sota la meva Direcció, podent ser presentat com treball de Tesis per a la obtenció del grau de Doctor.

I per que Així consti, signo el present certificat a Barcelona a 21 de maig de 2004.

Signat

Dra. Anna Cisteró Bahima

JOAN PEDRO-BOTET MONTOYA, Professor en Medicina per la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICA: Que el present treball d'investigació “**AEROBIOLOGIA D'ESPORES D'ALTERNARIA ATMOSFÈRIQUES I PREVALENÇA DE SENSIBILITZACIÓ A ALTERNARIA ALTERNATA EN POBLACIÓ AMB RINITIS I/O ASMA AL·LÈRGIC A CATALUNYA**” ha estat realitzat per Joan Bartra Tomàs sota la meua Tutoria, podent ser presentat com treball de Tesis per a la obtenció del grau de Doctor.

I per que Així consti, signo el present certificat a Barcelona a 21 de maig de 2004.

Signat

Professor Joan Pedro-Botet Montoya

Als meus pares

A la meva germana

A Elena

A l'Andreu, que està en camí.

AGRAÏMENTS:

Considero de justícia mostrar el meu agraïment a tots els que han fet possible la realització d'aquesta Tesis.

A la Dra. Anna Cisteró, Directora de la present Tesis, per oferir-me l'oportunitat de realitzar-la i per tot el recolzament rebut. Ella m'ha demostrat i ensenyat que amb il·lusió i treball s'aconsegueix qualsevol fita proposada. Gràcies per a compartir amb tu moments de la teva brillant carrera professional i sobre tot de la teva amistat.

Al Dr. Josep Maria Torres per el recolzament i assessorament científic que tant generosament m'ha ofert en el transcurs de tota aquesta etapa.

A la Dra. Pilar García Ortega i el Dr. Pere Gaig per haver-se bolcat en la meva formació posant-hi tots els seus coneixements i esforços, que no han estat pocs. Pilar, Pere: gràcies també per la vostra amistat.

Al Dr. Ernesto Enrique per a impulsar-me i animar-me en la realització d'aquesta Tesi. Gracias por tu inagotable paciencia e insistencia.

A la Dra. Jordina Belmonte i el seu equip del Departament de Palinologia de la Universitat Autònoma de Barcelona per el seu treball aportat en la captació e identificació de les espores d' *Alternaria* atmosfèriques.

A tots els nombrosos professionals dels Serveis i Centres d'Al·lèrgia que han participat en aquest estudi posant-hi un important treball i sobre tot un temps d'on no el tenien.

A la Junta Directiva i Comitè Científic de la Societat Catalana d'Al·lèrgia i Immunologia Clínica Presidida per el Dr. Santi Nebot per haver-me confiat la Beca que ha donat peu a aquesta Tesi.

A la Conchita Miranda, Gemma Moreso i als companys Residents per haver fet de l'etapa de la meva formació com a Especialista un període del tot inoblidable.

A la Pepi Fuentes y Magdalena Sánchez per la seva gran vàlua professional i la seva amistat que m'han demostrat en els inicis de la meva vida professional.

Als meus pares, a qui tot els hi dec. Per el sacrifici de donar-nos tot el que ha estat en les seves mans. Gràcies per inculcar-nos el vostre esperit de treball i humilitat.

Als meus padrins per tot l'amor i bondat donats. Gràcies per poder haver-ho gaudit.

A la meva germana, per fer-me sentir una persona estimada i engendrar una joia del que m'ha fet padrí.

A Elena, motor de la meva vida i font de felicitat. Gracias por tu paciencia y ayuda en la realización de esta Tesis, pero sobre todo gracias por compartir tu vida conmigo.

1. <u>INTRODUCCIÓ</u>	1
1.1 Els fongs entre els sers vius.....	2
1.1.1 Introducció.....	2
1.1.2 Concepte de fong i estructura bàsica.....	3
1.1.3 Reproducció fongs.....	5
1.1.4 Creixement dels fongs.....	7
1.2 Classificació taxonòmica dels fongs.....	11
1.3 <i>Alternaria alternata</i> i al·lèrgia.....	30
1.3.1 Malalties en l'home produïdes per fongs.....	30
1.3.2 Al·lèrgia per fongs. Consideracions generals.....	31
1.3.3 Fongs implicats com origen d'aeroal·lèrgens.....	33
1.3.4 <i>Alternaria alternata</i>	40
1.3.4.1 Descripció micològica.....	41
1.3.4.2 Ecologia.....	42
1.4 Aerobiologia dels fongs.....	43
1.4.1 Propietats de la mostreig i dinàmica dels aeroal·lèrgens.....	43
1.4.1.1 Recol·lecció de partícules per mètodes gravitacionals...46	
1.4.1.2 Tècniques volumètriques.....	48
1.4.1.3 Filtres de membrana i recol·lecció isocinètica.....	48
1.4.1.4 Dispositius per succió.....	49
1.4.1.5 Impactadors de braç rotatori.....	52
1.4.2 Elaboració de les dades aerobiològiques.....	54
1.4.3 Dades aeromètriques dels fongs a l'atmosfera.....	55

1.5 Hipersensibilitat mitjançada per Ig E.....	63
1.5.1 Mètodes <i>in vivo</i> per a l'estudi de la hipersensibilitat Ig E específica:	
proves cutànies.....	67
1.5.1.1 Fisiopatologia de la resposta cutània.....	68
1.5.1.2 Proves cutànies.....	70
1.5.1.3 Proves de prick i punció.....	70
1.5.1.4 Proves intradèrmiques.....	72
1.5.1.5 Comparació de les proves cutànies.....	72
1.5.1.6 Graduació de les proves cutànies i criteri de positivitat..	74
1.5.1.7 Factors que afecten a les proves cutànies.....	75
1.5.1.8 Interpretació de les proves cutànies.....	78
1.5.1.9 Rellevància de les proves cutànies.....	79
1.5.2 Estudi de la hipersensibilitat Ig E específica: mètodes <i>in vitro</i>	80
1.5.2.1 Immunoglobulina Ig E sèrica total.....	80
1.5.2.2 Immunoglobulina Ig E sèrica específica.....	81
1.5.2.3 Factors que afecten a la mesura de Ig E sèrica específica	
.....	83
1.5.2.4 Significació de la mesura de la Ig E sèrica específica	84
1.6 Extractes al·lèrgics.....	85
1.6.1 Estandardització d'extractes al·lèrgics.....	86
1.6.2 Control dels extractes al·lèrgics mitjançant mètodes <i>específics in vitro</i>	86
1.6.3 Avaluació de l'activitat d'extractes al·lèrgics en unitats d'activitat biològica.....	87

1.6.3.1 Preparació d'extractes de referència segons la metodologia proposada per Aas.....	88
1.6.3.2 Preparació d'extractes de referència segons el mètode de Brighton.....	90
1.6.3.3 Preparació d'extractes de referència segons el mètode descriu per Turkeltaub.....	91
1.6.4 Preparació d'extractes al·lèrgics per a utilització clínica.....	93
1.6.4.1 Identificació dels al·lèrgens responsables de l'activitat al·lèrgica en extractes estandarditzats.....	94
1.6.4.2 Quantificació d'al·lèrgè majoritari.....	95
1.7 Al·lèrgens d' <i>Alternaria alternata</i>	98
1.8 Prevalença de sensibilització a <i>Alternaria alternata</i>	100
<u>2. JUSTIFICACIÓ</u>	103
<u>3. OBJECTIUS</u>	107
<u>4.MATERIAL I MÈTODES</u>	110
4.1 MATERIAL	111
4.1.1 Captació e identificació d'espores d' <i>Alternaria</i> atmosfèriques...111	
4.1.1.1 Captador Burkard.....	111
4.1.1.2 Captador Lanzoni.....	112
4.1.1.3 Microscopi òptic.....	113

4.1.2 Estudi epidemiològic de prevalença de sensibilització a <i>Alternaria alternata</i>	113
4.1.2.1 Extractes al·lèrgics d' <i>Alternaria alternata</i>	113
4.1.2.2 Llancetes per a proves cutànies.....	117
4.1.2.3 Lectura de les prova cutània: Prick-Film® System.....	117
4.1.2.4 Determinació de Ig E sèrica específica a <i>Alternaria alternata</i>	119
4.1.2.5 Característiques de la població de l'estudi.....	119
4.2 MÈTODES	119
4.2.1 Captació e identificació d'espores d' <i>Alternaria</i> atmosfèriques ..	119
4.2.2 Estudi epidemiològic de sensibilització a <i>Alternaria alternata</i>	122
4.2.2.1 Inclusió de la població de l'estudi.....	122
4.2.2.2 Realització de les proves cutànies (prick test).....	123
4.2.2.2.1 Bateria d'extractes d'aeroal·lèrgens comuns d'àrea.....	123
4.2.2.2.2 Extractes d' <i>Alternaria alternata</i> A i B.....	124
4.2.2.2.3 Extractes de control positiu i negatiu.....	124
4.2.2.2.4 Criteris d'exclusió.....	124
4.2.2.2.5 Lectura de les proves cutànies.....	125
4.2.2.2.6 Determinació de Ig E sèrica específica.....	126
4.2.2.2.7 Estudi estadístic.....	127

<u>5. RESULTATS</u>	128
5.1 Captació e identificació d'espores d' <i>Alternaria alternata</i> atmosfèriques.....	129
5.2 Estudi de prevalença de sensibilització a <i>Alternaria alternata</i>	163
5.3 Associació de sensibilització a <i>Alternaria alternata</i> i asma bronquial al·lèrgic.....	216
5.4 Associació de sensibilització a <i>Alternaria alternata</i> i població infantil.....	218
5.5 Sensibilitat de la Ig E sèrica específica a <i>Alternaria alternata</i> vs. prick test	220
<u>6. DISCUSSIÓ</u>	224
6.1 Material i mètodes.....	225
6.1.1 Captació e identificació de les espores d' <i>Alternaria</i> atmosfèriques.....	225
6.1.2 Població de l'estudi.....	226
6.1.3 Extractes d' <i>Alternaria alternata</i>	227
6.1.4 Lectura e interpretació de les proves cutànies <i>Alternaria alternata</i>	229
6.2 Resultats.....	230
6.2.1 Dades aeromètriques d'espores d' <i>Alternaria</i>	230
6.2.2 Estudi de prevalença de sensibilització a <i>alternaria alternata</i>	231
6.2.3 Associació de sensibilització a <i>alternaria alternata</i> i asma bronquial al·lèrgic.....	233
6.2.4 Associació de sensibilització a <i>Alternaria alternata</i> i població infantil...	234
6.2.5 Sensibilitat de la Ig e sèrica específica a <i>Alternaria alternata</i> vs. prick test a <i>Alternaria alternata</i>	235

<u>7.CONCLUSIONS</u>	237
-----------------------------------	-----

<u>8. BIBLIOGRAFIA</u>	239
-------------------------------------	-----

1. INTRODUCCIÓ

1.1 ELS FONGS ENTRE ELS SERS VIUS

1.1.1 INTRODUCCIO

L'estudi dels fongs constitueix un món apassionant tant per la seva procés biològic com per les malalties que se'ls i pot atribuir en l'home, animals i plantes. En la classificació dels fongs existeix encara avui en dia múltiples controvèrsies. La primera de les dificultats que apareix és delimitar què es un fong donat que es fàcil delimitar les formes superiors però quan s'analitzen les més petites i simples resulta molt difícil aclarir els nivells d'organització i incloure les espècies dintre d'elles. Una altra important dificultat radica en la peculiaritat que posseeixen diferents espècies de fongs de presentant-se amb aspectes i estructures diferents en determinades condicions ambientals així com la seva facilitat per mutar. Per tant, veiem que la seva identificació es difícil en no poques ocasions.

Des de el punt de vista mèdic les partícules reproductives dels fongs són les responsables de nombroses patologies; aquestes partícules reproductives experimenten regularment un transport atmosfèric¹. La càrrega aèria d'espores varia segons l'àrea geogràfica donat que el substrat sobre el que creixen els fongs, els cicles del desenvolupament de les plantes i les característiques geoclimàtiques incideixen directament sobre la seva reproducció²⁻⁸. Malgrat aquest fet hi ha espècies de fongs distribuïdes de manera universal, i freqüentment constitueixen el gruix del material biogènic en suspensió en l'aire⁹.

Entre els aeroal·lergens atmosfèrics, solament els fongs es deriven freqüentment de fonts microscòpiques, fet que dificulta en gran mesura el valor de les observacions de

camp. En conseqüència, el risc de la seva exposició es manifesta casi exclusivament mitjançant la mostra directa dels materials en suspensió.

La seva implicació en patologies com són la rinitis i l'asma al·lèrgic ha quedat demostrada en les darreres dècades a partir dels estudis sobre l'aerobiologia i el seu paper com al·lèrgic^{8,9,10}.

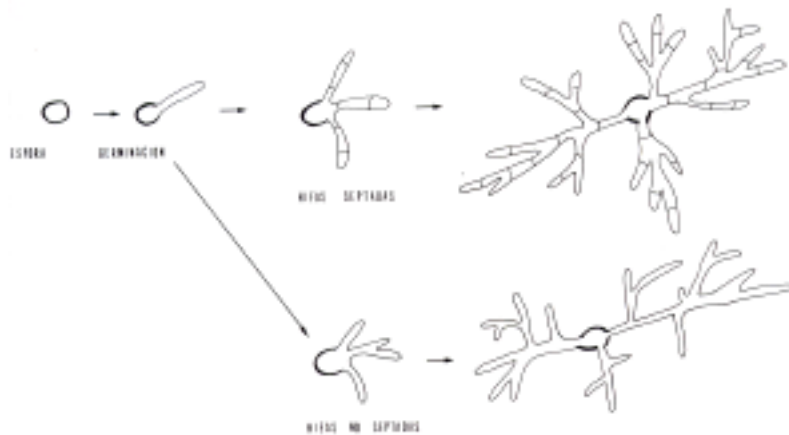
1.1 2 CONCEPTE DE FONG I ESTRUCTURA BÀSICA

Un fong és un organisme eucariota, heterotròfic que es desenvolupa en estructures filamentoses i menys freqüentment en estructures unicel·lulars, que es reproduïxen per espores. Els fongs poden ser sapròfits, mutualistes o paràsits. Obtenen els nutrients per absorció obtenint l'energia i el carboni de compostos orgànics sintetitzats per altres organismes. La seva paret cel·lular està formada per polisacàrids i proteïnes; els polisacàrids més importants són la quitina (polímer de N-acetil-glucosamina) i β -glicans en diferents proporcions. Els fongs constitueixen un grup molt nombrós d'organismes essent un clar exemple de la biodiversitat (s'han descrit aproximadament 500.000 però s'estima que poden existir entre 1 i 1.5 milions d'espècies diferents)¹¹⁻¹⁷.

Els fongs presenten bàsicament dos tipus de morfologia: una multicel·lular denominada filamentosa i una altra unicel·lular denominada levaduriforme. Els fongs filamentosos, representen el creixement més típic dels fongs microscòpics. Al microscopi òptic, els fongs filamentosos presenten unes estructures tubulars, formades per múltiples cèl·lules, que es denominen hifes¹¹⁻²⁰.

En la majoria dels fongs filamentosos, les hifes són tapiades i presenten septes que delimiten les diferents cèl·lules. Una excepció a aquesta descripció la constitueixen els

fongs del *Phylum Zygomycota* al presentar hifes que no tenen septes i es denominen sifonades. El diàmetre d'una hifa varia segons el grup al que pertany el fong oscil·lant entre 8-15 μm i 2-4 μm . Les hifes normalment es desenvolupen a partir d'espores, malgrat que també poden originar-se a partir de fragments d'altres hifes, i creixen gràcies al dipòsit de nous materials en el seu extrem, ramificant-se amb molta freqüència fins a formar un entramat de filaments que es denomina miceli:



En un fong filamentós es produeix una diferenciació en les funcions del miceli, de manera que el miceli vegetatiu penetra en el substrat per obtenir els nutrients, mentre que el miceli aeri es projecta cap l'exterior de la colònia i produeix les estructures reproductores¹¹⁻

20

Els fongs que presenten un creixement en forma de llevat generalment donen lloc a colònies llises que recorden als bacteris en mitjans de cultius sòlids. Les esmentades colònies estan constituïdes per agregats de cèl·lules individuals denominats llevats. Els

llevats es divideixen per gemació o per fissió binària. Un petit grup de fongs, però de gran importància en micologia clínica, presenten tant un creixement levaduriforme com micelar

11-20

1.1.3 REPRODUCCIÓ DELS FONGS

Existeixen dos tipus de reproducció en els fongs:

1. Reproducció asexual, vegetativa o somàtica
2. Reproducció sexual

1. Reproducció asexual:

Les formes de reproducció asexual es resumeixen en quatre:.

1.1 Segmentació de hifes: diferenciació de cada cèl·lula que compon la hifa, comportant-se com espores; en aquest cas es denominen artrospores u oidis

1.2 Fissió o bipartició: es la formació de dos cèl·lules filles a partir d'una cèl·lula mare que es parteix.

1.3 Gemació: Es dona una polarització en la cèl·lula mare, apareixent una evaginació, al mateix temps que es divideix el nucli. Aquest procés es típic dels llevats.

1.4 Formació d'espores : les espores són cèl·lules germinals que per sí soles poden originar un nou adult. Poden ser unicel·lulars o pluricel·lulars. Podem diferenciar dos tipus d'espores d'origen asexual

1.4.1 Esporangiospores: son endospores d'origen intern.

- 1.4.2 Conidis: són produïts en l'apex o en els costats de les hifes. Són exospores. La mida dels conidis pot oscil·lar entre 1-3 μ m en cas de ser unicel·lulars i 5-20 μ m si són pluricel·lulars.

2. Reproducció sexual

Implica la unió de dos nuclis compatibles i l'intercanvi genètic; el producte serà un nucli diploide o zigot. Pot ocórrer una meiosi i en aquest cas resulta un nucli haploide. La reproducció sexual és menys freqüents i reflexa les relacions filogenètiques entre els fongs. Els òrgans sexuals dels fongs s'anomenen gametangis i en el seu interior hi ha els gamets. El gametangi femella es denomina oogoni i el del mascle anteridi.

Els fongs homotàlics són els que en la mateixa colònia existeixen gametangis compatibles i són autofèrtils, mentre que els heterotàlics són els que requereixen de creuament entre diferents colònies.

La porció reproductiva dels fongs és aèria i està relacionada amb les estructures on es formen les espores que tenen diferents denominacions segons al grup taxonòmic que pertanyen i al seu origen sexual o asexual. La multiplicació en els fongs es realitza a través de cèl·lules germinals que reben el nom d'espores. Un mateix fong pot desenvolupar espores diferents; com a conseqüència d'aquest fet en ocasions es dificil la distinció d'espècies mitjançant les característiques de les espores. Quan les espores es desprenen del miceli reproductor són transportades a grans distàncies degut a la seva mida microscòpica.

La majoria dels fongs presenten una reproducció sexual i asexual. L'estat sexual es denomina telomorf o meiospòric i l'asexual anamorf o mitospòric. En un grup important de

fongs solament es coneix la reproducció asexual, bé perquè no es coneixen les condicions adequades per que es doni una reproducció sexual o bé perquè aquesta s'hagi perdut al llarg de l'evolució. Normalment els fongs es reproduïen tant sexualment com asexualment a partir d'espores. Els fongs produeixen milions d'espores, cadascuna amb la capacitat de formar una nova colònia.

1.1.4 CREIXEMENT DELS FONGS

L' esporulació (formació d'espores) i el creixement vegetatiu de les hifes estan sotmeses a condicions ambientals, geogràfiques i nutricionals determinades. Algunes condicions externes influeixen favorablement o desfavorablement en el creixement dels fongs; afecten sobretot factors com temperatura, llum, pH, humitat, oxigen i nutrients entre altres ^{9,17,21-24}.

1. Temperatura

D'acord amb la capacitat de suportar diferents temperatures els fongs poden dividir-se en dos grans grups:

1. Euritèrmics: suporten temperatures compreses entre amplis marges.
2. Estenotèrmics: suporten temperatures compreses entre marges molt estrets.

Normalment la capacitat de créixer permet uns marges de temperatura més amplis que la capacitat de fructificar. Tant per el creixement com per la fructificació existeixen tres marges de temperatura: mínim, òptim i màxim.

D'acord amb les necessitats tèrmiques els fongs poden dividir-se en:

1. Mesòfils: creixen en temperatures moderades compreses entre 10 i 40°C amb un òptim de 25 a 35°C.
2. Termòfils: Creixen a temperatures altes (entre 20 i 50°C). La temperatura òptima està al voltant dels 40°C. Els fongs termòfils es troben en la formació d'adobs, matèria orgànica en descomposició, nius o en determinats sols.
3. Termotolerants: creixen a temperatures altes però també poden fer-ho per baix els 20°C. El seu punt òptim està al voltant de 40-42°C.
4. Psicròfils: creixen en temperatures baixes compreses entre 0 i 20°C.

Degut a la gran adaptació dels fongs al medi, malgrat tenir unes necessitats tèrmiques per el seu creixement i reproducció, poden persistir a temperatures menors de 0°C en una forma normalment latent. Hi ha però algunes espècies de fongs que poden créixer i reproduir-se en aquestes condicions.

2. Llum

La llum és un factor important en l'ecologia dels fongs. Molts fongs no necessiten la llum solar expressant un fototropisme negatiu (hifes creixen en direcció contrària a la llum); en algunes espècies les hifes i els esporangis creixen cap a la llum expressant un fototropisme positiu. Molts fongs esporul·len en presència de la llum mentre que altres esporul·len millor amb l'obscuritat. S'ha comprovat que després d'il·luminar a una gran varietat de fongs, aquests produeixen una sèrie de components denominats P310 amb característiques esporogèniques.

3. pH

Els fongs creixen generalment en un interval de pH de 4.5 a 8. Freqüentment els fongs alteren el pH del medi en el que creixen per qualsevol dels 3 mecanismes següents:

1. Producció d'àcids orgànics
2. Absorció selectiva e intercanvi de ions
3. Producció de CO₂ y NH₃.
4. Oxigenació

La majoria dels fongs son aerobis estrictes. Si el medi es ric en nutrients els fongs poden créixer existint baixa concentració d'O₂ però la seva producció cel·lular és menor del 10% de la que s'aconseguiria en condicions aeròbiques òptimes.

5. Humitat

Per obtenir nutrients els fongs tenen que excretar enzims que degraden els polímers en monòmers i per que pugui haver-hi la difusió d'enzims, es requereix d'una pel·lícula d'aigua, per el que el creixement dels fongs precisa normalment de medis relativament humits per que hi hagi una fase líquida. Per alguns micòlegs el límit inferior de la humitat relativa per al creixement de la majoria dels fongs es del 70%, malgrat que poden créixer amb una major lentitud amb una humitat relativa inferior al 65%. Alguns tipus terrestres de fongs poden sobreviure a temps de sequera prolongats, malgrat que quan la humitat relativa ambiental es molt baixa els fongs poden trobar aigua lliure en algunes superfícies en la que la condensació de l'aigua està afavorida. La humitat atmosfèrica no sols afecta al creixement vegetal i l' esporul·lació sinó també a la dispersió. No es sorprenent que amb la pluja, la boira i les condicions relativament humides que predominen durant les hores d'obscuritat apareixen elevades concentracions atmosfèriques d'espores balistospores degut a les seves característiques físiques donat que es presenten al medi ambient en forma de masses mucinoses; per un altre costat hi ha una altra sèrie de fongs en els que la dispersió de les espores es veuen afavorides amb un nivell d'humitat relativa ambiental baix i amb

l'acció de la força de la velocitat del vent, essent màxima durant en els períodes vespertins. En aquest moment espores d'espècies dels tipus *Cladosporium*, *Alternaria*, *Epicoccum* entre altres arriben a concentracions màximes.

6. Nutrients

Molts fongs aprofiten qualsevol resta orgànic per obtenir els nutrients. Casi es podria assegurar que no hi ha cap compost orgànic natural que no pugui ser utilitzat per un fong o un altre. Els carbohidrats d'origen vegetal constitueixen la font d'energia més abundant per als fongs en la natura. El polímer més important disponible per als fongs en una àmplia gamma d'ambients és la cel·lulosa. Com a font de nitrogen poden utilitzar els nitrats, el que significa posseir un grau més elevat d'independència nutritiva, o l'amoní de les amines. Moltes varietats de fongs, entre ells els deuteromicets prosperen precisant únicament fonts inorgàniques de nitrogen. Com a font de sofre poden utilitzar els aminoàcids que el contenen en forma de SH o l'absorbeixen en forma de sulfat.

Els fongs sapròfits degraden el material vegetal. Sense ells el planeta estaria ple d'arbres morts i ens afogàriem en les nostres pròpies deixalles.

7. Geografia

Segons l'indret geogràfic i d'acord amb les característiques climàtiques el tipus de vegetació predominant tindrà unes característiques determinades que influiran en l'existència d'una major o menor concentració d'espores de fongs. En general els prats de regions temperades i els camps de cultius (sobre tot de cereals) són fonts especialment importants d'*Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum* entre altres mentre que les zones boscoses aquestes espècies fúngiques no són tant freqüents.

1.2 CLASSIFICACIÓ TAXONÒMICA DELS FONGS

Inicialment els fongs es varen classificar dintre del regne *plantae* al considerar-se sers vius immòbils que presenten estructures que s'assenten fermament en els substrats sobre el que creixen. Posteriorment al aplicar els coneixements de biologia molecular es va observar que taxonòmicament estaven més a prop del regne animal que al de les plantes. Finalment s'han classificat des de els dictàmens de Margulis en un regne propi: el regne del fongs²⁵⁻²⁷. (veure taula següent).

REGNE	CARACTERISTIQUES PRINCIPALS	MEMBRES REPRESENTATIUS
MONERA	Cèl·lules procariotes Nutrició absortiva Reproducció assexual per fissió binària	Bacteris, Algues verdes, ... 14 divisions
PROTISTA	Cèl·lules eucariotes Nutrició absortiva, ingestiva o fotoautotròfica Reproducció mitòtica Uni o pluricel·lulars	Protozous, Oomicets, ... 30 divisions
FONGS	Cèl·lules eucariotes Nutrició absortiva	Zigomicets, Ascomicets, Basidiomicets,

	Meiosis zigòtica Unicel·lulars o filamentosos Paret cel·lular amb quitina	Crhitudomicets, Deuteromicets 5 divisions
PLANTES	Eucariotes Fotoautotròfiques	Molsa, Plantes vasculars, ... 9 divisions
ANIMALS	Cèl·lules eucariotes Heterotròfics Meiosis gamètica	32 divisions

Exposar una visió general clara i concisa d'un món complex com és el de la classificació taxonòmica dels fongs no es una tasca fàcil. Al llarg dels anys s'han realitzat diferents classificacions, arribant-se a un punt comú: realitzar una classificació en funció de la forma de reproduir-se sexualment. Com moltes espècies solament es reproduïen asexualment s'ha creat la categoria dels fongs imperfectes o *Deuteromycotina*, entre els quals es troba la gran majoria dels fongs patògens per l'home i els animals. En cas de que una espècie de fongs tingui dos formes de reproduir-se tal i com em descrit anteriorment, en micologia mèdica es sol utilitzar el nom que identifica a la forma de reproducció asexual.

Les espores asexuals generalment es produeixen en hifes especialitzades i es denominen de diferent forma segons la seva morfologia. Així els fongs. Els fongs del *phylum Basidiomycota* produeixen basidiospores en l'exterior d'una estructura denominada basidi. Els fongs del *phylum Ascomycota* produeixen ascospores en l'interior d'una

estructura en forma de sac denominada asco mentre que els fongs del *phylum Zygomycota* produeixen zigospores.

A continuació es detalla la classificació dels fongs segons Parker¹⁴

Divisió *Myxomycota*

Classe *Acrasiomycetes*

Classe *Myxomycetes*

Subclasse *Ceratiomyxomycetidae*

Ordre *Ceratiomyxales*

Família *Clastodermataceae*

Subclasse *Myxogastromycetidae*

Ordre *Echinosteliales*

Família *Clastodermataceae*

Família *Echinosteliaceae*

Ordre *Liceales*

Família *Cribariaceae*

Família *Liceaceae*

Família *Reticulariaceae*

Ordre *Physarales*

Família *Didymiaceae*

Família *Physaraceae*

Ordre *Trichiales*

Família *Dianemaceae*

Família *Trichiaceae*

Subclasse *Stemonitomycetidae*

Ordre *Stemonitales*

Família *Stemonitaceae*

Classe *Plasmodiophoromycetes*

Ordre *Plasmodiophorales*

Família *Plasmodiophoraceae*

Divisio *Eumycota*

Subdivisio *Ascomycotina*

Classe *Discomycetes*

Ordre *Cyttariales*

Família *Cyttariaceae*

Ordre *Heliales*

Família *Asocorticiaceae*

Família *Dermateaceae*

Família *Geoglossaceae*

Família *Hemiphaciadiaceae*

Família *Hyaloscyphaceae*

Família *Leociateae*

Família *Orbiliaceae*

Família *Sclerotiniaceae*

Ordre *Medeolariales*

Família *Medeolariaceae*

Ordre *Ostropales*

Família *Stictidaceae*

Ordre *Peziales*

Família *Aleuriaceae*

Família *Ascobolaceae*

Família *Helvellaceae*

Família *Morchellaceae*

Família *Otidiaceae*

Família *Pezizaceae*

Família *Pyronemataceae*

Família *Sarcoscyphaceae*

Família *Thelebolaceae*

Ordre *Phacidiales*

Família *Cryptomycetaceae*

Família *Phacidiaceae*

Família *Rhytismataceae*

Ordre *Tuberales*

Família *Geneaceae*

Família *Terfeziaceae*

Família *Tuberaceae*

Classe *Hemiascomycetes*

Ordre *endomycetales*

Família *Ascoideaceae*

Família *Endomycetaceae*

Família *Saccharomycetaceae*

Família *Spermophthoaceae*

Ordre *Protomycetales*

Família *Protomycetaceae*

Ordre *Taphrinales*

Família *Taphrinaceae*

Classe *Loculoascomycetes*

Subclasse *Loculoanoteromycetidae*

Ordre *Chaetothyriales*

Família *Chaetothyriaceae*

Família *Herpotrichiellaceae*

Família *Metacapnodiaceae*

Família *Naetrocymbaceae*

Família *Trichothyriaceae*

Ordre *Verrucariales*

Família *Verrucariaceae*

Subclasse *Loculoedaphomycetidae*

Ordre *Hysteriales*

Família *Hysteriaceae*

Família *Opegraphaceae*

Família *Parmulariaceae*

Família *Patellariaceae*

Família *Phillipsiellaceae*

Família *Roccellaceae*

Ordre *Melanommatales*

Família *Didyomosphaeriaceae*

Família *Fenestellaceae*

Família *Lophiaceae*

Família *Lophiostomataceae*

Família *Massariaceae*

Família *Melanommataceae*

Família *Microthyriaceae*

Família *Mycroglanaceae*

Família *Sporomiaceae*

Família *Strigulaceae*

Família *Trypetheliaceae*

Ordre *Pleosporales*

Família *Arthopyreniaceae*

Família *Cucurbitariaceae*

Família *Dimeriaceae*

Família *Massarinaceae*

Família *Mesnieraceae*

Família *Micropeltidaceae*

Família *Munkiellaceae*

Família *Phaeosphaeriaceae*

Familia *Phaeotricaceae*

Familia *Pleomassariaceae*

Familia *Pleosporaceae*

Familia *Pyrenophoraceae*

Familia *Tubeufiaceae*

Familia *Venturiaceae*

Subclasse *Loculoparenchemycetidae*

Ordre *Asterinales*

Familia *Asterinaceae*

Familia *Brefeldiellaceae*

Familia *Capnodiaceae*

Familia *Englerulaceae*

Familia *Parodiopsdidaceae*

Familia *Saccardiaceae*

Familia *Schizothyriaceae*

Familia *Stephanothecaceae*

Familia *Vizellaceae*

Ordre *Dothiedeales*

Familia *Dothiedeaceae*

Familia *Dothioraceae*

Familia *Eremomycetaceae*

Familia *Euantennariaceae*

Familia *Pseudosphaeriaceae*

Subclasse *Loculoplectascomycetidae*

Ordre *Myrangiiales*

Familia *Arthoniaceae*

Familia *Cookellaceae*

Familia *Elsinoëaceae*

Familia *Myriangiaceae*

Familia *Piedraiaceae*

Familia *Saccardiumulaceae*

Familia *Seuratiaceae*

Classe *Pleomycetes*

Ordre *Ascopherales*

Familia *Ascophareaceae*

Familia *Monascaceae*

Ordre *Elaphomycetales*

Familia *Elaphomycetaceae*

Ordre *Eurotiales*

Familia *Amorphothecaceae*

Familia *Cephalothecaceae*

Familia *Ophiostomataceae*

Familia *Trichocomaceae*

Ordre *Gymnascales*

Familia *Gymnoascaceae*

Familia *Onygenaceae*

Ordre *Microascales*

Familia *Microascaceae*

Classe *Pyrenomycetes*

Ordre *Chaetomiales*

Familia *Chaetomiaceae*

Ordre *Clavicipitales*

Familia *Clavicipitaceae*

Ordre *Coronophorales*

Familia *Coronophoraceae*

Ordre *Coryneliales*

Familia *Coryneliaceae*

Ordre *Diaporthales*

Familia *Diaporthaceae*

Familia *Halosphaeriaceae*

Ordre *Erysiphales*

Familia *Erysiphaceae*

Ordre *Hypocreales*

Familia *Hypocreaceae*

Ordre *Laboulbeniales*

Subordre *Herpomycetinae*

Familia *Herpomycetaceae*

Subordre *Laboulbeniineae*

Familia *Ceratomycetaceae*

Familia *Euceratomycetaceae*

Familia *Laboulbeniaceae*

Ordre *Melanosporales*

Familia *Melanosporaceae*

Ordre *Meliolales*

Familia *Meliolaceae*

Ordre *Sordariales*

Familia *Sordariaceae*

Ordre *Xylariales*

Familia *Coniochaetaceae*

Familia *Diatrypaceae*

Familia *Phyllachoraceae*

Familia *Xylariaceae*

Subdivisió *Basidiomycotina*

Classe *Gasteromycetes*

Ordre *Agaricogastreales*

Familia *Asterogastraceae*

Familia *Boletogastraceae*

Familia *Cribbiaceae*

Familia *Secotiaceae*

Ordre *Gauteriales*

Familia *Gauteriaceae*

Ordre *Hymenogastrales*

Familia *Gasterellaceae*

Familia *Hymenogastraceae*

Ordre *Lycoperdales*

Familia *Arachniaceae*

Familia *Geastraceae*

Familia *Lycoperdaceae*

Familia *Mesophelliaceae*

Ordre *Melanogastrales*

Familia *Melanogastraceae*

Familia *Torrendiaceae*

Ordre *Nidulariales*

Familia *Nidulariaceae*

Familia *Sphaerobolaceae*

Ordre *Phallales*

Familia *Clathraceae*

Familia *Hysterangiaceae*

Familia *Phallaceae*

Familias “*incertae sedis*”

Claustulaceae

Gelopellidiaceae

Protogastraceae

Ordre *Podaxales*

Familia *Podaxaceae*

Ordre *Protogastreales*

Familia *Gastroporiaceae*

Familia *Hemigastraceae*

Familia *Protogastraceae*

Ordre *Sclerodermatales*

Familia *Astraeaceae*

Familia *Broomeiaceae*

Familia *Glischodermataceae*

Familia *Sclerodermatataceae*

Ordre *Tulostomatales*

Familia *Calostomataceae*

Familia *Tulostomataceae*

Classe *Hymenomyces*

Ordre *Agaricales*

Familia *Agaricaceae*

Familia *Amanitaceae*

Familia *Auriscalpiaceae*

Familia *Bolbitiaceae*

Familia *Boletaceae*

Familia *Bondarzewiaceae*

Familia *Cantharellaceae*

Familia *Clavariaceae*

Familia *Coniophoraceae*

Familia *Coprinaceae*

Familia *Corticaceae*

Familia *Cortinariaceae*

Familia *Cypellaceae*

Familia *Echinodontiaceae*

Familia *Fistulinaceae*

Familia *Ganodermataceae*

Familia *Gomphidiaceae*

Familia *Gomphaceae*

Familia *Heriaciaceae*

Familia *Hydnaceae*

Familia *Hygrophoraceae*

Familia *Hymenochaetaceae*

Familia *Lachnocladiaceae*

Familia *Lepiotaceae*

Familia *Paxillaceae*

Familia *Polyporaceae*

Familia *Rhodophyllaceae*

Familia *Russulaceae*

Familia *Schizophyllaceae*

Familia *Thelephoraceae*

Familia *Tricholomataceae*

Familia *Volvariaceae*

Ordre *Exobasidiales*

Familia *Exobasidiaceae*

Classe *Phragmobasidiomycetes*

Subclasse *Heterobasidiomycetidae*

Ordre *Eutremellales*

Familia *Auriculariaceae*

Familia *Hyaloriaceae*

Familia *Phleogenaceae*

Familia *Sirobasidiaceae*

Familia *Tremellaceae*

Ordre *Septobasidiales*

Familia *Septobasidiaceae*

Subclasse *Metabasidiomycetidae*

Ordre *Metatremellales*

Familia *Ceratobasidiaceae*

Familia *Dacrymycetaceae*

Familia *Tulasnellaceae*

Classe *Teliomycetes*

Ordre *Uredinales*

Familia *Melamporaceae*

Familia *Phragmidiaceae*

Familia *Pucciniaceae*

Familia *Pucciniaceae*

Familia *Pucciniastraceae*

Familia *Raveveliaceae*

Ordre *Ustilaginales*

Familia *Tilletiaceae*

Familia *Ustilaginaceae*

Subdivisió *Deuteromycotina*

Classe *Coelomycetes*

Ordre *Melanconiales*

Familia *Melanconiaceae*

Ordre *Sphaeropsidiales*

Familia *Discellaceae*

Familia *Leptostromataceae*

Familia *Nectroidaceae*

Familia *Sphaeropsidaceae*

Classe *Hyphomycetes*

Ordre *Agonomycetales*

Familia *Agonomycetaceae*

Ordre *Hyphomycetales*

Familia *Dematiaceae*

Familia *Moniliaceae*

Ordre *Stilbellales*

Familia *Stilbellaceae*

Ordre *Tuberculariales*

Familia *Tuberculariaceae*

Subdivisió *Mastigomycotina*

Classe *Chytridiomycetes*

Ordre *Blastocladales*

Familia *Blastocladiaceae*

Familia *Catenariaceae*

Familia *Coelomycetaceae*

Ordre *Chytridiales*

Serie *Inoperculatae*

Familia *Achlyogetonaceae*

Familia *Cladochytriaceae*

Familia *Olpidiaceae*

Familia *Phlyctidiaceae*

Familia *Physodermataceae*

Familia *Rhizidiaceae*

Familia *Synchytrtiaceae*

Serie *Operculatae*

Familia *Gonapodyaceae*

Familia *Monoblepharidaceae*

Classe *Hyphochytridiomycetes*

Ordre *Hypochytriales*

Familia *Anisolpidiaceae*

Familia *Hyphochytriaceae*

Familia *Rhizidiomycetaceae*

Classe *Oomycetes*

Ordre *Lagenidales*

Familia *Lagenidiaceae*

Familia *Olpidiopsidaceae*

Familia *Sirolpodiaceae*

Ordre *Leptomiales*

Familia *Leptomitaceae*

Familia *Rhipidiaceae*

Ordre *Peronosporales*

Familia *Albuginaceae*

Familia *Peronosporaceae*

Familia *Phythiaceae*

Ordre *Saprolegniales*

Familia *Ectrogellaceae*

Familia *Haliphthoraceae*

Familia *Leptolegniellaceae*

Familia *Saprolegniaceae*

Familia *Traustochytriaceae*

Subdivisió *Zygomycotina*

Classe *Trichomycetes*

Ordre *Amoebidiales*

Familia *Amoebidiaceae*

Ordre *Asellariales*

Familia *Asellaraiceae*

Ordre *Eccrinales*

Familia *Eccrinaceae*

Familia *Palavasciaceae*

Familia *Parataeniellaceae*

Ordre *Harpellales*

Familia *Harpallaceae*

Familia *Legeriomycetaceae*

Classe *Zygomycetes*

Ordre *Dimargaritales*

Familia *Dimargaritaceae*

Ordre *Endogonales*

Familia *Endogonaceae*

Ordre *Entomophthorales*

Familia *Basidiobolaceae*

Familia *Entomophthroaceae*

Ordre *Kickxellales*

Familia *Kickxellaceae*

Ordre *Mucorales*

Familia *Choanephoraceae*

Familia *Cunninghamellaceae*

Familia *Mortierellaceae*

Familia *Mucoraceae*

Familia *Pilobolaceae*

Familia *Radiomycetaceae*

Familia *Saksenaeaceae*

Familia *Syncephalastraceae*

Familia *Thamnidiaceae*

Ordre *Zoopagales*

Familia *Cochlonemataceae*

Familia *Helicocephalidaceae*

Familia *Piptocephalidaceae*

Familia *Zoopagaceae*

1.3 ALTERNARIA ALTERNATA I AL·LÈRGIA

1.3.1 MALALTIES EN L'HOME PRODUIDES PER FONGS

No existeixen paràmetres perfectament definits que ens permeti catalogar als fongs com a útils o perjudicials. En general tots els fongs són útils ja que tenen unes funcions dintre del cicle biològic per el que podríem dir que no són solament útils sinó també necessaris. Aquest fet no treu que no hi hagi fongs que també puguin ser patògens per plantes, animals i els homes essent algun d'ells inclòs causa de mort.

De les moltes espècies de fongs existents només un baix percentatge tenen la capacitat de produir alguna determinada malaltia en l'home. Aquest fet demostra que

malgrat que totes les persones estem exposades a un gran nombre de fongs aquests són habitualment eliminats pels mecanismes defensius.

Els fongs poden ser causa de infeccions al envair o parasitar teixits produint el que denominem micosis que tant poden ser superficials com dermo-hipodèrmiques i profundes o disseminades³⁰⁻³³.

També poden causar intoxicacions alimentàries al ser ingerits produint les micotoxicosis a partir de les micotoxines com són les aflatoxines, rubitoxines, fumitoxines, àcid apicladospòrix³⁴⁻³⁹.

A partir de la seva ingesta també pot produir-se reaccions d'al·lèrgia alimentària en pacients prèviament sensibilitzats⁴⁰⁻⁴¹.

Per últim, alguns fongs poden actuar com aeroal·lergens a nivell de la mucosa ocular, nasal i/o bronquial podent-se desenvolupar malalties tant diverses com la rinoconjuntivitis i/o asma al·lèrgics, sinusitis fúngica al·lèrgica, aspergilosis broncopulmonar al·lèrgica (ABPA) i les alveolitis al·lèrgiques extrínseques⁴²⁻⁴⁹.

1.3.2 AL·LÈRGIA PER FONGS. CONSIDERACIONS GENERALS

L'al·lèrgia per fongs es coneguda des de fa més de dos segles, més concretament des de l'any 1726, quan Floyer va observar símptomes asmàtics en pacients que havien visitat unes bodegues⁵⁰. Posteriorment l'any 1873 al descriure Blackley un quadre congestiu per inhalació d'espores d'un cultiu de fongs, concretament de *Penicillium* i *Chaetomium*⁵¹. L'any 1924 Van Leeuwen, a Holanda va relacionar l'aparició de símptomes asmàtics amb la presència d'espores fúngiques en l'ambient⁵². Es curiós el fet que Van Leeuwen estudiava l'associació entre fongs i asma bronquial en l'hospital St. Mary de

Londres en el laboratori que estava molt a prop de el Dr. Fleming, el cèlebre descobridor de la penicil·lina. Es possible doncs, que l'interès dels al·lèrgòlegs per les espores fúngiques ajudés a propiciar el començament de l'era de la antibioteràpia.

En els anys següents es va demostrar que la prevalença de conidis fúngics en l'ambient es relacionava amb una major presència de reacció cutània positiva als antígens fúngics. Prince i col·laboradors⁵³ i Feinberg⁵⁴ varen descobrir que l'aire d'espais oberts era un reservori important i demostraren que molts dels seus pacients presentaven reaccions cutànies front als extractes de fongs. Posteriorment el paper de la hipersensibilitat a fongs en una àmplia varietat de malalties al·lèrgiques es va anant establint mitjançant proves de provocació. Harris, en el 1941 va exposar a pacients a 1 gr de pols d'*Alternaria* en un local tancat, provocant asma i rinitis en 10 dels 12 que presentaven unes proves cutànies positives i una història clínica compatible amb al·lèrgia respiratòria per espores fúngiques⁵⁵.

L'exposició als al·lèrgens fúngics es produeix tant en espais oberts com tancats. Algunes espècies de fongs es troben en major concentració en l'atmosfera respecte ambients d'interior com es el cas de *Cladosporium* i *Alternaria* mentre que altres espècies predominen en els ambients d'interior com pot ser el cas de *Penicillium* i *Aspergillus*⁵⁶⁻⁶⁰.

El número d'espores de fongs en l'aire pot variar de menys de 200 a més d'un milió per metre cúbic. El número d'espores, varia amb el moment del dia, l'estació de l'any, la localització geogràfica, la presència de fonts d'esporejació i un llarg etc. No és infreqüent que el recompte d'espores fúngiques superi els 4000 per metre cúbic, essent generalment les espècies més predominants en ambients d'exterior les de *Cladosporium* i *Alternaria*^{6, 7,}

61-67

La possibilitat de que una persona inhali espores fúngiques tant en ambients tancats com en l'exterior és doncs segons tot lo anteriorment descrit elevada. La resposta al·lèrgica als fongs es relaciona d'una manera més directa amb les espores que amb la presència de restes micelars o altres cèl·lules fúngiques^{8,46,68}.

Malgrat que la concentració d'espores de *Cladosporium* és superior a la d'*Alternaria* hi ha més pacients al·lèrgics a *Alternaria*⁶⁹⁻⁷⁵. De fet, la sensibilització a fongs i l'exposició a al·lèrgens fúngics aerovagants s'han associat amb episodis greus d'asma i sembla existir una major mortalitat en els pacients asmàtics sensibilitzats a *Alternaria*⁷⁶⁻⁸¹.

No sempre és possible establir una relació entre directe entre els recomptes fúngiques en l'atmosfera i la presència de simptomatologia al·lèrgica. La patologia al·lèrgica més freqüentment relacionada per l'exposició a fongs és la rinitis i l'asma bronquial.

Sense cap dubte es pot assegurar que els fongs són causants d'al·lèrgia en persones sensibilitzades, i els darrers estudis epidemiològics comproven que la seva prevalença és superior al que anteriorment es pensava, essent la població pediàtrica la més afectada^{71,73,75,82-90}.

1.3.3 FONGS IMPLICATS COM ORIGEN D'AEROAL.LERGENS

Les espores dels fongs i altres partícules reproductives de molts fongs experimenten regularment un transport atmosfèric¹. Segons l'àrea geogràfica o hàbitat estudiat poden existir variacions importants tant en la càrrega total d'espores atmosfèriques com l'existència de diferents espècies, influenciades per les característiques del substrat sobre el que creixen i es reproduïxen els fongs i les característiques geoclimàtiques^{17,21-}

²⁴. Els múltiples estudis aerobiològics mostren la biodiversitat de les espècies fúngiques i les variacions en la seva concentració atmosfèrica malgrat que hi ha espècies de fongs universals i que freqüentment constitueixen el gruix del material biogènic en suspensió en l'aire^{9,59,63,68}.

La implicació de les espores fúngiques en patologies al·lèrgiques com són la rinitis/conjuntivitis i l'asma al·lèrgic ha quedat demostrada en les darreres dècades a partir dels estudis sobre l'aerobiologia i el seu paper com al·lèrgic^{8-10,46,60,72,80,85}.

D'acord amb la classificació taxonòmica dels fongs anteriorment descrita i basada en la realitzada per Parker¹⁴ en la taula següent s'especifiquen els fongs que s'han descrit com al·lèrgics coneguts i potencials^{8-10,17,40,41,47,63,80,81,91-110}.

Divisio *Eumycota*

Subdivisio *Ascomycotina*

Classe *Discomycetes*

Ordre *Heliales*

Família *Sclerotiniaceae*

Botryotinia

Monilina

Classe *Loculoascomycetes*

Subclasse *Loculoanoteromycetidae*

Ordre *Pleosporales*

Família *Phaeosphaeriaceae*

Didymella

Familia *Pleosporaceae*

Pleospora (= *Stemphylium*)

Familia *Tubeufiaceae*

Helminthosporium

Classe *Plectomycetes*

Ordre *Eurotiales*

Familia *Amorphotheaceae*

Cladosporium

Pullularia (= *Aeurobasidium*)

Familia *Trichocomaceae*

Acremonium

Aspergillus

Eurotium

Paecilomyces

Penicillium

Ordre *Gimnascales*

Familia *Gymnascaceae*

Trychophyton

Classe *Pyrenomycetes*

Ordre *Chaetomiales*

Familia *Chaetomiaceae*

Chaetomium

Ordre *Clavicipitales*

Familia *Clavicipitiaceae*

Claviceps

Ordre *Erysiphales*

Familia *Erysiphaceae*

Erisiphe

Ordre *Hypocreales*

Familia *Hypocraceae*

Fusarium

Trichoderma

Ordre *Sordariales*

Familia *Sordariaceae*

Neurospora (=Monilia)

Ordre *Xylariales*

Familia *Xylariaceae*

Daldinia

Xylaria

Subdivisió *Basidiomycotina*

Classe *Gasteromycetes*

Ordre *Lycoperdales*

Familia *Lycoperdaceae*

Calvatia

Ordre *Sclerodermatales*

Familia *Sclerodermataceae*

Pisolithus

Scleroderma

Classe *Hymenomyces*

Ordre Agaricales

Familia *Agaricaceae*

Agaricus

Familia *Amanitaceae*

Amanita

Familia *Bolbitiaceae*

Agrocybe

Familia *Boletaceae*

Boletus

Familia *Cantharellaceae*

Cantharellus

Familia *Coniophoraceae*

Serpula (=Merulius)

Familia *Coprinaceae*

Coprinus

Familia *Corticaceae*

Stereum

Familia *Cortinariaceae*

Psilocybe

Familia *Ganodermataceae*

Ganoderma

Familia *Hymenochaetaceae*

Inonotus

Familia *Lepiotaceae*

Chlorophyllum

Familia *Polyporaceae*

Polyporus

Familia *Tricholomataceae*

Armillaria

Armarillariela

Pleurotus

Classe *Phragmobasidiomycetes*

Subclasse *Metabasidiomycetidae*

Ordre *Metatremellales*

Familia *Cacrymycetaceae*

Dacrymyces

Classe *Teliomycetes*

Ordre *Uredinales*

Familia *Pucciniaceae*

Puccinia

Ordre *Ustilaginales*

Familia *tilletiaceae*

Tilletia

Tilletiopsis

Familia *Ustilaginaceae*

Ustilago

Urocystis

Subdivisió *Deuteromycotina*

Classe *Coelomycetes*

Ordre *Shaeropsidales*

Familia *Shaeropsidaceae*

Phoma

Classe *Hyphomycetes*

Ordre *Hyphomycetales*

Familia *Dematiaceae*

Alternaria

Curvularia

Drechslera

Torula

Familia *Moniliaceae*

Candida

Rhodotorula

Sporotrichum

Subdivisió *Zygomycotina*

Classe *Zygomycetes*

Ordre *Mucorales*

Familia Mucoraceae

Absidia

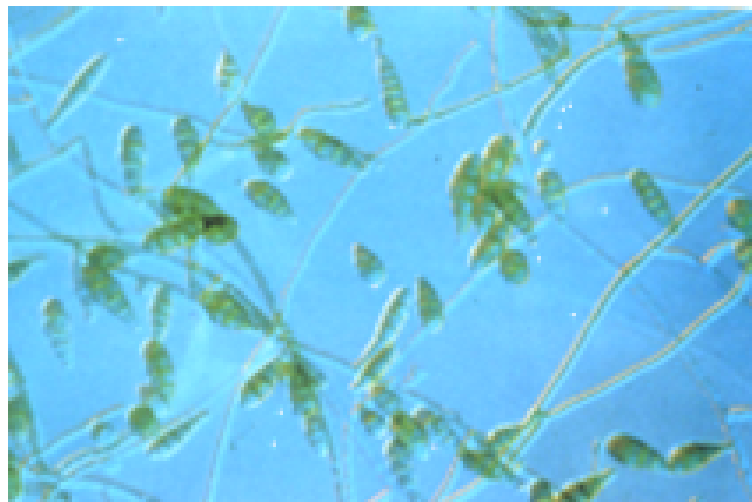
Mucor

Rhizopus

1.3.4 ALTERNARIA ALTERNATA

1.3.4.1 DESCRIPCIÓ MICOLÒGICA:

Fong filamentós amb conidiòfors simples pluricel·lulars amb septums, formant-se en els seus extrems conidis muriformes, de color marrons fosc, amb septes transversals i verticals de disposició irregular . Per gemació de la cèl·lula apical es genera un nou conidi, formant-se llargues cadenes de 10 o més conidis ^{17, 111-114}



La seva posició taxonòmica dintre dels regne dels fongs és la següent:

Phylum: Eumycota

Subphylum: Deuteromycota

Classe: Hyphomycetes

Ordre: Hyphomycetales

Familia: Dematiaceae

Gènere: Alternaria

Espècies: Alternaria alternata

Alternaria consortiale

Alternaria tenuissima

Alternaria chartarum

Alternaria oleraceae

Alternaria saponariae

Alternaria alternata té els següents sinònims dintre de la terminologia micològica mèdica

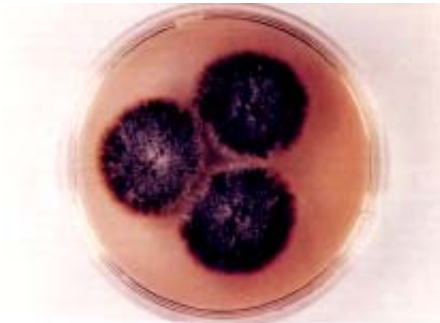
114.

- *Alternaria geophila*
- *Alternaria Stemphiloides*
- *Alternaria tenuis*
- *Torula alternata*

1.3.4.2.ECOLOGIA:

Creix com sapròfit o paràsit sobre plantes i material vegetal, podent-se trobar en aliments i teixits.

En els invernacles s'aïlla en les plantes malaltes o mortes per la seva tendència a habitar substrats orgànics en descomposició. Se'l coneix com "florit negre".



Dintre dels domicilis pot aïllar-se de l'aire, pols i llocs d'humitat com són els marcs de les finestres en les que es produeix condensació. La seva distribució és universal i es considera que es un fong d'espais oberts. Els conidis s'aïllen amb freqüència de l'aire lliure durant el temps calorós. L'interval de temperatura de creixement varia entre 2 i 32 °C, amb temperatures òptimes entre els 25 i 28°C^{9,17, 114,115}. Entre els metabolits produïts per *Alternaria Alternata* es troben diversos que poden ser considerats com micotoxines, destacant el monometileter de alternariol, altertoxinas I i II (toxines mutàgenes), altenueno, altenuisina i àcid tenuazònic¹¹⁶. Aquestes toxines poden trobar-se en tomàquets, pomes, olives, etc.

1.4 AEROBIOLOGIA DELS FONGS

1.4.1 PROPIETATS DE MOSTREIG I DINÀMICA DELS AEROAL·LERGENS

L'Aerobiologia s'ocupa de l'origen, alliberació, transport, dipòsit i efecte de les partícules biològiques transportades per l'aire⁹. En conseqüència, es pot afirmar que es tracta d'una ciència multidisciplinària. Els mètodes per estudiar els al·lèrgens inhalables, com són les espores fúngiques, reflecteixen la contribució realitzada per botànics, patòlegs vegetals, meteoròlegs així com per els metges. Aquesta diversitat i l'oportunitat de satisfer interessos relacionats amb l'investigació de certes malalties o inclòs poder entendre part de la història natural ha fet que aquest camp tingui un gran atractiu per a molts professionals.

El valor de tenir una idea sobre la prevalença de les partícules específiques transportades en l'aire es va fer evident per als primers investigadors en el camp de l'al·lèrgologia, de manera que s'han vingut fent estudis aeromètrics durant més d'un segle. Els pioners, entre els que destacaven Blackley i Mars varen mostrar una confiança incondicional en els mètodes gravitacionals de recol·lecció de partícules^{51,117} fins fa relativament pocs anys quan es va disposar de les tècniques volumètriques (és a dir, es relacionaven exactament les quantitats de partícules recollides amb volums determinats de mostres d'aire).

Les partícules en suspensió experimenten contínuament acceleracions verticals i horitzontals exercides per una atmosfera mòbil, i un cop en moviment tendeixen a desplaçar-se seguint trajectòries rectes. Les trajectòries lineals es poden modificar tant per la força de la gravetat i la fricció de les molècules d'aire i pels canvis continus de velocitat del medi gasós. Aquestes forces fan que la trajectòria de les partícules es desviï de les

corrents d'aire que les transporta. La tendència d'una partícula a desviar-se de la trajectòria de la corrent de l'aire (és a dir travessar la línia de flux) està quasi bé en funció de la seva mida. Quant més petites són les unitats micròniques tant millor es la tendència a seguir les línies de flux al voltant dels obstacles; quan més gran és la partícula, normalment és més gran la distància de parada necessària per realitzar aquest canvis de velocitat, i més grans són les probabilitats de que impactin o es dipositin en una superfície que serveix d'obstacle. L'efecte selectiu de la mesura de la partícula sobre la deposició s'observa més fàcilment quan les partícules cauen a través de l'aire completament en repòs. En aquestes condicions especials, a l'acceleració de la gravetat només s'oposa la resistència exercida per les molècules d'aire, i les partícules arriben ràpidament a un ritme estable de caiguda, i es mantenen, quan aquestes forces s'equilibren. Per unitats d'aerosol esfèriques de 1 a 100 μm , aquest ritme, o velocitat de deposició final es pot expressar com:

$$V_s = \frac{gr^2 p}{18 r \mu}$$

g : acceleració causada per la gravetat

r = radi de la partícula

p = densitat de la partícula menys densa de l'aire ($1,3 \times 10^{-3} \text{ g/cm}^3$ a 18°C)

A continuació es dona una relació de les mesures mitjanes de les espores d'alguns fongs reconeguts com al·lèrgens.

Espècies	Micres
<i>Alternaria alternata</i>	10 X 40
<i>Aspergillus flavus</i>	3-5
<i>Candida albicans</i>	5 X 8
<i>Cladosporium sp</i>	4 X 8
<i>Fusarium sp</i>	3 X 5
<i>Mucor sp</i>	5 x 10
<i>Monilia sitophila</i>	4 X 10
<i>Penicillium sp</i>	3 X 5
<i>Pullularia pullulans</i>	3 X 5
<i>Rhizopus nigricans</i>	9 X 13
<i>Curvularia geniculata</i>	25 X 65
<i>Microsporium gypseum</i>	12 X 90
<i>Trichophyton sp</i>	2-4

Les estimacions publicades de la densitat per els pòl·lens i algunes espores es troben dintre de $50\% \pm 1$, el que implica que aquesta variable contribueix poc a les diferències en la deposició de superfícies. Les partícules no esfèriques semblen actuar de forma similar, si bé la orientació imprevisible i els efectes de rotació fan que l'anàlisi sigui més difícil,

essent aquest cas el de les espores fúngiques. D'acord amb això, freqüentment resulta útil considerar el radi aerodinàmic equivalent d'una espècie determinada d'aerosol, es a dir, el radi d'una esfera de densitat igual a la unitat amb el comportament de deposició de la partícula en qüestió^{9,118}.

1.4.1.1 RECOL·LECCIÓ DE PARTÍCULES PER MÈTODES GRAVITACIONALS

La confiança tradicional en la recol·lecció gravitacional es va reforçar en 1946 quan es va adoptar un suport cobert per un porta objectes, proposat per Durham, com a dispositiu de mostreig estàndard per la Academy of Allergy¹¹⁹.

Les recol·leccions estàndard amb el dispositiu de mostreig gravitacional de Durham s'utilitzen porta objectes recoberts amb una fina capa de glicerina en la seva superfície superior que s'exposa durant períodes de 24 hores (habitualment). Després de retirar-los els porta objectes s'examinen al microscopi òptic i es fa un recompte de les partícules en el camp de 4,84 cm². Les dades es refereixen com a partícules per centímetre quadrat de superfície del porta objectes. En un dispositiu de mostreig de Durham (o en altres superfícies estables) també es poden exposar plaques de cultiu obertes i realitzar recompte de les colònies de fongs després de 4 a 7 dies. El material recollit per al porta objectes i les plaques obertes reflecteixi la col·lisió de partícules impel·lides per el moviment turbulent de l'aire i per la deposició gravitacional. Per aprofitar completament ambdós processos, és desitjable que existeixi un flux d'aire actiu horitzontal.

Moltes de les limitacions quantitatives del dispositiu de mostreig gravitacional amb porta objectes varen ser apreciades ja per Durham. Malgrat això el baix cost de l'aparell, la seva gran duració i la independència de font d'energia el varen convertir en un

aparell acceptable per fer estudis qualitius i de les tendències estacionals de prevalença dels pòl·lens i espores de gran mesura més abundants. Per aplicacions més precises, el dispositiu de mostreig de Durham presenta deficiències molt limitants, que s'ha comprovat experimentalment.

Les partícules enumerades en porta objectes gravitacionals o plaques de cultiu obertes, reflecteixen les contribucions d'un volum d'aire desconegut. S'ha registrat nombrosos intents per obtenir dades volumètriques sense arribar a una solució.

L'efecte independent de factors com la velocitat de l'aire, la direcció del vent i la turbulència sobre la deposició de les partícules es suficientment intens com per a restar valor a les comparacions de les dades gravitacionals obtinguts en estacions, dies o períodes diürns que manquen de condicions climàtiques comparables. A més a més, els valors dels comptatges de pòl·lens o espores per els sistemes de mostreig gravitacionals es veuen afectats per l'efecte netejador de la pluja donat que al estar exposades 24 hores aquesta pot emportar-se'n les partícules dipositades sobre la superfície del gel, al igual que una elevada humitat al produir-se un efecte de condensació.

La quantitat de partícules recollides per aquest sistemes és relativament petita i tendeix a disminuir a mesura que es consideren unitats més petites com es el cas de les espores. Per tant., per a moltes partícules especialment les més petites i les menys abundants, la poca quantitat recollida dona un gran error en el mostreig¹²⁰.

1.4.1.2 TÈCNIQUES VOLUMÈTRIQUES

Les deficiències dels mètodes més simples han fet que l'atenció en les tècniques per valorar la prevalença de les partícules aerobiològiques es centri en les tècniques volumètriques^{9,118}. A continuació s'exposen els nous mètodes, detallant els mecanismes en els que es basen i els mèrits comparatius dels dispositius fàcilment aplicables a l'estudi dels aeroal·lergens.

1.4.1.3 FILTRES DE MEMBRANA I RECOL·LECCIÓ ISOCINÈTICA

Els filtres moleculars de membrana d'una mesura de pors definits ofereixen un mitjà per relacionar el material obtingut amb volums específics d'aire (aspirat). El mitjà de filtrat es pot aclarir amb oli d'immersió, i les partícules es poden enumerar mitjançant microscopia òptica^{9,118}.

Al igual que tots els dispositius de succió, els filtres de membrana tenen que estar contínuament encarats a la corrent de l'aire, donat que l'eficàcia de la recol·lecció disminueix en gran mesura quan l'orientació del vent es incorrecta. Malgrat això, inclòs quan la presa del dispositiu de mostreig i la corrent de l'aire ambiental estan alineades (és a dir, isodireccional) les diferències entre la velocitat del vent i la velocitat de l'aire que penetra en l'aparell poden afectar a la recol·lecció. Quan les velocitats del corrent de l'aire lliure i de l'orifici coincideixen i l'orientació del vent es completa, es diu que el mostreig es isocinètic. En aquesta condició ideal, difícilment aconseguida, les partícules poden ser recollides amb un 100% d'eficàcia si la retenció per el col·lector es absoluta^{9,118}. Com a norma general, s'obtenen estimacions de prevalença falsament baixes quan la velocitat de l'aire en l'orifici excedeix molt al del corrent lliure. En el cas contrari, amb velocitats

excessives de vent, s'obtenen quantitats falsament elevades de partícules. Els errors resultants de les situacions anisocinètiques es troben implícites en el funcionament de tots els dispositius de mostreig per succió; aquests errors són limitats en les condicions prevalents de vent, i afecten en menor mesura a la recollida de partícules de mesura mitjana (al voltant de 20 μm)¹²¹.

El captador Cour¹²² és un sistema per filtració que consisteix en un eix perpendicular al terra, que sosté, en el seu extrem superior, un eix perpendicular amb la capacitat de girar 360°C. En un extrem d'aquest eix hi ha una penell (que l'orienta sempre segons el vent dominant). En el captador s'exposen dos filtres, un dels quals es retira del captador un cop per setmana i es sotmet a un tractament que combina processos químics amb físics per obtenir un sediment format majoritàriament per pò·l·lens i espores. Hi ha que assenyalar que algunes espores de fongs es trenquen i no poden ser estudiades amb precisió amb aquesta metodologia. Els resultats que s'obtenen a partir d'un captador Cour són concentracions mitges setmanals de pò·l·lens i espores.

1.4.1.4 DISPOSITIUS PER SUCCIÓ

Els dispositius de succió han aconseguit una àmplia popularitat per la monitorització d'espores ambientals. Aquests aparells aspiren aire que transporta partícules a velocitats específiques i el forcen a efectuar ràpids canvis direccionals en canals de flux especialment dissenyats. Les partícules amb un moment suficient no poden respondre bé a aquestes acceleracions angulars, i en conseqüència tendeixen a creuar les línies de flux. Quan

aquesta desviació de la trajectòria de l'aire és extrema, es pot produir la col·lisió de superfície en àrees precises en les que es troben les superfícies de mostreig^{9,118}.

Mitjançant el pas de l'aire a través de tubs d'injecció de calibre progressivament més petits, partícules progressivament menors poden ser impel·lides fins a nivells crítics de moment i recollides en fraccions de mesura específica. Aquest principi s'aplica eficaçment en els impactadors seqüencials i en els dispositius col·leccionadors cribadors d'Andersen útils per a períodes de recol·lecció curts¹²³.

En el mètode de Hirst¹²⁴, les recol·leccions es fan en superfícies recobertes de material adhesiu que es desplaça a una velocitat de 2mm/h més enllà de l'orifici de presa de 2 x 14 mm. L'aire es conduït cap a l'interior de l'aparell a 10 l/min i es produeix una línia contínua de partícules amb diferències de temps en un tambor cobert per una cinta adhesiva, proporcionant un registre de 7 dies. Aquest es el sistema amb el que funcionen els captadors Hirst marca tipus Burkard o Lanzoni^{125,126}.

Els resultats que s'obtenen d'un captador Hirst són concentracions mitges diàries de pòl·lens i espores (pòl·lens/m³ i espores/m³). Per obtenir aquests valors hi ha que realitzar un càlcul matemàtic en el que intervenen com a factors:

- El nº de partícules comptades
- La superfície de mostra analitzada. Per a calcular-la es necessita conèixer el número (n) de línies comptades i la seva longitud (K₂) i amplada (k₃). Amb aquests paràmetres es calcula la proporció analitzada respecte de tota la superfície útil de la preparació microscòpica (K₄).
- El volum d'aire que aspira el captador, normalment 10 l/min, i que a les 24 hores equivalen a 14.4 m³ d'aire (K₅).

La fórmula a aplicar és: concentració mitja setmanal = $K \times N$

- K és una constant que incorpora tots aquells valors fixos quan la metodologia s'aplica seguint sempre la mateixa rutina (K_1 a K_5).

Els registres longitudinals de dipòsit de 24 hores faciliten l'estimació dels nivells mitjans de prevalença durant aquests períodes. En un simple travesser de 48 mm, el volum de l'aire que aporta les partícules es poden calcular com segueix:

$$\frac{\text{Diàmetre del camp microscòpic } (\mu\text{m})}{\text{Amplada total del dipòsit } (\mu\text{m})} \times \text{m}^3 \text{ d'aire en 24 hores}$$

El mètode Burkard recull partícules de més de 5 μm amb una eficàcia que supera el 50% en la majoria de les condicions atmosfèriques. Una coberta horitzontal proporciona una protecció raonable per la pluja que incideix directament, i la resposta al vent es satisfactòria. Altres col·lectors inercials amb orientació fixa de l'orifici de presa són els de Kramer-Collins Spore Trap i el col·lector de fenedura Bourdillon, adequats per aplicacions en aire casi en repòs.

El dispositiu de mostreig multifases d'Andersen (col·lisionador de criba seqüencial) s'ha convertit en un aparell per a recol·leccions volumètriques per a cultiu i ofereix notables avantatges sobre les plaques de cultiu gravitacionals, en especial per a partícules

menors de 5 a 10 μm . El dispositiu de mostreig està format per un sistema de cribes o fases cascuna amb més de 400 orificis, a través dels quals es condueix l'aire a 28.3 l/min. A mesura que es van creuant les fases, les partícules que penetren tenen que passar per orificis progressivament més petits per el que pateixen una acceleració. Si bé aquest aparell està dissenyat per separar partícules viables, són possibles aplicacions més senzilles obtenint recol·leccions integrades amb una precisió acceptable¹²⁷.

1.4.1.5 IMPACTADORS DE BRAÇ ROTATORI

Els cilindres, cintes i filaments estrets intercepten partícules presents en corrents d'aire en moviment amb una altra eficàcia. La probabilitat d'impacte en obstacles com els descrits augmenta amb la velocitat de l'aire i amb la velocitat de caiguda final de les partícules. El mostreig volumètric amb cilindres fixes si es fa un recompte de les partícules adherides i es valora la velocitat de l'aire durant el període de mostreig amb anemòmetre. En la pràctica s'ha demostrat que és més senzill fer rotar una superfície estreta recoberta per material adhesiu a través d'aire a una velocitat elevada constant, es a dir a partir de 1500 r.p.m.^{118,128, 129,130}.

Diversos impactadors de braç rotatori comparteixen aquest principi de funcionament. El més conegut o estès es el sistema Rotorod¹³¹.

La eficàcia de la recol·lecció de partícules per impactadors de braç rotatori reflexa dos variants principals:

- 1) la probabilitat de que una partícula present en la trajectòria de projecció de la superfície de projecció de la superfície en moviment impacti. La eficàcia del impacte augmenta ràpidament amb la mesura de la partícula.
- 2) La tendència relativa a que una partícula impactada a adherir-se.

En resum, actualment ens trobem bàsicament amb 4 sistemes per el mostreig d'espores ambientals:

- 1) per gravetat
- 2) de succió
- 3) de succió modificats
- 4) impactadors de braç rotatori

Darrerament a nivell experimental s'estan desenvolupant mètodes de mostreig aerobiològic basats en tècniques de biologia molecular o en tècniques immunològiques per realitzar estudis ultraestructurals de les fraccions al·lèrgiques.

Malgrat que cap simple aparell recull òptimament una gamma completa de càrrega aèria d'espores i pò·l·lens i molts aeroal·lèrgens poden escapar del recompte, actualment els sistemes de succió, com són els aparells tipus Burkard o Lanzoni amb la metodologia Hirst són, de manera global, els millors captadors per tenir una bona representació de la concentració de pò·l·lens i espores ambientals, malgrat que el seu volum i el seu preu limiten la seva aplicació.

1.4.2 ELABORACIÓ DE DADES AEROBIOLÒGIQUES

L'anàlisi microscòpica de les mostres aerobiològiques dona lloc a una relació quantificada de taxons pol·línics o d'espores, corresponents a les dades d'un dia o d'una setmana, segons s'hagi utilitzat un captador Hirst o Cour respectivament. Aplicant els càlculs adequats a la metodologia del mostreig, aquests resultats s'expressen en unitats de concentració: pòl·lens o espores /m³, unitats molt útils a l'hora de fer-se una idea gràfica de la mesura expressada, el número mig de grans de pol·len o d'espores continguts en un espai cúbic d'un metre de costat, durant el període de temps que dura el mostreig¹³².

Per realitzar comparacions entre les quantitats de pol·len observades i la casuística de pol·linosis detectades, són molt interessants les dades de concentracions mitjanes diàries de pòl·lens ; quan es pretén elaborar gràfics i resums resulta més interessant recórrer a altres períodes de temps, com són la setmana, etc..

Si volen expressar-se concentracions mitges diàries en forma de concentracions mitges setmanals, de 10 dies o d'un altre període de temps , es té que calcular la mitja aritmètica dels set, deu o n valors de concentració mitja diària dels dies que corresponen a la setmana, els de dies o el període de temps escollit¹³².

Per a que els resultats que s'expressen resultin útils als usuaris, es té que indicar molt clarament, no solament en quines unitats s'expressen, sinó també a quin període de temps es refereixen. Si el període de temps es la setmana, el número d'ordre d'aquestes es té que assignar d'acord a la normativa de la Organización Internacional de Normalización, segons la qual la primera setmana de l'any es aquella que conté el primer dijous^{133, 134}.

Els espectres diaris o setmanals són inclosos en les bases de dades i processats adequadament per la generació de resums corresponents a períodes de temps més llargs.

Es freqüent que s'elaborin espectres pol·línics o d'espores anuals, es a dir, relacions ordenades dels diferents tipus de pò·l·lens o espores identificades en una localitat al llarg de tot un any i de les quantitats registrades (suma de les concentracions mitges diàries o setmanals, segons metodologia. Es sol incorporar a l'espectre el valor de la concentració màxima trobada. Aquest espectres són vàlids, no solament per identificar els taxons amb major incidència en la localitat, sinó també per evidenciar la variabilitat interanual¹³².

1.4.3 DADES AEROMÈTRIQUES DELS FONGS A L'ATMOSFERA

Els estudis aerobiològics posen de manifest la presència a l'atmosfera de molt nombroses partícules, entre elles les espores, és a dir, estructures reproductores de fongs, bacteris, molses i criptògams vasculars. Les espores que es troben en quantitats més abundants a l'atmosfera procedeixen de fongs¹³⁵. Per molts múltiples i importants motius és necessari conèixer les característiques qualitatives i quantitatives del contingut d'espores ambientals tant d'exterior o atmosfèriques com d'ambients d'interior, quines èpoques de l'any són més importants per la seva difusió i quins són les factors ambientals que hi contribueixen. Per interpretar el comportament atmosfèric de les espores dels fongs cal conèixer la biologia bàsica dels organismes que les produeixen.

Des del treball realitzat per Canto i Jiménez Díaz al 1945 sobre l'aerobiologia dels fongs en l'atmosfera de Madrid durant un any¹³⁶, a anat creixent l'interès de conèixer les característiques qualitatives i quantitatives del contingut d'espores ambientals a Espanya tant en l'atmosfera com en ambients d'interior.

Si analitzem els darrers estudis observem que el realitzat per Sastre i col·laboradors al 1990 en el que analitzen la presència d'espores fúngiques a Madrid i la seva importància com al·lergens en l'àrea de Madrid ¹³⁷ la freqüència de positivitat variava entre un 8% per *Alternaria alternata* i *Aspergillus fumigatus* i un 3 % per *Cladosporium herbarum*¹³⁷.

A canàries de la Torre i Martin¹³⁸ varen estudiar la concentració d'espores fúngiques atmosfèriques entre 1988 i 1990 obtenint els resultats següents:

Gènere	% 1988	%1989	% 1990
<i>Alternaria</i>	33	30	31
<i>Cladosporium</i>	26	-	29
<i>Aspergillus</i>	19	28	23

Com es pot observar la presència d'*Alternaria* en l'atmosfera de la Laguna es major que la existent en la península i ocupa el primer lloc.

Portillo i col·laboradors varen estudiar la relació entre les condicions meteorològiques i la micoflora atmosfèrica en la ciutat de Saragossa^{139,140} conclouent que les majors concentracions d'*Alternaria Alternata* es donaven en les setmanes 42 a 45 al 1986 i les setmanes 45-52 en l'any 1987, coincidint amb una humitat relativa alta, precipitacions moderades i temperatura freda; *Cladosporium herbarum* apareix a la mateixa concentració entre les setmanes 21 a 27 en l'any 1986 i 13 a 17 en l'any 1987, coincidint amb precipitacions baixes , temperatures suaus i una humitat relativa entorn al 60%.

Subiza i col·laboradors en un estudi sobre l'aerobiologia dels fongs en l'atmosfera de Madrid utilitzant com a captador esporopol·línic un col·lector volumètric Burkard¹⁴¹

conclou que la major incidència de fongs correspon a *Cladosporium*, seguit de basidiospores i *Ustilago*, destacant però que les concentracions de *Cladosporium* a Madrid són molt més baixes que en altres indrets de l'Europa humida; Madrid al igual que la resta de la regió centre peninsular està inclosa dintre de l'àrea climàtica denominada Espanya seca, caracteritzada per un baix índex de pluges i una baixa humitat relativa de l'aire, al contrari que a la zona coneguda com l'Espanya humida o la zona mediterrània. Com ja s'ha dit anteriorment el creixement dels fongs es veu influenciat per la humitat relativa de l'aire; per tant no es d'estranyar que globalment la incidència atmosfèrica de fongs a Madrid sigui inferior respecte a altres ciutats de l'Europa humida com són Londres, Munic, Leiden, Brussel·les. Malgrat aquest fet les concentracions d'*Alternaria* presents en l'atmosfera de Madrid són semblants a les trobades a Londres, observant-se el màxims pics entre els mesos de maig i setembre.

Un altre estudi sobre l'aerobiologia dels fongs atmosfèrics, utilitzant un col·lector volumètric tipus Burkard, realitzat a Espanya, concretament a Badajoz és el realitzat per Gonzalo i col·laboradors durant els anys 1993 i 1994 ¹⁴². En aquest treball es conclou amb la identificació de 27 espècies de fongs diferents, essent la majoria conidis i clamidospores de fongs ascomicets i deuteromicets i la resta ascospores i basidiospores. El tipus de fong que apareix amb més freqüència es *Cladosporium* (entre el 60 i el 70% de les espores observades) seguit de *Ustilago*, *Alternaria*, basidiospores i *Dreschlera*. La concentració mitja entre els mesos de maig i agost va ser entorn de 3000 espores/m³ essent els mesos de maig i juny els de màxima concentració. En aquest estudi les variables meteorològiques s'han relacionat de forma estadísticament significativa amb la presència de determinades

espècies d'espores. A més de la humitat, les precipitacions i la temperatura són paràmetres que es varen associar a l'aparició d'algunes espores fúngiques.

El treball de González Minero i col·laboradors es centra en l'atmosfera de la ciutat de Cádiz, emplaçament amb clima típicament mediterrani¹⁴³. En aquest estudi es demostra que *Cladosporium* torna a ser el fong amb més concentració atmosfèrica essent la setmana 42 la que mostra un màxim pic, establint-se una estacionalitat d'estiu a tardor al igual que passa amb *Alternaria* malgrat que presenta unes concentracions menors tal i com s'observa en els gràfics següents. Belmonte i col·laboradors¹³⁵ realitzen un treball sobre el contingut esporopol·línic en l'atmosfera de Catalunya entre el 1983 i el 1990 utilitzant dos tipus de captadors diferents: Durham modificat (Belmonte 1988) i el Cour, permetent ambdós la conversió dels resultats obtinguts a espores per metre cúbic d'aire. Les dades d'aquest estudi varen estar preses en diverses localitats de Catalunya, amb condicions ambientals diferents: a Lleida i a Girona (aeroport) on l'entorn és rural; a Tarragona i a Barcelona, que són nuclis urbans i a Bellaterra que és una zona urbanitzada situada en medi rural. El reconeixement de les partícules captades es va fer a partir de les seves característiques morfològiques.

La relació d'espores identificades a l'atmosfera de les localitats estudiades va ser la següent:

Aedisospores

Alternaria

Arthrinium

Asterosporium

Basidiospores

Bispora

Chaetomium

Cladosporium

Curvularia

Drechslera

Espores unicel·lulars (inclou *Aspergillus* i *Penicillium*)

Espores bicel·lulars

Espores pluricel·lulars

Epiccocum

Fusarium

Helminthosporium

Humicola

Lesptosphaeria

Nigrsopora

Oidium

Pithomices

Pleospora

Polythrincium

Sphaecelotheca

Sporobolomyces

Stemphylum

Tetraploa

Tilletia

Torula

Urocystis

Ustilago

Xilariàcies

Les conclusions que es realitzen a partir de les dades estudiades foren que la major part de les espores identificades i que es trobaven amb una certa freqüència en l'atmosfera de Catalunya són al·lèrgiques. Moltes d'aquestes espècies eren paràsits de vegetals, i les espores que els hi varen permetre una identificació eren les corresponents a unitats de multiplicació vegetativa.

Si es comparen aquest resultat amb els obtinguts per Calvo i col·laboradors al 1976 a Barcelona¹⁴⁴ s'observa una gran uniformitat en l'espectre obtingut. Els mètodes utilitzats en ambdós estudis són diferents donat que el realitzat per Calvo comporta el cultiu d'espores capturades, la qual cosa permet identificar materials que només morfològicament no es poden identificar.

Aquest estudi de Belmonte també posa de manifest que l'atmosfera dels medis rurals és molt més rica en espores de fongs que la dels medis urbans, i també evidencia que *Cladosporium* és el gènere més abundant arreu, assolint percentatges de representació superiors al 40%. La presència d'*Alternaria* a l'atmosfera es continuada però es significativament més considerable de l'estiu a la tardor, sent els entorns rurals molt més rics en aquest tipus d'espores que la resta. Els pics de concentracions més elevades d'*Alternaria* i *Cladosporium* es produeixen sovint a continuació de precipitacions caigudes.

Aquestes dades estan en consonància amb el descrit per Troutt i Levettin¹⁴⁵ que afirmen que en àrees de clima moderat però amb variacions estacionals la concentració d'espores tendeix a créixer a l'estiu i la tardor. Diversos estudis mostren uns nivells elevats d'espores atmosfèriques des de finals de primavera fins a la tardor¹⁴⁶⁻¹⁵¹.

Hi ha estudis que assenyalen que durant les estacions més seques hi ha un pic d'espores fúngiques com són les de *Cladoporium*, *Alternaria*, *Drechslera*, *Epiccocum*, *Curvularia*, *Botrytis* i *Phitomices* anomenades “espores d'aire sec” que precisen de temperatures moderadament elevades i corrents de vent presents. L'alliberació d'aquestes espores es fa de forma passiva i esta directament relacionada amb factors climàtics^{146, 152,153}.

Malgrat això durant els dies de pluja ens podem trobar amb concentracions elevades d'aquestes espores d'aire sec. Això es justificaria per el fet de que les gotes de pluja impactarien sobre les superfícies o substrats en el que creixen el fongs com poden ser les fulles de plantes o arbre en descomposició de forma que l'impacte de la gota sobre aquesta superfícies faria que el conidi per un mecanisme de vibració alliberés les espores o bé que la pluja desfés la massa mucilaginosa en la que estaria creixent el fong alliberant-se d'aquesta manera les espores que conté¹⁵⁴⁻¹⁵⁷.

En diferents indrets del món s'han anat realitzant estudis sobre l' aerobiologia de les espores fúngiques atmosfèriques destacant els diferents treballs europeus dels darrers 20 anys^{6,7158-170} que són els que ens poden servir de punt de referència donat que els diferents climes que es donen en diferents indrets d'aquest continent tenen una clara influència en les característiques climàtiques de Catalunya. Wilken i Gravensen¹⁷¹ i D'Amato¹⁷² han publicat resultats comparatius dels estudis realitzats per varis autors en 11 ciutats europees.

Degut a les diferències en les tècniques de mostreig i dels mètodes d'identificació, és impossible realitzar comparacions directes entre els resultats d'aquests informes. Malgrat aquest fet, destaca les petites diferències entre les observacions, inclòs quan estan fetes en regions d'Europa distants entre sí. En la taula següent es recullen els 10 tipus d'espores fúngiques atmosfèriques més comuns, amb els números relatius estimats en forma de percentatge i amb estimacions conservadores de les sumes anuals de les concentracions mitges diàries:

Tipus d'espora	Límits de quantitats relatives	Sumes anuals de promig diaris (E/m ³)
<i>Cladosporium</i>	40-80	600.000
Basidiospores	5-30	25.000
Ascospores	5-20	15.000
<i>Aspergillus/Penicillium</i>	2-20	15.000
<i>Botrytis</i>	2-20	12.000
Llevats	2-20	10.000
<i>Alternaria</i>	1-10	7.500
<i>Dydimella</i>	1-10	7.500
<i>Fusarium</i>	1-10	7.500
<i>Ustilago</i>	1-10	7.500

Aquesta taula mostra que les espores de *Cladosporium* són amb avantatge les més abundants en ambients d'exterior. Aquesta afirmació es pot estendre de forma universal.

Les basidiospores i ascospores que comprenen tipus d'espores de molts grups taxonòmics diferents de fongs, són també molt abundants. Entre els tipus menys abundants però també observats amb regularitat i en general en proporcions relatives de menys del 5% es troben: *Aerobasidium*, *chaetomium*, *Curvularia*, *Drechslera*, *entomophthora*, *Erisiphe*, *Ganoderma*, *Leptospheria*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Phoma*, *Pithomyces*, *Pleospora*, *Polythrincium*, *Rhizopus*, *Rhodotorula*, *Scopuloropsis*, *Stemphileium*, *Tilletiopsis*, *Torula*, *Trichoderma*, *Ulocladium*, *Urocystis*.

Les dades sobre les fluctuacions estacionals de la presència de espores de fongs són escasses. Segons els resultats d'aquests diferents estudis europeus que s'han escollit com a referència no hi ha grans diferències en quan a les fluctuacions estacionals entre les diferents regions d'Europa, tret que en les regions del Nord l'estació és més breu que les regions mediterrànies.

En conclusió, pot tornar-se a assenyalar que els nostres coneixements sobre les espores fúngiques atmosfèriques de exterior són encara incompletes.

1.5 HIPERSENSIBILITAT MITJANÇADA PER IG E

El mecanisme immunopatològic de hipersensibilitat tipus I o mitjançat per Ig E segons la classificació de Gell i Coombs¹⁷³ es refereix al perjudici causat per una resposta immunologia desencadenada per les immunoglobulines Ig E, constituint una variant patològica d'un mecanisme immunològic normal. La situació patològica apareix quan l'antigen no és necessàriament un patògen sinó més bé un agent ambiental inofensiu tal com el pol·len, àcars o espores fúngiques. Una resposta enèrgica a aquests agents dona lloc

a una resposta inflamatòria inútil, en la que la gravetat de la reacció pot variar des de una alteració més o menys banal a la mort del individu.

El terme al·lèrgia va ser establert al 1906 per Von Pirquet¹⁷⁴ per descriure una reactivitat alterada causada per una substància estranya.

La presència de anticossos reagínics en el sèrum de individus al·lèrgics va ser descrita per primer vegada per Prausnitz i Küstner en el 1921¹⁷⁵. Aquest autors varen demostrar que la injecció intracutània d'extracte de peix en un individu sensibilitzat originava una reacció papuloeritematosa i que la reactivitat front al al·lèrgè es podia transferir a un individu normal injectant-l'hi el sèrum dels individus sensibilitzats. Aquestes observacions indicaven que els pacients atòpics, terme definit per Coca¹⁷⁶, tenen anticossos que mesuren les reaccions d'hipersensibilitat immediata. Malgrat aquests avenços no es va detectar cap anticòs en el sèrum dels citats individus sensibilitzats. Per això, el principi actiu responsable de la transferència d'hipersensibilitat es va denominar reagina. No va ser fins a la dècada dels '60 gràcies als estudis de Ishizaka¹⁷⁷⁻¹⁸⁰ que es va descobrir que aquesta reagina era un tipus de immunoglobulina que varen anomenar Ig E. A partir d'aquests estudis i dels realitzats per Johanson¹⁸¹ i col·laboradors i Bennich¹⁸² i col·laboradors la Organització Mundial de la Salut va denominar a aquesta nova immunoglobulina Ig E.

El descobriment de la proteïna de mieloma E va permetre establir les propietats fisicoquímiques d'aquesta proteïna. Les Ig E son glicoproteïnes $\gamma 1$ amb un coeficient de sedimentació de 8S i un pes molecular de 190.000 daltons¹⁸³. La proteïna té un alt contingut

en carbohidrats. Les molècules de Ig E estan constituïdes per dos cadenes pesades i dos lleugeres.

Les reaccions d'hipersensibilitat per Ig E comencen quan les molècules del al·lèrgic formen un enllaç creuat amb component de la Ig E adjacents a la superfície dels mastòcits i basòfils, cèl·lules presents en els teixits i en el torrent circulatori respectivament que comparteixen varies característiques importants donat que constitueixen una font important de potents mediadors químics implicats en un ampli espectre de processos inflamatoris i immunològics. A partir d'aquest moment es desencadena una resposta inflamatòria en la que intervenen nombroses cèl·lules i molècules mitjançant mecanismes aferents i eferents que donaran com a resultat una reacció immunopatogènica al·lèrgica¹⁸⁴⁻¹⁸⁶.

Un dels principals mediadors químics de la reacció al·lèrgica es la histamina. La β -imidazoletilamina va ser sintetitzada per primera vegada en el 1907¹⁸⁷ i posteriorment se la va denominar histamina degut a la seva presència en teixits animals. Va ser considerada un mediador humoral de la reacció al·lèrgica a partir dels estudis de Best i col·laboradors¹⁸⁸ en els que es va observar que molts dels símptomes secundaris a la injecció d'antigen en animals sensibilitzats es podien reproduir mitjançant la inoculació d'histamina. No va ser fins els 1953 quan es va localitzar la histamina en els mastòcits de la dermis en pell humana¹⁸⁹.

La histamina es sintetitza en l'aparell de Golgi¹⁹⁰ dels mastòcits i basòfils emmagatzemant-la per a una posterior alliberació espontània fisiològica^{191,192} o bé degut a una reacció fisiopatogènica específica (al·lèrgia) o inespecífica.

La histamina posseeix una àmplia varietat d'activitats biològiques mitjançades per l'activació de receptors cel·lulars de superfície específics. Quan s'injecta per via

intradèrmica, la histamina origina una triple resposta constituïda per eritema local secundari a vasodilatació arteriolar que es prossegueix posteriorment d'un eritema més difús per la estimulació de les terminacions nervioses aferents amielínics que dona lloc a una alliberació de substància P i possiblement altres neuropèptids ; en últim terme apareix un edema local degut a la retracció de les cèl·lules endotelials de les vècules post capilars que cursa amb una exudació de plasma. La major part de la reacció papuloeritematosa és una resposta secundària a la estimulació de receptors H_1 ^{193,194,195}. La importància de la histamina com a mediador vasoactiu en la malaltia al·lèrgica humana es pot constatar per la eficàcia dels antagonistes dels receptors H_1 , per modificar el curs de les malalties associades a reaccions dependents de Ig E.

Malgrat que els mastòcits i els basòfils contenen en l'interior dels seus grànuls molts dels mediadors químics involucrats en la cascada al·lèrgica hi ha moltes altres cèl·lules inflamatòries que hi intervenen com pot ser el cas de eosinòfils, macròfags, plaquetes els quals també posseeixen receptors de baixa afinitat de Ig E. Després de l'activació d'aquests receptors de baixa afinitat es produeix també a partir d'unes senyals mitjançades per interleukines i altres citoquines una secreció dels mediadors que contribueixen a l'activitat proinflamatòria dels mastòcits¹⁹⁶⁻²⁰⁰.

1.5.1 METODES *IN VIVO* PER A L'ESTUDI DE LA HIPERSENSIBILITAT MITJANÇADA PER IG E ESPECÍFICA: PROVES CUTÀNIES

Des de que es coneix que alguns quadres en l'home tal com la rinoconjuntivitis, l'asma i l'anafilàxia apareixen com a conseqüència de l'exposició a substàncies que són inofensives per la majoria dels individus, s'ha convertit en una pràctica habitual establir un diagnòstic mitjançant la reexposició de l'individu a la substància sospitosa. Les proves cutànies constitueixen la principal eina diagnòstica des de la seva introducció per Blackley en 1865²⁰¹, quan va escarificar una zona del seu avantbraç i la va posar en contacte amb pol·len de *Phleum*. En aquesta zona es va desenvolupar una tumefacció pruriginosa envoltada d'eritema que es va seguir d'una reacció cutània tardana. La prova del rascat no es va utilitzar fins 40 anys després per al diagnòstic de la tuberculosi¹⁷⁴ i la varen descriure de nou Smith al 1909²⁰² i Walter al 1917²⁰³ en el diagnòstic de l'al·lèrgia de tipus immediat.

Al mateix temps la prova intracutània proposta per Mantoux en 1908²⁰⁴ va ser adoptada per l'estudi de l'al·lèrgia per Schools²⁰⁵. Alguns anys més tard Lewis²⁰⁶ va descriure la prova de punció (Prick test). Aquests mètodes s'han utilitzat durant dècades sense grans modificacions, si bé han sigut reedificats i s'han proposat una sèrie de dispositius estandarditzats per les proves de punció.

Les proves cutànies poden proporcionar indicis útils per a confirmar que el diagnòstic d'una al·lèrgia específica al que s'ha arribat per la clínica. Les característiques: simplicitat, ràpides de executar, baix cost i alta sensibilitat explica el perquè les proves cutànies ocupen una posició clau en l'al·lèrgia²⁰⁷. Malgrat això, quan es realitzen incorrectament, les proves cutànies poden donar resultats falsos positius o falsos negatius.

La principal limitació de la prova cutània és que una prova positiva no significa necessàriament que el pacient present simptomatologia al·lèrgica sinó que simplement significa que el pacient està sensibilitzat a un determinat al·lèrgic testat podent ser una sensibilització subclínica ²⁰⁸.

1.5.1.1 FISIOPATOLOGIA DE LA RESPOSTA CUTÀNIA

En els darrers anys ha millorat molt la comprensió del mecanisme per el qual els al·lèrgens i els agents inespecífics poden induir reaccions cutànies. Els estudis sobre els mecanismes de les proves cutànies varen començar fa més de 50 anys quan es va descriure la triple resposta de Lewis ²⁰⁶ en el 1924 que constitueix la principal resposta cutània a la estimulació mecànica. Quan es frega lleugerament la pell, apareix una pal·lidesa deguda a la vasoconstricció capil·lar als 15 o 30 segons que augmenta en intensitat després d'aproximadament un minut que desapareix entre els 3 i els 6 minuts. Quan es pressiona amb més força una línia vermella més que blanca, el que reflexa una vasodilatació capil·lar. Una estimulació més forta provoca una erupció per fora de la línia vermella, deguda a una dilatació arteriolar mitjançada per un reflex axònic. Amb un estímul mecànic encara més intens que dona lloc a l'activació dels mastòcits o amb la injecció d'histamina, les amines vasoactives provoquen una vasodilatació immediata (rubor), seguida d'extravassació de plasma a partir dels capil·lars que dona lloc a la pàpula. El tercer component de la triple resposta, la erupció, apareix com a conseqüència d'una resposta neurovascular per un reflex axònic ²⁰⁹, causant vasodilatació de la microvasculatura que desapareix quan els nervis han sigut seccionats, degenerats o anestesiats. La substància P, un neuropèptid, és un dels neurotransmisors implicats en la erupció ^{210, 211}. Alguns

pacients tenen una pell extraordinàriament sensible, en la qual les pàpules poden persistir durant 30 minuts o més: és el que es denomina dermatografisme.

La reacció cutània al·lèrgica mitjançada per Ig E dona lloc a una resposta dèrmica que pot persistir durant hores després de la introducció de l'al·lèrgè. Generalment es caracteritza per una reacció papuloeritematosa immediata que depèn de mediadors i de factors neurogènics que segueix sempre d'una fase tardana passades de 5 a 6 hores, i que apareix com a reacció edematosa mal definida que es resol en unes 24 hores^{212, 213}. El quadre histològic és el de degranulació dels mastòcits^{214,216} seguit d'infiltració progressiva de la dermis per eosinòfils i neutròfils²¹⁷, amb o sense dipòsit de fibrina²¹⁸ donant lloc a un edema inflamatori.

La capacitat de desenvolupar una resposta de Ig E front a al·lèrgens és un requisit previ per al desenvolupament de proves cutànies al·lèrgèniques positives. Hi ha diferents factors que determinen la reactivitat cutània al al·lèrgè de manera que la mesura de la reacció pot relacionar-se amb la quantitat d'al·lèrgè injectat, el grau de sensibilització dels mastòcits cutanis i la reactivitat de la pell als mediadors alliberats per el mastòcit, en especial la histamina²¹⁹⁻²²² entre altres factors.

Les proves cutànies inespecífiques es poden realitzar amb agents vasoactius tals com la histamina, les cinines, la metacolina o els secretagogs dels mastòcits^{219,223-226}. La histamina només indueix una resposta papuloeritematosa, mentre que les cinines o els secretagogs dels mastòcits són capaços d'induir una resposta immediata i una fase tardana.

En l'home la resposta al·lèrgica immediata o tipus I està mitjançada gairebé sempre per IG E específica malgrat que alguns investigadors han suggerit que les immunoglobulines Ig G poden actuar com anticossos que intervenen en la resposta

al·lèrgica immediata al tenir un comportament semblant a la Ig E. Investigadors britànics han demostrat que la reacció cutània mitjançada per Ig G-STS té les característiques clàssiques d'una reacció papuloeritematosa si bé és menys intensa que la induïda per Ig E i tarda uns 5 minuts més en arribar a la resposta màxima²²⁷. A més Pepys i col·laboradors varen observar que algunes reaccions cutànies mitjançades per Ig G-STS només es poden demostrar per proves intradèrmiques²²⁸. Amb els avenços posteriors s'ha observat però que la Ig G-STS posteriorment denominada Ig G4 no té pràcticament rellevància clínica.

1.5.1.2 PROVES CUTÀNIES

Les proves cutànies per a l'estudi d'hipersensibilitat immediata s'utilitzen amb freqüència per demostrar una reacció al·lèrgica de la pell mitjançada per Ig E i constitueix un instrument diagnòstic fonamental en el camp de l'al·lèrgia. Si aquestes proves es realitzen adequadament, aporten evidències útils per a confirmar el diagnòstic d'una al·lèrgia específica. Donat que el seu desenvolupament e interpretació són relativament complexes es recomana que es realitzin per professionals sanitaris entrenats²²⁹.

1.5.1.3 PROVES DE PRICK I PUNCIÓ

Existeixen molts mètodes dissenyats per permetre la penetració d'un extracte aplicat a la superfície cutània. Amb la prova del rascat, l'extracte s'aplica sobre una zona de rascat superficial que penetra la capa còrnia més externa de la pell. Es té que evitar l'hemorràgia ja que en aquesta situació podríem tenir falsos positius. Aquesta prova introdueix una quantitat variable d'antigen a través de l'epidermis i per aquest fet està poc estandarditzada.

La prova de perforació va ser introduïda per Von Pirquet¹⁷⁴. S'erosiona la capa més externa de la pell mitjançant un objecte rom i després es col·loca l'extracte.

La prova de punció (prick) va ser descrita per primera vegada per Lewis i Grant²⁰⁶ i utilitzada de nou per Squire, però la seva difusió va ser a partir de les modificacions realitzades per Pepys en els anys 70²³¹.

La prova del prick modificada es realitza col·locant una petita gota de l'extracte al·lèrgic i solució control (positiu i negatiu) en la cara anterior del avantbraç. Les gotes s'han de posar amb una separació d'uns 2 cm entre sí. Després s'aplica una agulla hipodèrmica a través de la gota i s'insereix en la superfície epidèrmica amb un petit angle amb el bisell mirant a dalt²³². La punta de l'agulla s'eleva llavors suaument per aixecar una petita part d'epidermis sense provocar hemorràgia²³³. Després d'aquesta maniobra retirem l'agulla i s'absorbeix suaument amb una paper o teixit absorbent l'extracte sobrant del avantbraç. Per cada punció es té que utilitzar una llanceta diferent. També es té que evitar el desplaçament de les solucions dels extractes a punts de proves adjacents. Amb aquest mètode s'introdueix aproximadament 3.3×10^{-6} mL de la solució de l'extracte en la epidermis²³⁴. En els darrers 20 anys s'han proposat altres mètodes en la prova del prick. Habitualment estan ideats per a reduir la variabilitat del prick realitzat per diferents investigadors. En aquests mètodes l'instrument de la prova s'aplica perpendicularment a la pell. Els instruments més populars són l'agulla estandarditzada de Morrow Brown²³⁵, l'agulla de precisió de Osterballe (Pricker®)²³⁶; el Stallerpointe®²³⁷ i el Allerprick®²³⁸ ambdós derivats de l'agulla de Morrow Brown i la llanceta de Pharmacia (Phazet®)²³⁹.

L'opinió sobre aquests diferents tipus d'agulles o llancetes varien segons l'experiència, habilitat i preferència del professional sanitari que les utilitzi, si bé amb un investigador entrenat són molt reproduïbles²⁴⁰⁻²⁴³.

1.5.1.4 PROVES INTRADÈRMiques

Aquesta prova va ser descrita per Mantoux²⁰⁴ sent molt utilitzada actualment en la pràctica clínica diària. L'extracte al·lèrgic s'injecta per via intracutània en una quantitat de 0.01 a 0.05 mL. La prova es realitza en la superfície volar del avantbraç, produint-se una petita ampolla superficial d'uns 2 o 3 mm de diàmetre, Si bé el volum injectat influeix sobre la reacció papuloeritematosa final²⁴⁴, la reacció cutània depèn més de la concentració de l'al·lèrgic injectat.

Donat que amb les proves intradèrmiques es pot injectar directament al·lèrgens en la dermis es tenen que extremar les mesures per evitar penetrar al·lèrgic en la zona capil·lar subepidèrmica de la pell. Poden provocar reaccions sistèmiques per el que sempre té que haver un metge pròxim. L'índex de reaccions sistèmiques durant les proves intradèrmiques es baixa, entre el 0.03 i el 0.49% dels pacients^{245, 246}. S'han descrit algunes morts durant la prova cutània intradèrmica²⁴⁷.

1.5.1.5 COMPARACIÓ DE LES PROVES CUTÀNIES

L'Acadèmia Europea d'Al·lèrgologia i Immunologia Clínica (EEACI)²⁴⁸ i el Consell d'Asma i Al·lèrgia i immunologia d'Estats Units^{248,249-252} recomanen proves cutànies de prick com a prova principal per al diagnòstic de les malalties al·lèrgiques mitjançades per Ig E i per a objectius d'investigació.

La prova intradèrmica és el mètode més sensible de prova cutània malgrat que també indueix més reaccions falses positives que la prova del prick, sobre tot per a extractes al·lèrgics rics en histamina o que tenen una activitat alliberadora d'histamina, o si el pH, l'osmolaritat o conservants com el glicerol o el mertiolate sòdic no estan controlats²⁵³. Les proves intradèrmiques són més reproduïbles que les proves de prick^{254,255} essent el coeficient de variabilitat menor que el de la prova prick quan s'estudia la pàpula o l'eritema.

Amb el prick test ens trobem amb una alta correlació entre els símptomes i la provocació cutània, malgrat que en alguns casos es tenen que utilitzar proves intradèrmiques per al diagnòstic de l'al·lèrgia, malgrat que poden donar proves falsament positives per el que es correlaciona amb menor grau amb els símptomes²⁵⁶.

Les proves intradèrmiques són menys segures per que poden produir-se reaccions adverses sistèmiques²⁵⁷ per el que es té que tenir especial atenció en els pacients tractats amb β -blocant ja que poden augmentar el risc de reaccions adverses. Com a regla general, la dosis d'inici de les solucions d'extractes intracutànies en pacients amb una prova de prick negativa anterior té que oscil·lar entre 1.000 i 10 dilucions de l'extracte concentrat utilitzat per al prick²⁴⁹.

No sembla que siguin necessàries les proves intradèrmiques per al diagnòstic de l'al·lèrgia per substàncies inhalades quan existeixen extractes estandaritzats^{229, 250, 251}.

1.5.1.6 GRADUACIÓ DE LES PROVES CUTÀNIES I CRITERI DE POSITIVITAT

Les proves cutànies es tenen que llegir en el moment màxim de la reacció, mesurant en mm la pàpula i l'eritema aproximadament 15 minuts després de realitzar les proves. Les reaccions de fase tardana es poden mesurar malgrat que la seva significació exacta és desconeguda^{248, 249}. S'han proposat alguns sistemes de puntuació que poden utilitzar-se a la pràctica clínica. Un d'aquests sistemes es el que s'utilitza a Estats Units:

0 : reacció negativa

1+ : pàpula 1 mm major que el control negatiu

2+: pàpula 1-3 mm major que el control negatiu

3+: pàpula 3-5 mm major que el control negatiu amb inflamació
acompanyant

4+: pàpula més de 5mm major que el control negatiu amb eritema
acompanyant

En les proves prick quan la zona de control es completament negatiu representen una resposta immunològica positiva^{231, 258}.

Donat que existeix una gran variabilitat entre els pacients en la reactivitat cutània, és necessari incloure controls positius i negatius en les proves cutànies. Les solucions de control negatives són els diluents utilitzats per a conservar les vacunes de l'al·lèrgic. Els pacients amb dermatografisme tindran reaccions de pàpula i eritema amb el control negatiu. El control negatiu detectarà també la reactivitat traumàtica induïda per la llanceta en la prova cutània (amb una pàpula que pot tenir un diàmetre de 3mm amb alguns dispositius) i/o per la tècnica de l'investigador²⁴⁹. Qualsevol reacció en les zones de prova de control negatives dificultarà la interpretació de les zones al·lèrgiques.

Les solucions de control positives s'utilitzen per a:

- Detectar la supressió per medicaments o per malalties
- Detectar als pacients (excepcionals) que no reaccionen a la histamina
- Determinar les variacions en el rendiment tècnic

El control positiu habitual de les proves de prick és el dihidroclorur d'histamina que s'utilitza a una concentració de 5.43 mmol/L (o 2.7 mg/mL que equival a 1 mg/mL de base d'histamina). El diàmetre de la pàpula amb aquesta concentració oscil·la entre 2 i 7 mm. Malgrat això és més adequada una concentració 10 vegades superior²⁶⁰ amb una mesura de la pàpula entre 5 i 8 mm.

Per a la prova intradèrmica la mesura de la pàpula produïda es de 10 a 12 mm. També poden utilitzar-se secretagogs de mastòcits, com fosfat de codeïna al 2.5% o al 9%²³⁷.

1.5.1.7 FACTORS QUE AFECTEN A LES PROVES CUTÀNIES

La reacció cutània depèn d'un cert número de variables que poden alterar el rendiment de les proves cutànies

1. La qualitat de l'extracte al·lèrgic és important. Quan sigui possible es tenen que utilitzar al·lèrgens estandarditzats per mètodes biològics i etiquetats en unitats biològiques^{248, 249}. També poden utilitzar-se amb fiabilitat al·lèrgens recombinants²⁶¹.

2. L'edat afecta a la mesura de les proves cutànies²⁶², però poden trobar-se proves d'inoculació cutània positives en la infància^{263, 264}. Amb major edat, la mesura de la pàpula decreix²⁶⁵.
3. S'han trobat variacions estacionals en relació amb la síntesis d'anticossos Ig E específics en l'al·lèrgia al pol·len²⁶⁶. La sensibilitat de la pell augmenta després de l'estació pol·línica i després descendeix fins a la següent estació. Aquest efecte és d'alguna importància en pacients amb sensibilització baixa²⁶⁷ i/o en pacients sensibilitzats a alguns al·lèrgens com és el cas del xiprés²⁶⁸.
4. Els fàrmacs afecten sempre a les proves cutànies, per el que sempre es necessari preguntar als pacients quins fàrmacs han pres. Alguns fàrmacs com l'astemizol pot deprimir o abolir les respostes a les proves cutànies durant un període de 6 setmanes^{229,269}.

En la taula següent es mostren els principals fàrmacs amb efectes inhibidors sobre proves cutànies

Fàrmacs	Grau	Supressió	
		Duració	Significació clínica
Antihistamínics			
Astemizol	++++	30-60 dies	Sí
Azelastina oral	++++	3-10 dies	Sí
Cetirizina	++++	3-10 dies	Sí
Clorfeniramina	++	1- 3 dies	Sí
Clemastina	+++	1-10 dies	Sí

Ebastina	++++	3-10 dies	Sí
Fexofenadina	++++	3-10 dies	Sí
Hidroxicina	++++	1-10 dies	Sí
Ketotifeno	++++	3-10 dies	Sí
Loratadina	++++	3-10 dies	Sí
Mequitacina	++++	3-10 dies	Sí
Mizolastina	++++	3-10 dies	Sí
Oxatomida	++++	3-10 dies	Sí
Terfenadina	++++	3-10 dies	Sí
Antihistamínics H2	O a +		No
Imipramines	++++	> 10 dies	Sí
Fenotiacines	++	?	Sí
Corticoesteroids			
Oral /IM a curt plaç	0		Poc probable
IM llarg plaç	Possible		Poc probable
Intranasal	0		No
Bronquial	0		No
Cutani tòpic	0		Sí
Teofilina	0 a +		No
Cromones	0		No

Agonistes β_2

Inhalats	0 a +	No
Sistèmics	0 a ++	No
Dopamina	+	No

1.5.1.8 INTERPRETACIÓ DE LES PROVES CUTÀNIES

Si es realitzen de forma acurada utilitzant extractes al·lèrgènics de gran qualitat, les proves cutànies són un mètode senzill, no dolorós i molt eficaç. Per tant, les proves cutànies representen un dels principals instruments per al diagnòstic de l'al·lèrgia per a un metge entrenat.

Podent obtenir-se resultats falsos positius i falsos negatius en les proves cutànies degut a tècniques o materials inadequats. Els resultats falsos positius es poden deure a reaccions irritants o a augment inespecífic degut a una fort reacció propera²⁷⁰.

Els resultats falsos negatius es poden deure a :

1. Extractes amb potència inicial baixa o amb pèrdua de potència posterior²⁵⁶
2. Fàrmacs que alterin la reacció al·lèrgica
3. Malalties que atenuïn la resposta de la pell
4. Descens de la reactivitat de la pell en nens i en ancians
5. Tècnica inadequada (punció dèbil o cap)

L'ús de solucions de control positives pot contrarestar alguns dels resultats falsos negatius perquè les reaccions poden ser menors o inhibir-se en pacients amb pell lleugerament reactiva.

La incidència de respostes positives a les proves cutànies no implica necessàriament que els símptomes del pacient a una al·lèrgia mitjançada per Ig E, donat que les proves del prick són positives en el 15-35% dels individus sense símptomes depenent de l'al·lèrgè i de l'àrea²²⁹. La presència de proves cutànies positives en subjectes asimptomàtics poden preveure el començament dels símptomes al·lèrgics, especialment si la càrrega de l'al·lèrgè és alta^{271,272}. S'han descrit valors de tall òptims per resultats clínicament importants amb les proves de prick amb *Dermatophagoides pteronyssinus*^{273,274}, però es precisen més dades.

1.5.1.9 RELLEVÀNCIA CLÍNICA DE LES PROVES CUTÀNIES

La interpretació adequada dels resultats requereix un coneixement profund de la història, dels símptomes i de les troballes físiques. Una prova cutània positiva sola no confirma la reactivitat clínica clara front a un al·lèrgè.

En quant als al·lèrgens inhalats, les respostes a les proves cutànies representen uns dels millors diagnòstics de primera línia i quan es correlacionen amb la història clínica les proves *in vitro* poden no ser necessàries^{248,249}. A més, s'ha demostrat que en la pràctica general les al·lèrgies respiratòries comuns es poden diagnosticar eficaçment amb l'ajut de criteris diagnòstics simples, utilitzant proves de prick o proves de Ig E específiques en sèrum²⁷⁵.

1.5.2 ESTUDI DE LA HIPERSENSIBILITAT IG E ESPECÍFICA: METODES *IN VITRO*

1.5.2.1 IMMUNOGLOBULINA IG E SÈRICA TOTAL

Cadascun dels mètodes següents s'ha utilitzat per valorar la Ig E en sèrum ²⁷⁶⁻²⁸³.

- 1) Immunodifusió en agar
- 2) Radioimmunodifusió en agarosa
- 3) Radioimmunodifusió de desplaçament competitiu
- 4) Assaig immunoradiomètric de dos fases
- 5) Enzim-immuno-assaig de dos fases

Les tècniques d'immunodifusió no tenen suficient sensibilitat per a detectar la Ig E en sèrums o secrecions normals, per el que aquests mètodes no són adequats per a aplicacions clíniques.

Els mètodes de radioimmunoanàlisi i d'anàlisis immunomètric de dos fases detecten la Ig E en sèrum a concentracions de fins 0.5 U/ml (1.2 ng/ml); en el mercat es poden trobar equips d'anàlisis basats en les tècniques immunomètriques de dos fases. Les anàlisis immunomètriques per a la Ig E es basen en el següent principi analític: els anticossos anti-IgE policlonals o monoclonals acoplats covalentment a una fase sòlida s'incuben amb una quantitat alíquota de sèrum o preparació standard i la Ig E fixada es detecta durant la incubació de la fase sòlida amb anticossos marcats radioactivament anti-Ig E purificats per cromatografia d'afinitat o monoclonals, o amb anticossos anti-Ig E conjugats amb un enzim.

La concentració de Ig E en sèrum es calcula per comparació amb una corba standard. La màxima sensibilitat analítica es troba en el marge de 7.5 a 50 U Ig E/ ml. Les concentracions menors de Ig E es poden valorar per el mètode d'anàlisis immunomètriques, però la fiabilitat del mètode per detectar petits canvis en concentracions de l'ordre de 0.5 a 4 U/mL està molt disminuïda en comparació amb concentracions més altes.

A partir de les diferents tècniques analítiques s'han estudiat les concentracions sèriques de Ig E en nens i adults sans^{276-279, 281,283} han donat resultats amb petites diferències en les diferents franges d'edat; hi ha una tendència constant al augment dels nivells de Ig E amb l'edat i en les distribucions de freqüència dem les concentracions de Ig E observades en adults sans els valors de Ig E augmenten des de el naixement fins (0-1 kU/L) fins l'adolescència i posteriorment decreix lentament i arriba a un màxim als 20-30 anys. En adults els valors superiors de 100-150 kU/L es consideren per sobre del normal.

Les malalties al·lèrgiques i parasitàries i altres múltiples circumstàncies (inclosos els factors racials) augmenten els nivells de Ig E sèrica total. Per aquest fet, la mesura de la Ig E sèrica total és poc predictiva en el cribatge al·lèrgic de la rinitis i no s'utilitza com a instrument diagnòstic²⁸⁴.

1.5.2.2 IMMUNOGLOBULINA IG E SÈRICA ESPECÍFICA

En contrast amb el baix valor predictiu de les mesures de Ig E sèrica total per al diagnòstic de l'al·lèrgia de tipus immediat, la mesura de la Ig E específica de l'al·lèrgic en sèrum es important.

La primera tècnica utilitzada per mesurar amb exactitud la Ig E sèrica específica va ser el RAST (radioal·lèrgosorbent test)²⁸⁵⁻²⁸⁷. És una anàlisi immunomètrica de dos fases. En la primera fase de la anàlisi una mostra del sèrum en la que es van determinar els anticossos Ig E es fa reaccionar amb un immunoabsorbent al·lèrgic de fase sòlida. En la segona fase de la anàlisi s'eliminen mitjançant un rentat els components sèrics que no siguin anticossos i el immunoabsorbent al·lèrgic s'incuba amb anticossos anti-Ig E marcats radioactiva o enzimàticament purificats per cromatografia d'afinitat o monoclonals. Els anticossos Ig E units en la primera fase es detecten per la unió de anticòs anti-Ig E marcat al immunoabsorbent al·lèrgic en la segona fase de la anàlisi.

En la prova d'anticossos Ig E no es determinen les concentracions reals d'anticossos Ig E. Els sèrums de moltes persones al·lèrgiques contenen anticossos a concentracions que superen la capacitat d'unió dels immunoabsorbents al·lèrgics, de forma que el sobrenadant de la incubació de la primera fase conté quantitats residuals de anticossos Ig E²⁸⁷. No obstant per sobre d'un marge limitat de concentracions, la unió del anticòs de la segona fase augmenta en proporció a la concentració d'anticossos Ig E presents en el sèrum. Donat que les proves d'anticossos Ig E es realitzen amb freqüència amb excés de d'anticossos Ig E, la unió del anticòs de la segona fase reflexa no solament les quantitats, sinó també les afinitats dels anticossos presents.

Tal i com va ser originàriament descrita per Wide i col·laboradors²⁸⁵ la prova d'anticossos Ig E utilitzava al·lèrgens acoblats covalentment a esferes de Sephadex. Posteriorment s'han utilitzat una gran varietat de materials de fase sòlida, entre ells partícules de cel·lulosa microcristalines, esferes d'agarosa, discos de paper de filtre i plaques de microtitulació de poliestirè^{288,289}. Per la seva aplicació en proves clíniques un

immunoabsorbent té que tenir tots els components al·lèrgics de l'extracte al·lèrgic en les mateixes proporcions en que es troben en l'extracte original.

Actualment hi ha tècniques noves que utilitzen anticossos anti-IgE marcats radioactivament o enzimàticament²⁹⁰⁻³⁰¹. Els diferents reactius són fonamentals per fer un assaig apropiat³⁰². Altres tecnologies es basen en tires utilitzades com a matriu³⁰³.

Els resultats s'expressen en funció de recomptes radioactius totals (cpm), unitats arbitràries (classe de RAST, PRU/ml) o unitats de Ig E (IU/ml, kU/L).

1.5.2.3 FACTORS QUE AFECTEN A LA MESURA DE LA IG E SÈRICA ESPECÍFICA:

Hi ha molts factors que poden afectar a la mesura de la Ig E. La qualitat dels reactius utilitzats (al·lèrgens, anticossos anti-Ig E) és important.

- Els assaigs d'anticossos Ig E tenen que ser sensibles i específics per fer mesures quantitatives en un interval el més ampli possible³⁰⁴.
- Una fase sòlida de capacitat alta proporciona al·lèrgens en excés, el que maximitza la unió de l'anticòs Ig E³⁰².
- Les preparacions anti-Ig E aplicades tenen que ser específiques de Fcε i preferiblement tenen que ser combinacions d'anticossos monoclonals amb especificitats front a més d'un epítot del fragment Fc i amb característiques de dosis-resposta complementàries³⁰².
- Els calibradors tenen que complir els criteris de la Referència Internacional per a la Preparació de Ig E humana de la OMS 75/502³⁰².

- Igual que amb les proves cutànies, la qualitat dels al·lèrgens té una importància capital i si és possible només es tenen que utilitzar extractes standard. La estandardització dels al·lèrgens combinada amb un disseny adequat dels reactius aporta dades precises i reproductibles per a augmentar l'exactitud i eficàcia de les proves diagnòstiques al·lèrgològiques²⁹³.
- Els diagnòstics *in vitro* de l'al·lèrgia al pol·len poden simplificar-se utilitzant proves de reactivitat creuada.
- Les mesures de les Ig E específiques no s'alteren per els fàrmacs ni per malalties de la pell.

1.5.2.4 SIGNIFICACIÓ DE LA MESURA DE LA IG E SÈRICA ESPECÍFICA

En alguns estudis s'ha demostrat que amb l'ús d'extractes estandarditzats els resultats de la prova de Ig E sèrica específica es correlacionen estretament amb la de les proves cutànies i de provocacions nasals.

Com en les proves cutànies, la presència o manca de Ig E sèrica específica no pressuposa els símptomes i alguns subjectes sense símptomes tenen Ig E sèrica específica.

Malgrat que un títol baix de Ig E sèrica específica pot no tenir una rellevància clínica, el títol de la Ig E sèrica específica, generalment, no es relaciona amb els símptomes. Això es deu a que la gravetat dels símptomes depèn no solament dels anticossos Ig E sinó també de l'alliberació dels mediadors, la resposta dels òrgans diana als mediadors i la hipersensibilitat inespecífica.

Quan s'utilitzen proves d'al·lergens únics, el cost de la mesura de Ig E sèrica específica és alt i solament es pot investigar un llistat determinat d'al·lergens.

La importància clínica d'aquestes proves s'ha estudiat extensament i s'ha demostrat que la seva eficàcia (especificitat i sensibilitat) en el diagnòstic de l'al·lèrgia es a vegades superior al 85%³⁰⁵.

1.6 EXTRACTES AL·LERGÈNICS

El coneixement de la quantitat de qualsevol principi utilitzat en medicina és un requisit de la màxima importància. El benefici d'un diagnòstic depèn de forma directa d'aquest coneixement. La seva importància es tan òbvia que va ser tinguda en compte des de els orígens de la medicina. L'Al·lèrgologia no va ser un excepció des de que Wyman³⁰⁶ va identificar per primera vegada en la història el pol·len com a causant de la febre del fenc. Posteriorment Blackley⁵¹ va realitzar la primera prova cutània utilitzant com a dosis la quantitat total del pol·len obtingut de dos antereres de *Lolium*. El resultat fou una intensa reacció produïda per una quantitat definida de pòl·lens; aquest fet va marcar l'inici del camí del diagnòstic cutani.

Els extractes al·lèrgènics són mescles complexes de biomolècules hidrosolubles, principalment proteïnes, glicoproteïnes i carbohidrats, preparades a partir d'aquelles matèries primes que són l'origen dels al·lergens que desencadenen reaccions d'hipersensibilitat tipus I en els individus sensibles. Dites matèries s'utilitzen en el diagnòstic de les reaccions al·lèrgiques.

1.6.1 ESTANDARDITZACIÓ D'EXTRACTES AL·LERGÈNICS

Estandarditzar significa ajustar un model o patró la seva finalitat es la d'obtenir extractes amb la mateixa composició qualitativa i potències similars, es a dir que no variïn o ho facin en proporció mínima entre diferents lots de fabricació. L'estandardització dels extractes al·lèrgics suposa el coneixement, tant de la seva composició bioquímica, sobre tot de proteïnes, com de la seva potència al·lèrgica o activitat biològica al·lèrgica. Quan s'estudien aquests tipus d'extractes hi ha que tenir en compte que hi haurà proteïnes que es comportaran com al·lèrgens, mentre que altres no presentaran aquesta característica. Degut a la variabilitat proteica, tant qualitativa com quantitativa, que pot obtenir-se al preparar extractes a partir de la mateixa matèria prima en diferents moments de producció una de les etapes fonamentals es la d'obtenir un extracte de referència. Aquest extracte en permetrà comparar en el futur, tant qualitativa com quantitativament, les mostres que es preparen a partir de la mateixa matèria prima garantint una producció homogènia dels extractes de forma que ens assegurem una bona reproductibilitat en el diagnòstic.

1.6.2 CONTROL DELS EXTRACTES AL·LERGÈNICS MITJANÇANT MÈTODES ESPECÍFICS *IN VITRO*

La unitat Noon³⁰⁷ i la PNU³⁰⁸ són les unitats de mètodes inespecífics que no valoraven l'activitat al·lèrgica. Amb el descobriment de la Ig E com anticòs responsable de les patologies al·lèrgiques¹⁷⁸ es va obrir la possibilitat de dissenyar mètodes específics que inclòs en barreges complexes poguessin determinar de forma raonable l'activitat al·lèrgica d'un extracte. Durant els anys seixanta i setanta es va treballar intensament en aquest aspecte, fet que va culminar amb l'elaboració de mètodes d'alliberació d'histamina

de RAST Inhibició^{289, 309-311}. Ambdós mètodes tenen en comú que són específics de l'al·lèrgè, es a dir reconeixien i valoraven les proteïnes amb capacitat per a fixar Ig E específica, sense experimentar interferències insalvables amb altres substàncies de l'extracte no relacionades amb l'al·lèrgia. Aquest fet va representar un gran avenç en la història de l'al·lèrgia donat que per primera vegada es podia distingir un extracte actiu d'un inactiu i tenir una idea de l'activitat de l'extracte. Malgrat aquest fet cap dels dos mètodes permet una quantificació suficientment fiable. La complexitat dels assaigs i la irreproductibilitat d'alguns dels reactius emprats feia que un determinat nombre d'activitat al·lèrgica d'un extracte, obtingut en un laboratori, no es pogués repetir en un altre e inclòs en el mateix laboratori al canviar alguns dels reactius. La incapacitat de reproduir resultats suposa un greu problema quan es tracta d'extractes destinats l'ús clínic. Resulta pràcticament impossible establir de forma permanent quina quantitat d'activitat al·lèrgica valorada per alliberació d'histamina o RAST d'inhibició és idònia per a un diagnòstic *in vivo*. Això fa que mètodes tant valuosos no tinguessin una aplicació més àmplia en l'avaluació primària de l'activitat al·lèrgica d'extractes d'ús clínic. La seva utilització va encaminada a assignar activitat al·lèrgica a extractes nous, però sempre en comparació amb extractes de referència, d'activitat ja establerta per altres mètodes.

1.6.3 AVALUACIÓ DE L'ACTIVITAT D'EXTRACTES AL·LERGÈNICS EN UNITATS D'ACTIVITAT BIOLÒGICA

La incapacitat dels mètodes descrits per a proporcionar sistemes útils en clínica d'estandardització d'extractes al·lèrgics a servit per buscar vies de solució al problema. El resultat d'aquest esforç va ésser l'aparició de tres mètodes diferents que basats en la

reactivitat cutània de pacients al·lèrgics permeten adjudicar quantitats discretes d'activitat biològica (al·lèrgica) als extractes estudiats³¹²⁻³¹⁴. Amb independència de les avantatges e inconvenients de cada mètode els tres coincideixen en la possibilitat de determinar la concentració d'extracte de qualsevol espècie que correspon a la mateixa activitat o potència al·lèrgica. Tenint en compte que els mètodes es basen en la reactivitat cutània, l'aplicació de l'activitat així determinada al diagnòstic *in vivo* és immediata. Les diferències d'aquests mètodes sobre els anteriorment citats són nombrosos tant qualitativa com quantitativament.

1.6.3.1 PREPARACIÓ D'EXTRACTES DE REFERENCIA SEGONS LA METODOLOGIA PROPOSTA PER AaS

Aas i col·laboradors van publicar el primer mètode d'estandardització biològica elaborat de forma sistematitzada. La tècnica triada va ser el Prick test. Els pacients seleccionats (entre 10 i 20) tenien que tenir la història positiva, prick test positiu, RAST classe 2 o més al·lèrgic estudiat i una pàpula amb histamina a 1 mg/mL > 4mm de diàmetre mitjà. D'aquesta mode l'extracte que produeix una pàpula igual a la de la histamina a 1 mg/mL es diu que posseeix un HEP, es a dir una activitat biològica amb la capacitat de produir, per prick una reacció mitja idèntica a la generada per una solució de histamina a 1 mg/mL. A l'extracte dotat de 1 HEP d'activitat al·lèrgica se li assignen 1000 Unitats Biològiques/ml. L'assignació d'unitats permet disposar fàcilment d'extractes de diferents espècies amb idèntica activitat biològica directament aplicable al diagnòstic. D'acord amb la interpretació inicial de Aas³¹⁵, un extracte ajustat a un HEP produïa una reacció igual a la de la histamina en la majoria dels pacients al·lèrgics. Reaccions majors

indiquen sensibilitat superior a la mitja i reaccions més dèbils suposen una sensibilitat baixa.

Aquest mètode va ser sistematitzat i millorat per diferents autors entre els que destaca Dreborg³¹⁶. La sistemàtica exposada per aquest autor està basada en el fet que la concentració d'histamina a 1 mg/ml produeix una reacció mitja de 6-8 mm de diàmetre, equivalent a un àrea de 28-50 mm². L'experiència va demostrar que la histamina a 1 mg/ml només donava lloc a reaccions mitges de l'ordre de 4mm de diàmetre equivalent a 12.5 mm², que resulten molt petites i variables per a ser utilitzades com a referència³¹⁷.

Posteriorment la concentració d'histamina utilitzada com a referència va ser de 10 mg/ml, el que suposa la producció de reaccions mitges 7 mm de diàmetre (38.5 mm²)^{317,318}. D'aquesta manera la variabilitat és menor i la activitat d'un extracte amb un HEP d'histamina (10.000 BU/ml) pot discernir millor entre pacients més sensibles que la mitja i pacients amb una baixa sensibilitat. Aquesta és l'activitat més freqüentment utilitzada com a diagnòstic de prick. Malgrat aquest fet, no sembla la òptima donada la gran variabilitat de la reactivitat cutània en la població de pacients al·lèrgics a un determinat al·lèrgic; pot haver pacients poc sensibles però al·lèrgics que produeixen pàpules de l'ordre de la mínima acceptable com a positiva (7mm² equivalents a 3 mm de diàmetre) donat lloc a falsos negatius. Basats en aquests fets, primer Peterson³¹⁹ i més tard Dreborg³²⁰ van proposar que la concentració d'un extracte al·lèrgic validat tant per pacients poc sensibles com molt reactius, tindria que contenir una activitat entre 50.000 i 100.000 BU/ml. D'aquesta forma podrien diagnosticar-se amb seguretat més del 95% dels pacients sensibles al al·lèrgic objecte de l'estudi. El mètode descrit ha presentat una gran avenç per a

la pràctica de l'al·lèrgia clínica i a contribuït en gran mesura a la troballa de noves fonts al·lèrgiques.

A l'hora de definir l'activitat biològica i per tant la unitat d'activitat els diversos laboratoris productors d'extractes ha comparat l'efecte d'un compost químic de referència (histamina, codeïna, etc.) amb l'ocasionat per l'extracte i és aquí on precisament es creen la varietat de tipus d'unitat ja que tots no han utilitzat el mateix compost químic de referència, ni una mateixa concentració de referència.

En el cas de Bial les UBE/nL (Unidades Biológicas Equivalentes/mL) són les unitats biològiques d'activitat al·lèrgica utilitzades.

En el procés d'estandardització defineixen el valor de 1 SPT (Skin prick test) com la concentració d'extracte que produeix una àrea de pàpula igual a la que produeix la histamina a la concentració de 10 mg/ml. Si a aquesta concentració es multiplica per 1000 obtenim el valor de les UBE/ml. Així quan el SPT d'un extracte es 0.08 mg/ml, l'activitat biològica d'aquests 0.08 mg/ml, per definició serà de 800 UBE/ml.

1.6.3.2 PREPARACIÓ D'EXTRACTES DE REFERÈNCIA SEGONS EL MÈTODE DE BRIGHTON

Al 1979, només un any després de l'aparició de la unitat HEP, Brighton i col·laboradors³¹³ proposaren una nova definició de la unitat d'activitat biològica per a extractes al·lèrgic: un extracte al·lèrgic lliure d'irritants té una activitat de 10 Unitats per mL si quan es fa en 30 pacients, clínicament sensibles a l'extracte en qüestió, produeix una pàpula de 75mm² d'àrea. Aquest mètode no utilitza histamina com a referència. L'avaluació de l'activitat biològica total que expressa la suma de les activitats individuals de

tots els al·lèrgens presents en l'extracte, està basada únicament en la reactivitat cutània dels pacients sensibles. Per tant, resulta de suma importància una correcta selecció que ha de complir les següents condicions: tots els pacients ha de tenir prick test positiu, història clínica suggestiva i Ig E sèrica específica al·lèrgic i la seva reactivitat cutània no ha d'estar alterada per una immunoteràpia anterior o per fàrmacs.

El mètode no precisa pacients molt sensibles sinó que pretén que la mostra triada representi la població i per tant un ampli espectre de sensibilitats.

La correlació entre mesures de pàpula i concentració d'extracte és molt bona, sobre tot entre àrees de pàpula de 20 i 120 mm².

D'acord amb Brighton l'àrea de 75 mm² es la que pertany a una concentració d'extracte adequada per a un diagnòstic de prick; de forma arbitrària els investigadors del grup ALK-Abello S.A. ha assignat una activitat de 100 BU/ml a la concentració d'aquest extracte en lloc dels 10 BU/ml triat per Brighton per el fet de que l'extracte que produeix una pàpula de 75 mm² té una alta activitat al·lèrgica i obligaria a utilitzar molts números fraccionaris per a les dilucions utilitzades en altres diagnòstics com podria ser la intradermorreacció.

1.6.3.3 PREPARACIÓ D'EXTRACTES DE REFERÈNCIA SEGONS EL MÈTODE DESCRIT PER TURKELTAUB

El mètode de valoració d'extractes al·lèrgics acceptat per la FDA (Food and Drug Administration) es també biològic però molt diferent dels esmentats anteriorment^{321,322}. No utilitza prick cutani sense reacció intradèrmica i no determina mesures de pàpules sinó eritemes. Per a raons de seguretat selecciona pacients altament sensibles i en cada pacient

practica la reacció intradèrmica amb quatre dilucions de l'extracte objecte de l'estudi en un factor de 3. La primera dilució es aquella en la que l'eritema es aproximadament igual a la pàpula i les tres següents són les immediates més concentrades. La mesura de l'eritema es determina en mm, per la suma del diàmetre major més el perpendicular al punt mig del major. S'avalua la dilució que proporciona un eritema amb una suma de diàmetres igual a 50 mm a la que es denomina D50.

El concepte de dilució (D) de l'extracte que proporciona una suma de diàmetres igual a 50 es bàsic en aquest sistema i és aplicable a qualsevol extracte que tingui una activitat adequada a les condicions del mateix sistema. Així, extractes molt actius necessiten majors dilucions per a produir una suma de diàmetres igual a 50 i per tant se li assignaran més unitats d'activitat, mentre que extractes poc actius produiran $D+d=50$ amb un número menor de dilucions el que es reflexa en l'assignació de menys unitats d'activitat. En aquest sistema la unitat d'activitat es denomina Unitat d'Al·lèrgia (AU) i la seva assignació a extractes amb diferents activitats al·lèrgiques s'expressa en la taula següent:

D50 mitja	Unitats d'Al·lèrgia
14	100.000
12	10.000
10	1.000

Els extractes més actius necessiten ser diluïts 3-14 vegades per produir un $D+d=50$ mm, el que en terminologia d'aquest mètode es tradueix per un $D+d=14$. Per definició a aquests extractes més potents s'assignen 100.000 AU/ml. La determinació de la D50 mitja en 15 pacients té una variabilitat, calculant-se $2DS=1.06$. Aquest fet obliga a la formació de grups de tal forma que una D50 mitja de 14 inclou el ventall de dilucions de 13 a 15, una D50 12 inclou el ventall de 11 a 13 i així successivament. D'aquesta manera qualsevol extracte actiu es pot incloure dintre d'un grup d'activitat i es pot dotar de Unitats d'Al·lèrgia.

Les diferències entre aquest mètode i els anteriors es obvi, basats en la mesura d'activitat cutània produïda per prick, son òbvies. És més sensible i es postula que té una menor variabilitat entre pacients, però hi ha que tenir en compte que només utilitza pacients altament sensibles el que defineix un mostra més homogènia però no representativa de tots els pacients. Per altra part, la tècnica és més complexa i molt poc utilitzada per el països europeus.

1.6.4 PREPARACIÓ D'EXTRACTES AL·LÈRGÈNICS PER A UTILITZACIÓ CLÍNICA

La creació d'Extractes de Referència o Standard que tinguin activitat biològica coneguda, determinada mitjançant assaigs *in vivo* i expressada en unitats d'activitat biològica es una condició necessària per a qualsevol programa d'estandardització. Una vegada que aquests Extractes de Referència han estat preparats i es pot garantir la seva estabilitat d'emmagatzement, la determinació de l'activitat dels extractes destinats a ús clínic es fa per comparació amb les Referències. Els mètodes de comparació poden ser *in*

vivo o in vitro. Per la seva facilitat d'execució el mètode més utilitzat és el RAST d'inhibició, el qual permet assignar activitat biològica a qualsevol extracte sempre que es disposi d'una Referència de la mateixa espècie^{323,324}.

El mètode *in vivo* per a la determinació de la potència relativa d'un extracte segons la FDA, es basa en el bioassaig de línies paral·leles i a estat àmpliament documentat per Turkeltaub i col·laboradors³²². La possibilitat d'utilitzar bioassaigs de línies paral·leles mesurant activitat cutània per prick test ha estat proposat per Malling essent un mètode perfectament acceptable³²⁵.

1.6.4.1 IDENTIFICACIO DELS AL·LERGENS RESPONSABLES DE LA ACTIVITAT AL·LERGÈNICA EN EXTRACTES ESTANDARITZATS

L'activitat biològica d'un extracte representa la suma de les activitats individuals de cadascun dels al·lergens (en sentit molecular) que componen l'extracte. És per tant, activitat biològica total. L'extracte té que contenir totes les proteïnes al·lergèniques específiques de l'espècie i l'activitat biològica té que representar la suma de les activitats individuals d'aquestes proteïnes. Aquest fet fa imprescindible la utilització de tècniques que proporcionin informació sobre la presència o manca dels al·lergens més importants en qualsevol tipus d'extracte, tant Referències com d'ús clínic.

Existeixen tres tècniques fonamentalment que poden donar aquesta informació i que són: la immunoelectroforesis en presència de sodi dodecilsulfat en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), la immunoelectroforesis creuada (CIE), radio-immunoelectroforesis creuada (CRIE), Isoelectroenfocament immunoblotting (IEF immunoblotting)³²⁶. Cadascuna d'elles té alguna avantatge i algun inconvenient sobre les altres. Totes són complexes i algunes

difícils de reproduir quan s'utilitzen diferents reactius. Per aquesta raó es tant important utilitzar al menys dos per cada extracte. D'aquesta manera s'aconseguirà que l'activitat biològica dels extractes sigui correcta.

1.6.4.2 QUANTIFICACIÓ D'AL·LÈRGÈ MAJORITARI

Cada extracte al·lèrgic està compost per un gran número de proteïnes. Només unes poques són al·lèrgens identificables per tècniques de laboratori. Algun al·lèrgè és absolutament majoritari de tal forma que el 100% dels pacients al·lèrgics a la espècie són sensibles a ell. Altres tenen una rellevància intermèdia (sempre mesurat en termes de prevalença de sensibilització) e inclòs existeixen al·lèrgens als que molt pocs pacients presenten Ig E específica demostrable. Algunes espècies tenen un sol al·lèrgè rellevant, altres dos, tres o més³²⁷⁻³³⁰. En alguns casos els al·lèrgens importants presenten reactivitat creuada entre sí o amb al·lèrgens menys importants de la mateixa espècie. En altres no comparteixen epítops de forma coneguda. Hi ha al·lèrgens molt estables i hi ha al·lèrgens sensibles al calor, les proteases, l'agregació i altres factors³³¹.

Un al·lèrgè és majoritari quan, al menys el 50% dels pacients al·lèrgics al conjunt dels al·lèrgens de la espècie tenen Ig E específica a ell.

Es considera que una proteïna funcional és coneguda quan es coneix la seva activitat i la seva estructura molecular. Un al·lèrgè és una proteïna funcional i precisament la seva funció determina el seu grau d'importància.

Quantificar un al·lèrgic rellevant o majoritari implica una sèrie de passos que es poden resumir en els següents punts:

1. Identificació dels al·lèrgics clínicament rellevants:
2. Purificació dels al·lèrgics clínicament rellevants
3. Demostració de la rellevància clínica del al·lèrgic purificat
4. Obtenció d'anticossos monoclonals
5. Determinació de les concentracions relatives dels al·lèrgics en espècies amb més d'un al·lèrgic rellevant

La identificació dels al·lèrgics que formen part d'un extracte complex consisteix en posar de manifest quines proteïnes, de entre les moltes que componen l'extracte, tenen capacitat per a unir Ig E específica. Depenent de la informació que es vol obtenir s'utilitzen mescules de sèrums humans o sèrums individuals. Les mescules són representatives de la població i per tant ens informen de quins són els al·lèrgics més comuns que afecten a la generalitat dels pacients. Si volem saber quina és la prevalença de la resposta al·lèrgica a un al·lèrgic individual és precís utilitzar sèrums individuals³³².

Les tècniques de purificació d'al·lèrgics són les normals aplicades a purificació de proteïnes. Cada pas de purificació té que anar seguit de l'aplicació d'una sèrie de criteris estructurals i funcionals que ens permetin definir amb claredat fins a quin punt l'al·lèrgic està molecularment pur. Hi ha que estudiar algunes característiques de la proteïna

purificada, com per exemple si es tracta d'un al·lèrgic amb subunitats, si tenen ponts disulfur, si tenen sucres, etc.

Es purifiquen al·lèrgens que d'acord amb la nostra definició són clínicament importants. La primera demostració d'aquest fet s'efectua mitjançant un immunoblotting amb sèrums individuals de pacients al·lèrgics a la espècie en estudi. Aquesta demostració té que ser comprovada i confirmada de forma definitiva utilitzant l'al·lèrgic un cop purificat.

Els anticossos monoclonals front a proteïnes al·lèrgèniques constitueixen els reactius fonamentals per al disseny d'un immunoassaig en fase sòlida per a quantificar al·lèrgens. Des de el 1975 es poden produir cèl·lules denominades hibridomes que són les que produeixen grans quantitats d'un sol anticòs podent dirigir la seva especificitat i afinitat^{333,334}.

Alguns extractes al·lèrgènics tenen una sola proteïna activa que pot ser considerada com clínicament rellevant, altres tenen dos e inclòs existeixen extractes a més. En el primer cas l'al·lèrgic pot representar un alt percentatge de l'activitat total de l'extracte, podent-se considerar, en la pràctica com l'únic responsable de l'al·lèrgia produïda per la espècie, sempre que no s'hagi demostrat que la resta d'al·lèrgens tenen una activitat i prevalença de Ig E importants. En qualsevol cas l'estandardització de l'extracte quedarà ben definida quan s'hagi determinat la quantitat absoluta de l'al·lèrgic majoritari, però a més quan s'hagi identificat la presència dels altres al·lèrgens i definit quina quantitat de l'al·lèrgic majoritari es té que incloure en l'extracte total per a preparar diagnòstics.

1.7 AL·LERGENS D'*ALTERNARIA ALTERNATA*

El nombre total d'al·lergens descrits en *Alternaria alternata* al igual que passa amb altres espècies de fongs es superior als que ens trobem en la majoria dels diferents pòl·lens tal i com es pot observar en la taula següent.

Nom al·lèrgic	Pes molecular (Kd)	Referència
Alt-1	31	335
Alt a 1	28	336
Alt a 29 k	29	337
Alt a 11563	31	338
Alt a 1		339
Alt a 1		340,341
Alt a 2	25	342
Alt a 3		343
Alt a 4	57	343
Alt a 5	45	344
Alt a 6	11	345
Alt a 7	22	345
Alt a 10	53	345
Alt a 12	11	

Aquest fet juntament amb la dificultat d'obtenir unes fonts de cultiu de qualitat per a poder obtenir uns òptims extractes degut a les característiques biològiques dels fongs fa que l'estudi de l'al·lèrgia dels fongs estigui molt dificultada. Les condicions de creixement del fong tindrà molta repercussió sobre la presència o no dels principals al·lèrgens. Els mètodes d'extracció de les proteïnes també és un factor molt important a l'hora de que l'extracte contingui una bona representació de les proteïnes al·lèrgèniques, tal i com o avalen els estudis de Paris i col·laboradors³⁴⁶, Portnoy i col·laboradors³⁴⁷ o Achatz i col·laboradors³⁴⁵.

Una altre punt important a l'hora d'obtenir uns extractes amb una bona representació de les proteïnes i glicoproteïnes al·lèrgèniques és la part que processem dels cultius de fongs. Si tenim en compte que els pacients al·lèrgics als fongs presenten la simptomatologia al·lèrgica quan estan en contacte amb les espores o els conidis a priori cal pensar que es aquesta part del fong que seria més interessant processar per obtenir els diferents al·lèrgens de l'espècie de fong. Hi ha estudis que identifiquen al·lèrgens d'una determinada espècie fúngica específics de les espores que impliquen la necessitat d'utilitzar aquestes com a la font de la que tenim que partir per a obtenir uns correctes extractes³⁴⁸⁻³⁵⁰. Per un altra banda existeixen al·lèrgens que són expressats solament després de la germinació del fong³⁵¹⁻³⁵⁴.

Malgrat aquest fet, els extractes obtinguts a partir de les espores és molt difícil per el que la majoria dels extractes comercials estan obtinguts a partir del miceli i tenen un pobre o nul contingut en espores³⁵⁵. Tot i això, els extractes obtinguts a partir del miceli, produeixen uns reaccions de RAST positius quan són testats amb sèrums de pacients sensibilitzats a fongs^{350, 356-358}. Un estudi de Fadel i col·laboradors mostra que un extracte

d'*Alternaria alternata* obtingut a partir de miceli presenta una potència similar al obtingut a partir de espores basant-se en la resposta del prick test i del RAST inhibició³⁵⁹.

Més enllà de la disquisició entre extractes obtinguts d'espores o els obtinguts del miceli existeixen estudis com els realitzats per Martínez J i col·laboradors^{360, 361} que comparen la potència i sensibilitat de l'extracte entre extractes obtinguts a partir de filtrats de cultiu (o el que és el mateix extracte metabòlic) vers als extractes obtinguts directament del miceli (o el que és el mateix extracte somàtic). Els resultats obtinguts quan es basen en *Alternaria alternata* és que els valors de RAST són considerablement més alts en extractes metabòlics vers a l'extracte somàtic; així mateix els extractes metabòlics són els que contenen més fraccions al·lèrgiques.

1.8 PREVALENÇA DE SENSIBILITZACIÓ A *ALTERNARIA ALTERNATA*

Les malalties al·lèrgiques com la rinitis i l'asma al·lèrgic afecten de mode general a prop d'un 20% de la població general de països industrialitzats dels quals un 10% tenen una patologia greu³⁶²⁻³⁶⁷. Els estudis epidemiològics de sensibilització a fongs segons les proves cutànies apunten que entre un 3% i un 10% de la població general presenta una al·lèrgia per fongs³⁶⁸⁻³⁷⁰. Un estudi epidemiològic en població general realitzat a EEUU³⁶⁹ indica que el 3.6% de la població estava sensibilitzada a *Alternaria alternata*. Un altre estudi poblacional realitzat a Illa de Wight³⁶⁸ mostra que el 0.5% dels nens de 4 anys presenten una sensibilització a *Alternaria Alternata* y un 2.9% a *Cladosporium herbarum*. La prevalença exacta no està ben establerta donat que els estudis que existeixen es mouen en una forquilla entre el 3% i el 91% de sensibilització a fongs, depenent de la població estudiada, dels extractes utilitzats i de les espècies de fongs testades^{102,371-376}. Un exemple

d'aquesta situació es l'estudi realitzat per Aas i col·laboradors³⁷⁷ utilitzant diferents extractes comercials de *Cladosporium herbarum* en el que la prevalença de sensibilització a aquest fong variava entre un 12% i un 65% en la mateixa població. El mateix fet es comprova en l'estudi de Portnoy i col·laboradors³⁷⁸ en el que sobre una mateixa mostra poblacional realitzen prick test per estudiar la prevalença de sensibilització a *Eppicoccum nigrum* variant d'un 6% a un 70% segons l'extracte utilitzat. Aquesta realitat demostra que sense uns extractes estandarditzats no es pot realitzar un estudi de prevalença de sensibilització.

En estudis recents realitzats a partir de població amb rinitis i/o asma al·lèrgic com el realitzat per D'Amato i col·laboradors la prevalença de sensibilització a fongs oscil·la entre el 3% i el 20% segons el àrea estudiada⁷⁵. En pacients simptomàtics residents en els EEUU i en diferents països d'Europa del 25 al 35% estan sensibilitzats a espècies de basidiomicets segons el treball de Lehrer i col·laboradors³⁷⁹, mentre que el 35% dels pacients estudiats a Turquia en l'estudi de Güneser i col·laboradors³⁸⁰ estarien sensibilitzats a algun dels fongs a partir d'una bateria de prick test que englobava 19 espècies diferents.

En un estudi retrospectiu realitzat a Espanya per Resano i col·laboradors estimen una sensibilització a fongs d'un 5% aproximadament⁷⁴, mentre que un estudi prospectiu realitzat a Italia per Mari i col·laboradors³⁸¹ la prevalença de sensibilització es d'un 19%.

Si ens centrem en la sensibilització a *Alternaria alternata* en els darrers treballs epidemiològics realitzats observem que la sensibilització observada en població amb rinitis i/o asma al·lèrgica difereix segons la zona estudiada. Així en un estudi de gran escala realitzat en el centre de grans ciutats de EEUU entre població infantil amb asma al·lèrgic el 38.3% estava sensibilitzada a *Alternaria*³⁸². La sensibilització a *Alternaria* en un estudi

realitzat a gran escala a Canadà mostra que el 25% dels pacients adults amb asma i/o rinitis al·lèrgica reclutats en l'estudi al·lèrgica presenten una sensibilització a *Alternaria*³⁸³. En l'estudi multicèntric anteriorment mencionat de D'Amato i col·laboradors la prevalença de sensibilització a *Alternaria* i *Cladosporium* trobada a Espanya, i més concretament a Múrcia va ser del 20% mentre que la trobada a Portugal va ser d'un 3%, mentre que en els restants països participants la mitja va ser de 7-10%⁷⁵. Corsico i col·laboradors³⁸⁴ realitzen un mapa de sensibilització a *Alternaria* a Itàlia en pacients amb rinitis i/o asma al·lèrgic trobant que un 10.4% de la població estudiada presentava una sensibilització a aquest fong segons prick test trobant diferències importants segons l'àrea estudiada: així la zona de Turin mostrava una sensibilització del 1.8% mentre que a la zona de Cagliari la sensibilització a *Alternaria* ascendia al 29.3%. Un altre estudi que mostra la diferència de prevalença de sensibilització a *Alternaria* segons l'àrea geogràfica estudiada és el realitzat per Peat i col·laboradors³⁸⁵ en el que es centren població infantil amb rinitis i/o asma al·lèrgic comparant una zona costanera d'Austràlia amb un alt índex d'humitat relativa i una zona de l'interior Austràlia més seca trobant que la prevalença de sensibilització oscil·lava entre un 4 i un 23% essent l'àrea d'interior la que presentava un major índex de sensibilització a *Alternaria*. La influència del factor climàtic en la presència d'*Alternaria* i consegüentment en la seva sensibilització queda palesa en el l'estudi de Reijula i col·laboradors a Finlàndia en el que a partir d'una gran mostra poblacional amb rinitis i/o asma al·lèrgic demostren una sensibilització a *Alternaria Alternata* d'un 2.8% i a *Cladosporium herbarum* d'un 2.7 %³⁸⁶.

2. JUSTIFICACIÓ

Existeix una àmplia evidència històrica que relaciona l'al·lèrgia amb els fongs, de forma que els metges hipocràtics ja varen descriure malalties compatibles amb l'al·lèrgia a fongs. A partir de la primera descripció referenciada que implica directament als fongs amb quadres al·lèrgics que data del 1726 segons les observacions de Floyer⁵⁰ són nombrosos els treballs sobre l'al·lèrgia respiratòria per fongs.

Per a desenvolupar una al·lèrgia mitjançada per Ig E el pacient té que estar sotmès prèviament a una exposició al al·lèrgè per a sensibilitzar-se a ell^{177-180,181}, és a dir, crear unes immunoglobulines Ig E específiques mitjançant la diferenciació de limfòcits B en cèl·lules plasmàtiques secretores de Ig E (resposta Th2)³⁸⁷⁻³⁹² en la que intervenen una cascada complexa en la que les citoquines desenvolupen un paper fonamental a partir de les quals es podrà desencadenar la resposta al·lèrgica³⁹³. Les malalties al·lèrgiques poden afectar al nas, pulmons, ulls, pell i/o tracte gastrointestinal, etc. segons quin sigui l'òrgan u òrgans diana a partir d'una resposta sistèmica³⁹⁴⁻³⁹⁶.

D'aquesta premissa es pot concloure que segons la càrrega ambiental d'espores fúngiques la població exposada tindrà més o menys possibilitats de sensibilitzar-se a elles, és a dir crear unes immunoglobulines Ig E específiques. Per tant un punt important en l'estudi d'al·lèrgia als fongs es conèixer la seva exposició.

La càrrega ambiental d'espores fúngiques a les contrades catalanes ha estat poc estudiada de manera que les poques dades de les que disposem ens serveixen de referència per a interpretar el seu comportament aerobiològic.

Si tenim en compte per una banda els avenços tecnològics dels que es disposen actualment per a la captació de les espores fúngiques ambientals, com són els captadors volumètrics esporopol·línics tipus Burkard o Lanzoni mitjançant la metodologia Hirst¹²⁴, i per altra banda la milloria del coneixement científic per a la

identificació de les espores fúngiques que hi ha hagut en els darrers anys encara posa més de manifest la necessitat d'ampliar i actualitzar les dades sobre el comportament aerobiològic de les espores fúngiques a les que estem exposats.

Un altre dels factors que ha dificultat l'estudi d'al·lèrgia a fongs al llarg de la història del coneixement científic és la gran dificultat per a obtenir uns extractes adequats, és a dir, que estiguin estandarditzats biològicament. Aquest fet a estat un dels grans frens per a la realització d'un correcte diagnòstic i tractament dels pacients al·lèrgics als fongs.

Existeixen múltiples estudis arreu del món per a estudiar la prevalença de sensibilització a diverses espècies fúngiques, trobant-se xifres molt dispars. Aquest fet, es pot justificar bàsicament per:

- Les diferents àrees geogràfiques estudiades
- Les diferents mostres poblacionals estudiades
- Els diferents extractes fúngics utilitzats.

Els dos primers punts són suficients per concloure que per a saber de forma real quina és la veritable prevalença de sensibilització d'una determinada població d'una zona geogràfica, t'has de basar en estudis que incloguin aquesta àrea i població determinada. En quant al tercer punt, per a que les dades siguin fiables has de disposar d'uns extractes fiables amb la suficient sensibilitat i especificitat per a valorar la sensibilització. Fins l'actualitat les proves cutànies han mostrat una major sensibilitat per a mesurar la sensibilització front a la determinació de Ig E sèrica específica.

La sensibilització a fongs i més pròpiament a *Alternaria alternata* sembla ser un factor de risc per a desenvolupar asma sobre tot en la població infantil segons el

descriu en diferents estudis epidemiològics^{74-79,84-89}. Aquest fet no s'ha demostrat en cap estudi epidemiològic realitzat a Catalunya.

Fins l'actualitat a Catalunya existeixen poques dades epidemiològiques sobre la sensibilització a *Alternaria alternata*, espècie fúngica causant en l'actualitat de gran part de l'asma i rinoconjuntivitis al·lèrgica per fongs. Si tenim en compte que els estudis realitzats a Catalunya es basen en un nucli poblacional concret no podem extrapolar aquestes dades al que passa en diferents indrets de Catalunya. Tampoc podem comparar els estudis realitzats de forma independent per diferents grups donat que el material i mètodes utilitzats són diferents, per el que no permet fer una comparació vàlida. A més a més, els estudis epidemiològics realitzats no es basen en la utilització d'extractes estandarditzats biològicament amb quantificació del principal al·lèrgic majoritari Alt a 1, per el que les dades trobades poden infradiagnosticar la prevalença de sensibilització. En definitiva, creiem que no existeixen dades representatives en la població de Catalunya de la prevalença de sensibilització a una de les espècies fúngiques amb més representativitat en l'al·lèrgia per fongs com es *Alternaria alternata* al igual que manquen dades sobre la seva càrrega aerobiològica en diferents indrets de la geografia catalana.

Per tant, la finalitat d'aquest estudi és aportar dades objectives i fiables per al coneixement de l'al·lèrgia als fongs mitjançant l'estudi aeromètric d'*Alternaria* en l'atmosfera de Catalunya i la prevalença de sensibilització a *Alternaria alternata* en la població que hi està exposada i que presenta una rinitis i/o asma al·lèrgic.

3. OBJECTIUS

La finalitat d'aquest treball és l'estudi aerobiològic atmosfèric de les espores fúngiques d'*Alternaria* a Catalunya mitjançant els captadors volumètrics amb metodologia Hirst i l'estudi de la prevalença de sensibilització a *Alternaria alternata* en població amb rinitis i/o asma al·lèrgic a Catalunya.

Objectius principals:

1. Obtenció de dades aeromètriques atmosfèriques de les espores d'*Alternaria* a Catalunya mitjançant captadors volumètrics tipus Hirst

Captació de les espores d'*Alternaria* mitjançant captadors volumètrics per succió tipus Burkard o Lanzoni situats a diferents indrets de Catalunya: Bellaterra, Barcelona, Girona, Lleida, i Tarragona .

Identificació de les espores d'*Alternaria* captades mitjançant microscopia òptica.

2. Determinar la prevalença de sensibilització a *Alternaria alternata* en població amb rinitis i/o asma al·lèrgic a Catalunya mitjançant extractes estandarditzats biològicament amb quantificació d'al·lèrgè majoritari d'*Alternaria* Alt a 1

Obtenció d'extracte estandarditzat biològicament amb quantificació d'al·lèrgè majoritari d'*Alternaria alternata*

Determinació de sensibilització a *Alternaria alternata* mitjançant prick test en població amb rinitis i/o asma d'etiologia al·lèrgica a Catalunya.

Objectius secundaris:

1. Determinar l'existència d'associació d'asma al·lèrgic i sensibilització a *Alternaria alternata* en la població estudiada

Mitjançant l'estudi estadístic de les dades epidemiològiques obtingudes a partir de la mostra poblacional utilitzada valorar la sensibilització a *Alternaria alternata* com a factor de risc per a desenvolupar asma.

2. Determinar la prevalença de sensibilització a *Alternaria alternata* en població infantil vers població adolescent i adulta.

Mitjançant l'estudi estadístic de les dades epidemiològiques obtingudes a partir de la mostra poblacional utilitzada valorar la sensibilització a *Alternaria alternata* per dos grups d'edat: població infantil i població adolescent i adulta

3. Determinar la sensibilitat del prick test amb extracte estandarditzat biològicament amb quantificació d'al·lèrgè majoritari d'*Alternaria alternata* Alt a 1 vs. la determinació de Ig E sèrica específica.

Valorar la sensibilització a *Alternaria alternata* a partir dels valors de la papulometria del prick test vs. la determinació de Ig E sèrica específica a *Alternaria alternata* mitjançant enzim-immuno-assaig (Pharmacia CAP System®).

4. MATERIAL I MÈTODES

4.1 MATERIAL

4.1.1 CAPTACIÓ E IDENTIFICACIÓ D'ESPORES D'*ALTERNARIA* ATMOSFÈRIQUES

4.1.1.1 CAPTADOR BURKARD

Dissenyat segons mètode Hirst



Especificacions generals:

Mesura standard de l'orifici 2 x 14 mm.

Voltatges: 230-250 volts 50 Hz; 110-115 volts 60 Hz; 12 volts d.c.

Altura de l'aparell: 94 cm

Flux: 10 l/min

Velocitat del tambor: 1 revolució 7 dies a 2 mm/hora.

Cinta: Melinex
Pes: Net - 16 kg.
Mesures: 57 x 65 x 65 cm

4.1.1.2 CAPTADOR LANZONI

Dissenyat seguint el mètode Hirst



Especificacions generals:

Material: alumini .

Pes: Kg. 12

Dimensions: 76 cm x 37 cm x 65,5 cm

Requeriments elèctrics: 220 v, 50 Hz

4.1.1.3 MICROSCÒPI ÒPTIC

Microscopi OMS-300 amb il·luminació obliqua i coaxial. Tokyo Optical Co, Ltd. Japó

4.1.2 ESTUDI EPIDEMIOLÒGIC DE PREVALENCIA DE SENSIBILITZACIÓ

A *ALTERNARIA ALTERNATA*

4.1.2.1 EXTRACTES AL·LÈRGÈNICS *D'ALTERNARIA ALTERNATA*

Extracte *Alternaria Alternata* A:

- Cultiu de fongs: medi utilitzat: Czapec modificat
- Materials i condicions: Matràs Fernbach de 1800 ml. Volum: 700 ml
 - Temperatura de 25° C i humitat relativa > 45%
 - Temps de cultiu: 21 dies
- Processament dels fongs:
 - Separació mecànica dl mitja de cultiu i miceli
 - Selecció d'extracte brut metabòlic i filtració clarificant
 - Concentració de l'extracte metabòlic mitjançant ultrafiltració tangencial
 - Diàlisis front a aigua purificada (Farmacopea) en tall de 10 kDa
 - Filtració esterilitzant 0.22 micres
 - Dosificació en càmara estèril i liofilització
- Controls:
 - Macroscòpic en creixement: miceli, exudats
 - Microscòpic en creixement :hifes, conidis, espores
 - Humitat relativa (Hydranal-karl Fisher)

Proteïna : Bradford

Sucres (hexoses/ Antrona)

Antigenograma qualitatiu : SDS-PAGE

Antigenograma semiquantitatiu : densitometria sobre gel de SDS-PAGE

Al·lèrgograma qualitatiu : detecció per densitometria de bandes al·lèrgèniques

- Estandardització:

Activitat biològica: conforme a la proposta en “Nordic Guidelines 2th edition”, subrogat en el Real Decreto 288/1991, 8 març

Patró de referència: àrea intuïda per l'al·lèrgè, mitjançant la tècnica del prick test, similar a l'obtinguda amb una solució de histamina clorhidrat /10 mg/ml. 54.3 mmol/L), en 20 pacients específicament sensibilitzats al al·lèrgè en estudi i sobre el que s'assagen tres dilucions de raó 1:10 del mateix.

El valor HEP genera el concepte d'activitat biològica, sobre la base de considerar la seva equivalència en Unitats Biològiques.

Potència al·lèrgènica. Conforme a la proposta en “Nordic Guidelines 2 th edition” subrogat en el Real Decreto 288/1991, 8 març. Patró de referència: valor Ag50 definit com la concentració d'al·lèrgè que indueix un 50% de inhibició del RAST.

Massa Al·lèrgènica: mg d'extracte al·lèrgènic liofilitzat que determina el valor HEP, expressat en unitats biològiques

Al·lèrgens majoritaris: el contingut en al·lèrgè majoritari Alt a 1 està valorat en ELISA segons anticossos monoclonals. (Indoor Bioech. U.K.)

Concentració : 90.800 UBE/mL

- Extractes al·lèrgics liofilitzats per a diagnòstic per a prick-test :

Tipus de vial: Jena Topazi

Liofilitzat: massa al·lèrgica crioprotegida

Conservació del liofilitzat: temperatura ambient

Caducitat: > 2 anys

Recomposició: 1 ml de glicerina i ssfco al 50%

Conservant: fenol 0.03%

Estabilitat del diagnòstic reconstituït: > 1 any

Extracte Alternaria Alternata B:

- Cultiu de fongs: Allergon

- Processament dels fongs:

Separació mecànica del mitja de cultiu i miceli

Selecció d'extracte brut metabòlic i filtració clarificant

Dosificació en càmera estèril i liofilització

- Estandardització:

Activitat biològica: conforme a la proposta de preparació de Extractes de

Referència segons el mètode proposat per Brighton.

Al·lèrgens majoritaris: el contingut en al·lèrgè majoritari Alt a 1 està valorat segons anticossos monoclonals (25 µg/mL).

Concentració : 100 BU/UM

- Extractes al·lèrgics liofilitzats per a diagnòstic per a prick-Test :

Tipus de vial: Jena Topazi

Liofilitzat: massa al·lèrgènica crioprotegida

Conservació del liofilitzat: temperatura ambient

Caducitat: > 2 anys

Recomposició: 1 ml de glicerina i sèrum fisiològic al 50%

Conservant: fenol 0.03%

Estabilitat del diagnòstic reconstituït: > 1 any



Extracte control positiu

Histamina 10 mg/mL

Extracte control negatiu

Sèrum fisiològic 0.9%

4.1.2.2 LLANCETES PER A PROVES CUTÀNIES

ALK lancet

Dispositiu estèril

CE 0543

4.1.2.3 LECTURA DE LA PROVA CUTÀNIA: PRICK-FILM® SYSTEM

Sistema desenvolupat per Immunotek

Format per dos elements autoadhesius cutanis (dispositius d'aplicació i film de lectura) i un programa informàtic específic (prick-Scan 2000)

Dispositiu d'aplicació:

Format per dos làmines unides amb dos sèries d'orificis circulars, superposats i numerats. La distància entre els orificis contigus es de 2.5 cm. A demés el dispositiu d'aplicació té una làmina secant de cel·lulosa prensada amb gran poder absorbent, impermeabilitzada en la seva cara superior amb polietilè.

Film de lectura:

Format per una làmina idèntica a la capa de lectura del dispositiu d'aplicació, coberta amb un film de poliuretà extrafí, transparent i autoadhesiu acrílic de grau mèdic).

Prick- Scan 2000:

Programa desenvolupat específicament per l'ús amb la resta dels components del sistema. Consta de dos aplicacions: config i prick film.

El mòdul config permet el disseny de les bateries d'al·lèrgens a utilitzar i genera les fulles codificades que seran reconegudes per el escàner.

El mòdul prick film executa el programa de lectura, activant l'escàner, processant els resultats i generant un informe imprès.

Requisits del sistema:

PC compatible:

32 MB de memòria RAM o superior

20 MB espai lliure disc dur o superior

Unitat de CD-ROM

Software instal·lat:

Sistema operatiu windows 95 o superior

Escàner:

Escàner compatible TWAIN instal·lat

Impressora:

Impressora color o B/N instal·lada

4.1.2.4 DETERMINACIÓ DE IG E SÈRICA ESPECÍFICA A *ALTERNARIA ALTERNATA*

La determinació de Ig E sèrica específica es realitza mitjançant Pharmacia CAP System™ (Pharmacia & Upjohn diagnostics, Uppsala, Suècia)

4.1.2.5. CARACTERÍSTIQUES DE LA POBLACIÓ DE L'ESTUDI

Població amb rinitis i/o asma al·lèrgic entre 5 i 65 anys d'edat (ambdós incloses) que no hagin rebut immunoteràpia a aeroal·lergens.

4.2 MÈTODES

4.2.1. CAPTACIÓ I IDENTIFICACIÓ D'ESPORES D'*ALTERNARIA* ATMOSFÈRIQUES

El captador Hirst és un mostrejador d'impacte per succió que requereix connexió a la ret elèctrica. Funciona aspirant volums constants i coneguts d'aire que fa impactar contra la superfície receptora. Aquesta superfície receptora és una cinta plàstica de 19 mm d'ample que es disposa al voltant d'una peça cilíndrica anomenada tambor. Per a donar-li la capacitat d'adherir i retenir les partícules, es disposa sobre la cinta una fina pel·lícula d'oli de silicona, utilitzant un pinzell. La disposició del tambor preparat en l'interior del captador és tal que impulsat per un mecanisme de rellotgeria, gira contínuament a raó de 2 mm/hora. Això fa que les partícules impulsades contra la superfície receptora quedin retingudes de forma seqüencial. Un cop a la setmana es substitueix la superfície receptora. La cinta ja esposada es retalla en fragments

corresponents a cada dia de la setmana i cada fragment és dipositat en un portaobjectes tenyit i fixat (preparació microscòpica) i es analitzat al microscopi òptic.

L'anàlisi microscòpic de les mostres procedents d'un captador Hirst es fa sobre el material tal com s'obté, es a dir amb les partícules biòtiques (cèl·lules) mantenint el seu contingut cel·lular i dipositades junt a altres partícules atmosfèriques, minerals i orgàniques.

Els resultats que s'obtenen en un captador Hirst (dades brutes) són convertits a concentracions mitjanes diàries d'espores mitjançant un simple càlcul matemàtic en el que intervenen com a factors.

- el nº de partícules comptades
- la superfície de modera analitzada. Per a calcular-la es necessita conèixer el número (l) de línies comptades i la seva longitud (K1) i amplada (K2) (ambdós depenen del microscopi i de l'objectiu ocular que s'utilitzi en la lectura) . Amb aquests paràmetres es calcula la la proporció analitzada respecte de tota la superfície útil de la preparació microscòpica (K3).
- El volum d'aire que aspira el captador, normalment 10 l/minut, que després d'un dia equival a 14.4 m³ d'aire (K4).

Molts dels paràmetres es mantenen constants (mentre no es canviï de microscopi o d'objectiu ocular i es segueixi una rutina de recompte) de manera que és habitual tenir-los establerts per a que l'operació de conversió de les dades brutes diàries a concentracions Sitges diàries quedi reduïda a una simple multiplicació entre una constant i el número de partícules detectades.

La fórmula a aplicar en el cas de la metodologia Hirst és:

$$\text{Concentració mitja setmanal} = K \times N$$

K= constant que incorpora tots aquells valors fixes quan la metodologia s'aplica seguint sempre la mateixa rutina (1, K1 a K4).

A demés d'estandarditzar el captador que s'utilitza hi ha que estandarditzar també la metodologia del recompte. Consisteix en comptar les espores presents en quatre línies longitudinals, repartides homogèniament en l'ample de la preparació microscòpica corresponent a un dia.

Els 6 captadors utilitzats en l'estudi per realitzar el comptatge d'espores d'*Alternaria* atmosfèriques en diferents indrets de Catalunya entre l'1 de gener de 2002 i 31 de desembre de 2002 tenen els següents emplaçaments:

-Girona

Coordinades geogràfiques: latitud 41° 54' N, longitud 02° 46' E

Altitud: 125 m sobre el nivell del mar, 15 m sobre el nivell del sòl

Captador: tipus Hirst (Lanzoni)

-Bellaterra

Coordinades geogràfiques: latitud 41° 34' N, longitud 02° 06' E

Altitud: 245 m sobre el nivell del mar; 30 m sobre el sòl

Captador: tipus Hirst (Burkard spore-trap)

-Barcelona

Coordinades geogràfiques: latitud 41° 24' N, longitud 02° 09' E

Altitud: 90 m sobre el nivell del mar; 25 m sobre el sòl

Captador: tipus Hirst (Lanzoni)

-Tarragona

Coordinades geogràfiques: latitud 41° 07' N, longitud 01° 15' E

Altitud: 48 m sobre el nivell del mar, 30 m sobre el nivell del sòl

Captador: tipus Hirst (Lanzoni)

-Lleida

Coordinades geogràfiques: latitud 41° 37' N, longitud 00° 38' E

Altitud: 202 m sobre el nivell del mar, 25 m sobre el nivell del sòl

Captador: tipus Hirst (Lanzoni)

4.2.2 ESTUDI DE PREVALENÇA DE SENSIBILITZACIÓ A *ALTERNARIA ALTERNATA* EN POBLACIÓ AMB RINITIS I/O ASMA AL·LÈRGIC

4.2.2.1 INCLUSIÓ DE LA POBLACIÓ DE L'ESTUDI

Pacients entre 5 i 65 anys d'edat (ambdós inclosos) que acudeixen a consulta d'al·lergologia sense haver rebut immunoteràpia a aeroal·lèrgens prèviament amb clínica suggestiva de rinitis i/o asma al·lèrgic.

Inclusió aleatòria: 7 pacients consecutius al mes durant 12 mesos (1 gener 2002 al 31 de desembre 2002) que acudeixin en primera visita i que compleixin els criteris de inclusió a partir del primer dilluns de cada mes.

A tots els pacients es realitzarà història clínica detallada amb la que segons criteris clínics classificarem als pacients en rinítics i/o asmàtics en la que sospitem etiologia al·lèrgica.

- Centres participants:

1. Província de Barcelona:

Barcelona: Al·lergocentre, Clínica Plató, Clínica Teknon, Hospital Universitari Vall D'Hebró Institut Universitari Dexeus.

Badalona: Hospital Universitari Germans Tries i Pujol

Hospitalet de Llobregat: Ciutat Sanitària Universitària de Bellvitge

Manresa: Fundació Althaia

Sabadell: Consorci Sanitari Parc Taulí

Terrassa: Consorci hospitalari de Terrassa

2. Província de Girona:

Girona: Hospital Universitari Dr. Josep Trueta

3. Província de Lleida:

Lleida: Hospital Santa Maria de Lleida

4. Província de Tarragona:

Tarragona: Hospital Universitari Joan XXIII, Hospital Sant Pau i Santa Tecla.

4.2.2.2 REALITZACIÓ DE LES PROVES CUTÀNIES (PRICK TEST)

4.2.2.2.1 BATERIA D'EXTRACTES D'AEROAL·LERGENS COMUNS

D'ÀREA:

A tots els pacients reclutats en l'estudi es realitza proves cutànies (prick test) en la cara volar del avantbraç mitjançant metodologia de Pepys modificada a bateria d'aeroal·lergens comuns d'àrea mitjançant extractes estandarditzats de: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatofagoides farinae*, *Cladosporium*, pol·len de gramínies, *Parietària*, plantatge, *Chenopodium*, *Olea*, *Platanus*, xiprés i epiteli de gat i

gos. Es consideraran positives aquelles proves amb un diàmetre de pàpula > 3mm en referència al control negatiu.

4.2.2.2.2 EXTRACTES D'ALTERNARIA ALTERNATA A I B

A tots els pacients reclutats en l'estudi es realitzen proves cutànies (prick test) amb extracte A *Alternaria alternata* i extracte B *Alternaria alternata* en la cara volar del avantbraç mitjançant metodologia de Pepys modificada utilitzant les llancetes ALK CE 0543

4.2.2.2.3 EXTRACTES DE CONTROL POSITIU I NEGATIU

A tots els pacients reclutats en l'estudi es realitzaran proves cutànies (prick test) amb els extractes de control positiu i control negatiu utilitzant les llancetes ALK CE 0543.

4.2.2.2.4 CRITERIS D'EXCLUSIÓ

- Presència d'algun procés patològic o malaltia intercurrent que a judici de l'investigador pugui interferir en la resposta cutània per a un estat d'anèrgia cutània o hiperèrgia.
- Haver realitzat els següents tractaments en el període de temps detallat respecte a la realització de les proves cutànies:
 - Antihistamínics H1
 - Astemizol 30 dies abans
 - Cetirizina, levocetirizina 7 dies abans
 - Loratadina, Desloratadina 7 dies abans
 - Clorfeniramina 5 dies abans
 - Hidroxicina 7 dies abans
 - Mizolastina 7 dies abans

- Ebastina 7 dies abans
- Fexofenadina 7 dies abans
- Mequitacina 7 dies abans
- Ketotifeno 7 dies abans

Imipraminas 15 dies abans

4.2.2.2.5 LECTURA DE LES PROVES CUTÀNIES

La lectura de la prova cutània dels extractes d'*Alternaria alternata* A i B i del control negatiu i positiu es fa als 15 minuts de la realització del prick test .

Per registrar el resultat es dibuixa sobre el film el perímetre de la pàpula mitjançant tinta negra de secat ràpid. S'ha d'ajustar la llum per a una visió òptima de la pàpula a través del film. S'ha de fer un traçat amb la tinta negra acabant de tancar el contorn dibuixat.

Un cop s'ha retirat de la pell, el film es té que adherir immediatament a la fulla codificada. Procurar emmarcar bé l'espai reservat, estirat i alineat amb els costats dels rectangles. Una mala alineació pot impedir la seva lectura donant un error de procés en el programa.

El full codificat amb el film adherit es col·loca en l'escàner en la seva posició de lectura. Obrir l'aplicació Prick Film amb el que s'activarà i donarà lloc al processament de les dades adquirides que seran presentades en la pantalla.

Com a criteri de sensibilització es consideren positives aquelles proves cutànies amb una pàpula $> 7 \text{ mm}^2$ al àrea de la pàpula del control negatiu.

També es classificaran les pàpules en graus (-, 1+, 2+, 3+,4+). EL càlcul es realitza sobre el percentatge de reactivitat respecte a la histamina (10 mg/ml), aplicant la següent fórmula:

$$\% \text{ al·lèrgè} = \frac{\text{àrea al·lèrgè} - \text{àrea control negatiu}}{\text{àrea control positiu} - \text{àrea control negatiu}} \times 100$$

Per a aquest estudi s'ha establert els valors consensuats per la EAACI³²⁵

- (-) < 25% de l'àrea de la histamina
- 1+ :25-50% de l'àrea de la histamina
- 2+: 50-100% de l'àrea de la histamina
- 3+: (100-200%) de l'àrea de la histamina
- 4 + > 200% de l'àrea de la histamina

4.2.2.2.6 DETERMINACIÓ DE IG E SÈRICA ESPECÍFICA

La titulació de Ig E sèrica específica es realitza mitjançant Pharmacia CAP System® el qual consisteix en un mètode d'enzim-immuno-assaig per a detectar Ig Específica vers a un al·lèrgè. Els valors de Ig E sèrica específica s'especifiquen en kU/L.

El sistema està dissenyat per un immunoassaig en sandwich en el que reaccionen els al·lèrgens d' *Alternaria* que estan en la fase sòlida amb la Ig E específica del sèrum. Aquesta Ig E específica es detecta mitjançant un marcador enzimàtic anti-Ig E que es detecta per un sistema computeritzat.

L'al·lèrgè en estudi està contingut en un sistema capsular format per un polímer hidrofílic de CNBr activat derivat de cel·lulosa, constituint l'ImmunoCAP.

Per a marcar la Ig E específica que es fixa en l'al·lèrgè de l'immunoCAP s'utilitza anticossos policlonals i monoclonals anti Ig E marcats amb I125 o β -galactosidasa els quals generen fluorescència.

La calibració es realitza mitjançant la normativa de la WHO 75/502.

4.2.2.2.7 ESTUDI ESTADÍSTIC

La reactivitat dels dos extractes s'avalua comparant les àrees de les pàpules mitjançant anàlisis de la variança per a mostres repetides (ANOVA).

Les proves cutànies (prick test) positives i negatives obtingudes a partir dels dos extractes s'analitzen estadísticament mitjançant el test de McNemar.

L'àrea del prick test als extractes d'*Alternaria alternata* i els valors de Ig E específica a *Alternaria alternata* en el mateix pacient s'analitzen mitjançant un test de correlació lineal.