



Estandarización de la potencia biológica de extractos alérgicos de *Dermatophagoides pteronyssinus* para inmunoterapia

Cristina Moctezuma-Trejo, Martín Becerril-Ángeles

RESUMEN

Introducción: la rinitis alérgica y el asma son las enfermedades alérgicas con mayor prevalencia. *Dermatophagoides pteronyssinus* es una de las causas de enfermedades alérgicas con mayor relevancia clínica.

Objetivos: estandarizar la potencia biológica en Unidades Alérgicas Bioequivalentes (BAU) de extractos alérgicos de *Dermatophagoides pteronyssinus* de tres laboratorios mexicanos.

Material y métodos: estudio experimental, prospectivo, transversal, cuantitativo desarrollado en pacientes alérgicos a *Dermatophagoides pt.* De acuerdo al protocolo de la FDA, se aplicaron extractos de *Dermatophagoides pt.* de tres laboratorios mexicanos, por vía intradérmica, en diluciones al triple, a partir de la dilución 15, en orden decreciente, hasta obtener un eritema con $\Sigma \geq 50$ mm. Se midió la concentración de proteínas de los extractos de cada fabricante. El análisis estadístico se hizo mediante regresión logística, análisis de varianza de una vía y la prueba de Bonferroni.

Resultados: se incluyeron 20 pacientes adultos, 11 mujeres y 9 hombres, con edades entre 16 y 45 años. Cuatro pacientes tenían rinitis más asma alérgica y 16 sólo tenían rinitis alérgica. No se presentaron reacciones anafilácticas sistémicas. Los coeficientes de correlación de la regresión lineal de la dosis/respuesta fueron para Allerstand $r = 0.55$, Allergomex $r = 0.54$ y Allerquim $r = 0.57$ ($p = 0.001$). Las diluciones calculadas correspondientes a 100 000 BAU/mL para cada extracto fueron: Allerstand 1:26195, Allergomex 1:26341 y Allerquim 1:73993. La concentración de proteínas (mcg/mL) fue: Allergomex 63, Allerquim 65 y Allerstand 154.

Conclusiones: se estableció la potencia biológica de cada extracto probado. Encontramos diferencias significativas en la equivalencia biológica entre los extractos de los tres laboratorios. La prueba mostró un perfil de seguridad adecuado.

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

ABSTRACT

Background: Allergic rhinitis and asthma are the more frequent allergic diseases. *Dermatophagoides pteronyssinus* is one of the more clinically relevant causes of allergic diseases.

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

Material and methods: This experimental, prospective, transversal, quantitative study included patients allergic to house dust mites. According to the FDA protocol, allergenic extracts of *Dermatophagoides pteronyssinus* from three Mexican manufacturers, were injected intradermally in threefold dilutions, until get an midpoint orthogonal diameters 50 mm erythema sum. Statistical analysis was done using logistic regression, one-way analysis of variance and Bonferroni test.

Results: We included 20 adult patients, 11 women and 9 men, aged between 16 and 45 years. Four patients had allergic asthma and rhinitis and 16 only had allergic rhinitis. There were no systemic anaphylactic reactions. Correlation coefficients of linear regression of the dose/response were to Allerstand $r = 0.55$, Allergomex $r = 0.54$ and Allerquim $r = 0.57$ ($p = 0.001$). Dilutions calculated for 100,000 BAU/ml for each extract were Allerstand 1:26295, Allergomex 1:26341 and Allerquim 1:73993. The protein concentration (mcg/mL) was: Allergomex: 63, Allerquim 65, Allerstand 154.

Conclusions: It was established the biological potency for each tested extract. We have found significant differences in the biological equivalence among the extracts from the three manufacturers. The procedure showed an adequate safety profile.

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

Los extractos alérgicos son mezclas heterogéneas de composición variable, formados por productos biológicos solubles como proteínas alérgicas y no alérgicas.

La inmunoterapia específica con alérgenos, es el único tratamiento específico, que modifica el curso de las enfermedades alérgicas, que afectan a 30% de la población de países industrializados.¹ Sin embargo, la inmunoterapia puede causar reacciones adversas y fallas en la eficacia y efectividad, que se han relacionado a la baja calidad de los extractos alérgicos. Esta situación se está modificando con técnicas de biología molecular, que permiten clonar proteínas muy alérgicas para crear extractos recombinantes de alta calidad, que reducen los efectos adversos, al seleccionar solo las proteínas de importancia biológica y mejorar la eficacia y efectividad del tratamiento.²⁻⁴

Entre los alérgenos de mayor relevancia clínica, se encuentra el ácaro del polvo *Dermatophagoides pteronyssinus*,^{2,3,5-8} del cual se conocen las principales proteínas involucradas en la etiología de enfermedades alérgicas. El alérgeno mayor de esta especie de ácaro, Der p 1, es una cisteín-proteasa y fue el primer alérgeno clonado.^{9,10} Cerca de 80% de las personas con alergia a los ácaros del polvo casero poseen IgE contra los alérgenos de ácaros del grupo 1 y más del 90% contra los del grupo 2.^{8,11-14}

Los extractos alérgicos han sido utilizados para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades alérgicas,

basados en la reacción de hipersensibilidad de tipo I desde 1911.¹⁵⁻¹⁸ Sin embargo, los extractos de uso clínico cotidiano, cuyas etiquetas de los fabricantes describen el mismo contenido, tienen cantidades diferentes de constituyentes alérgicos y no alérgicos, y difieren también en su concentración protéica y potencia biológica, como resultado de diferentes procesos de manufactura. La variabilidad en la composición alérgica de los extractos utilizados en el diagnóstico y tratamiento impide a los médicos tratantes, tener confiabilidad y certeza diagnóstica, y genera incertidumbre acerca de la seguridad y eficacia de la inmunoterapia. Los recursos técnicos y científicos actuales, mediante el proceso de estandarización, permiten conocer la concentración protéica y la potencia biológica de los extractos alérgicos, para disponer de productos seguros, de alta calidad y eficaces en la práctica clínica.¹⁹⁻²³

Los métodos inmunoquímicos, usados para el control de lotes de extractos alérgicos, se basan en la unión *in vitro* de IgE a moléculas de alérgenos, sin embargo, no determinan la capacidad de los alérgenos de inducir una reacción alérgica *in vivo*, es decir, la potencia biológica. La potencia biológica de los extractos alérgicos se establece mediante un procedimiento protocolizado con pacientes alérgicos.²²⁻²⁴

El Centro para la Evaluación e Investigación de Biológicos (CBER), de la FDA en Estados Unidos, desarrolló un método de estandarización de alérgenos basado en la potencia biológica de los extractos, con pruebas cutáneas intradérmicas cuantitativas, que expresa los resultados en Unidades Alérgicas Bioequivalentes (BAU). La dilución del alérgeno aplicado en forma intradérmica para determinadas BAU, que produce 50 mm en sus diámetros transversos sumados de eritema (ID₅₀ EAL). Es el procedimiento vigente de referencia de los extractos alérgicos en EEUU.²⁵⁻²⁷

El objetivo del estudio fue estandarizar la potencia biológica en Unidades Alérgicas Bioequivalentes (BAU) de extractos alérgicos de *Dermatophagoides pteronyssinus* de tres laboratorios mexicanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio observacional, prospectivo, transversal, cuantitativo, analítico y descriptivo se desarrolló en el

Servicio de Alergia e Inmunología Clínica, Hospital de Especialidades Dr. Antonio Fraga Mouret, Unidad Médica de Alta Especialidad, Centro Médico La Raza, Instituto Mexicano del Seguro Social, México DF.

Correspondencia: Dr. Martín Becerril-Ángeles. Alondra 42, colonia El Rosedal, CP 04330, México, DF. Correo electrónico: mbecer5@gmail.com

Los autores se declaran sin conflictos de intereses para este artículo.

Recibido: 15 de agosto de 2013.

Aceptado: 10 de septiembre de 2013.

Este artículo debe citarse como: Moctezuma-Trejo C, Becerril-Ángeles M. Estandarización de la potencia biológica de extractos alérgicos de *Dermatophagoides pteronyssinus* para inmunoterapia. Revista Alergia México 2013;60:93-99.

www.nietoeditores.com.mx

Servicio de Alergia e Inmunología Clínica, del Centro Médico Nacional “La Raza” del IMSS, entre Noviembre de 2012 y Febrero de 2013. El protocolo fue aprobado por el Comité Local de Ética e Investigación, con el número R-2013-3501-31.

Población de estudio. Se identificaron pacientes con diagnóstico de asma y/o rinitis alérgica, con pruebas cutáneas por punción (prick) positivas con *Dermatophagoides pteronyssinus*. Se entrevistó a los candidatos, y se les explicaron los objetivos y características del estudio, se solicitó y se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes participantes. Se reunió un número de veinte pacientes para realizar el estudio. Los pacientes seleccionados no habían sido tratados con inmunoterapia y evitaron usar antihistamínicos siete días antes del estudio.

Extractos alérgicos. Se utilizaron extractos alérgicos en dilución peso/volumen 1:100, de los laboratorios Allergomex (México. Lote: 08200 0503), Allerquim (México. Lote: AD 020-12) y Allerstand (México. Lote: 205-001).

Pruebas cutáneas. Previa asepsia y antisepsia de la piel de un brazo, se dibujó con marcador el número de la dilución del extracto, y una letra que identificó a cada laboratorio (M, Q, ó S: Allergomex, Allerquim ó Allerstand). Se inyectó en la dermis del brazo 0.05 mL del alérgeno a diluciones al triple, a partir de la dilución 15 en orden decreciente, con el bisel de la aguja hacia arriba, para producir una induración de 3 mm de diámetro.

Para el control positivo se aplicó histamina (0.01 mcg/mL) por vía intradérmica. El control negativo fue con la aplicación intradérmica de solución diluyente de Evans.

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

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

Cuantificación de proteínas. Se midió la concentración de proteínas de cada extracto alérgico en su presentación de 1:100 peso/volumen, mediante la técnica de Bradford.²⁸

Análisis estadístico

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

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

Para obtener la dilución que produce una suma de diámetros de 50 mm, se hicieron los siguientes cálculos: a) Se generó un gráfico de diámetros mínimos, promedio y máximos para cada una de las diluciones de los diferentes extractos, y b) Se obtuvo el promedio de dilución con el que se obtiene la suma de los diámetros.

RESULTADOS

Se incluyeron 20 pacientes adultos con edades entre 16 y 45 años (media 28 años), 11 mujeres y 9 hombres. Todos los pacientes tenían resultados positivos recientes de pruebas cutáneas con *Dermatophagoides pt*. Cuatro pacientes tenían rinitis con asma alérgica y 16 pacientes sólo tenían rinitis alérgica.

Durante la aplicación de las pruebas no se presentaron reacciones adversas. Todos los pacientes manifestaron prurito local, que remitió unos minutos después de aplicar las pruebas. Se observó respuesta a la histamina en todos los pacientes. En la Tabla 1 se presenta el promedio de la dilución con que se alcanzó la sumatoria mayor y menor esperada de los diámetros de eritema.

La Tabla 2 muestra el coeficiente de correlación entre las diluciones del extracto alérgico y el eritema que provoca la suma de diámetros de 50 mm. La cual fue $\Sigma E=50$ mm: para Allerstand $r=0.55$, para Allergomex fue $r=0.54$ y para Allerquim $r=0.57$ (0.001). La respuesta biológica atribuible a los pacientes fue para Allerstand: 0.45, para Allergomex: 0.46 y para Allerquim: 0.43. Se observó una relación inversamente proporcional entre las diluciones de los extractos y los diámetros del eritema (Figura 1). La mediana de $\Sigma E=50$ mm fue significativamente menor con el extracto de Allergomex. La potencia biológica equivalente a 100 000 BAU/mL con el laboratorio Allerstand fue con la

Tabla 1. Valores de los diámetros del eritema y el promedio de dilución con que se alcanza la suma de 50 mm de los diámetros

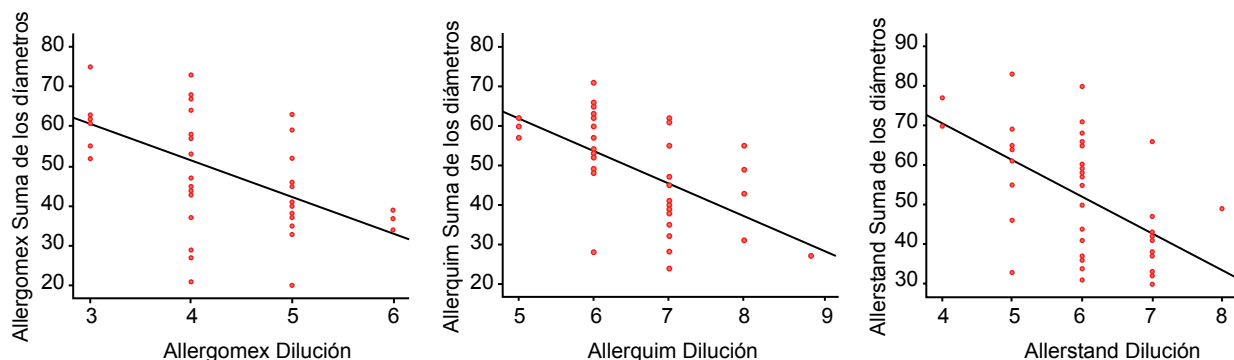
Laboratorios	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Desv. típ.	Promedio de Dilución*
Allergomex Diámetro Mayor	29.975	30	11	64	10.15	4.3 ± 0.85
Allergomex Diámetro menor	21.7	22	10	35	6.47	
Allergomex Suma de los diámetros	48.825	46.5	20	75	14.68	
Allerquim Diámetro Mayor	28.05	28	14	40	7.73	6.6 ± 0.87
Allerquim Diámetro menor	20.625	22	10	33	5.74	
Allerquim Suma de los diámetros	48.675	50.5	24	71	12.51	
Allerstand Diámetro Mayor	30.25	29.5	18	48	9.15	6.1 ± 0.9
Allerstand Diámetro menor	21.325	20	10	40	7.05	
Allerstand Suma de los diámetros	51.575	49.5	30	83	15.33	
Histamina Diámetro Mayor	52.75	50.5	40	75	9.63	
Histamina Diámetro menor	37.85	35	27	100	15.45	
Histamina Suma de los diámetros	90.35	87	70	140	15.67	

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

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

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

*Smm/B±Error típ. B


Figura 1. Correlación de la suma de los diámetros del eritema y la dilución del alérgeno por laboratorio.

dilución logarítmica con base 3 = 5.39, correspondiente a una dilución p/v de: 26 195; con Allergomex fue con la dilución logarítmica con base 3 = 5.42, correspondiente

a una dilución p/v de: 26 341 y con Allerquim fue con la dilución logarítmica con base 3 = 6.09, correspondiente a una dilución p/v de: 73 993.

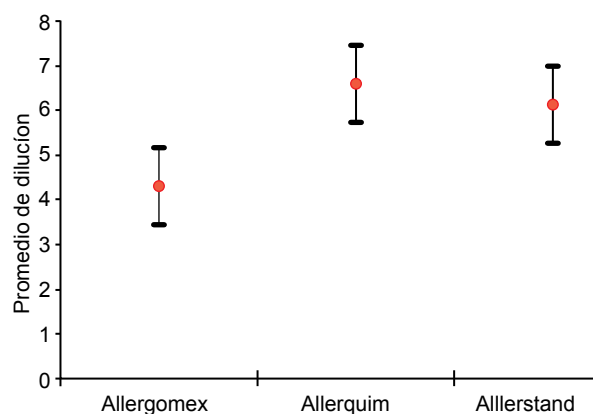


Figura 2. Prueba de ANOVA y análisis de Bonferroni que muestra las diferencias de las diluciones de los extractos que producen 50 mm de eritema.

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

Encontramos diferencias significativas en el promedio de dilución entre los extractos Allergomex vs. Allerquim ($p < 0.001$), entre Allergomex vs. Allerstand ($p < 0.001$) y entre Allerquim vs. Allerstand ($p = 0.018$). Figura 2.

La concentración de proteínas (mcg/mL) para los extractos alérgicos de los laboratorios fueron: Allergomex: 63, Allerquim 65 y Allerstand 154.

DISCUSIÓN

La eficacia de la inmunoterapia depende en gran parte en el uso de extractos alérgicos de buena calidad, estandarizados bajo las normas respectivas, y elaborados según las buenas prácticas de fabricación.

La meta de la estandarización de los extractos alérgicos, es determinar su potencia biológica para tener un uso seguro y eficaz en la práctica clínica alérgológica.²⁻⁴ Es necesario que en la estandarización, los fabricantes produzcan extractos alérgicos homogéneos, de acuerdo a un estándar de referencia interno. La estandarización implica el uso de métodos *in vivo* o *in vitro* que den un margen adecuado de seguridad/eficacia.²⁹ Una ventaja de conocer la potencia biológica de un extracto, es que puede servir como referencia para estandarizar

otros lotes del mismo alérgeno, así como extractos de otros laboratorios.³⁰

La estandarización biológica, tiene la finalidad de establecer las unidades de potencia, en nuestro caso 100,000 BAU, que puede ser referencia de la actividad alérgica de otros extractos.³⁰ Mediante este método, los extractos etiquetados con las mismas BAU, se espera que produzcan respuestas alérgicas similares en pacientes con una sensibilidad cutánea parecida, y que puedan utilizarse de forma intercambiable y segura en la práctica clínica. Al tratarse de un método *in vivo*, la estandarización biológica se aproxima más a una respuesta real, y ayuda al clínico a prevenir reacciones anafilácticas al saber el comportamiento biológico del alérgeno.²⁻⁴

En la estandarización de alérgenos también se utilizan métodos *in vitro* como isoelectroenfoque, electroforesis SDS-PAGE, inmunoblotting de IgE y radioinmuno-electroforesis cruzada (CRIE), que se aproximan a la concentración de alérgenos del extracto, y la respuesta del individuo se mide de manera indirecta.³¹ La precisión de estos métodos depende de la disponibilidad de un suero humano adecuado, de la composición del “pool” de sueros y del extracto alérgico utilizado como estándar de referencia, lo que agrega complejidad al estudio.^{24-27,29-34} Sin embargo, el método de elección dependerá de los recursos disponibles.

Una de las limitantes de cualquier bioensayo, reside en la variación de la sensibilidad de cada persona incluida en el estudio, es decir, la respuesta atribuible al individuo, que se debe considerar al comparar la potencia alérgica total de las vacunas. Para disminuir la variabilidad, las pruebas se deben aplicar en pacientes con sensibilización conocida.^{24-27,29-34} En el análisis de este estudio, se observó que la respuesta atribuible al paciente tuvo una variación del 43 al 45%, pero fue mayor la respuesta atribuible al extracto (57%), lo que indica que el procedimiento fue adecuado. El tamaño promedio del eritema registrado fue diferente para cada uno de los extractos probados, lo cual se relaciona a un efecto biológico diferente.

Encontramos una correlación dosis/respuesta de $r \geq 0.5$ para los tres extractos probados, que difiere del > 0.85 reportado con extractos de pólenes por otros autores.³⁰ El eritema producido al inyectar las diferentes diluciones de los tres extractos probados tuvo un

comportamiento muy parecido, que sólo se pudo diferenciar durante su análisis. No se conocen reportes de estandarización de alérgenos de manufactura mexicana, y es posible que nuevos estudios muestren resultados diferentes. Elegimos el método de estandarización de la FDA,³⁵ que se basa en el diámetro del eritema, para obtener resultados confiables por el amplio rango de diluciones, lo cual permite determinar de forma precisa la unidad de potencia estandarizada de los extractos probados, como sucedió en nuestro estudio.

No obstante que aplicamos los extractos por vía intradérmica, el método $\Sigma E=50$ mm que utilizamos fue seguro. Los pacientes sólo presentaron prurito local.

El contenido de proteínas de los extractos alérgénicos producidos en México se ha relacionado a la intensidad de las pruebas cutáneas,³⁶ pero en nuestro caso, aún cuando hubo diferencia en la concentración de proteínas, los resultados de las pruebas cutáneas fueron muy parecidos.

En el futuro, es probable que los alérgenos recombinantes proporcionen estándares primarios para el análisis de alérgenos que no necesiten de un protocolo de estandarización, y una base para el desarrollo de nuevos productos para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas, que por el momento no están disponibles.³²⁻³⁴

La posibilidad de contar con productos nacionales estandarizados, sin duda tendrá un impacto positivo en la mejora de la eficacia y seguridad en el tratamiento de enfermedades alérgicas. De manera ideal, solo deberían utilizarse productos estandarizados para ofrecer una práctica clínica confiable. Por lo tanto, es importante conocer los métodos de estandarización, para el uso óptimo de extractos alérgénicos en la atención de pacientes alérgicos.

CONCLUSIONES

Se determinó la potencia biológica en BAU de cada uno de los tres extractos alérgénicos de *Dermatophagoides pteronyssinus* probados. Observamos una diferencia significativa en la potencia biológica entre los extractos. El contenido de proteínas de los extractos es diferente. El método de estandarización mostró un margen de seguridad adecuado y puede reproducirse para otros alérgenos de relevancia clínica.

REFERENCIAS

1. Cox Et Al. Allergen Immunotherapy: A Practice Parameter Third Update. J Allergy Clin Immunol 2010;127:S1-S55
2. Van Ree R. Indoor allergens: relevance of major allergen measurements and standardization. J Allergy Clin Immunol 2007;119:270-7.
3. Grier TJ, Hazelhurst DM, Duncan EA, West TK, Esch RE. Major allergen measurements: sources of variability, validation, quality assurance, and utility for laboratories, manufacturers, and clinics. Allergy Asthma Proc 2002;23:125-31.
4. Burazer L, Milovanovic K, Milovanovic M, Vuckovic O, Velickovic TC, Gavrovic-Jankulovic M. Impact of *Dermatophagoides pteronyssinus* mite body raw material on house dust mite allergy diagnosis in a Serbian population. Med Vet Entomol 2011;25:77-83
5. Jeong KY, Kim C, Yong TS. Enzymatic activities of allergen extracts from three species of dust mites and cockroaches commonly found in Korean home. Korean J Parasitol 2010;48:151-5.
6. Gough L, Sewell HF, Shakib F. The proteolytic activity of the major dust mite allergen Der p 1 enhances the IgE antibody response to a bystander antigen. Clin Exp Allergy 2001;31:1594-8.
7. Jacquet A. The Role of the House Dust Mite-Induced Innate Immunity in Development of Allergic Response. Int Arch Allergy Immunol 2010;155:95-105.
8. Smith WA, Hales BJ, Jarnicki AG, Thomas WR. Allergens of wild house dust mites: environmental Der p 1 and Der p 2 sequence polymorphisms. J Allergy Clin Immunol 2001;107:985-92.
9. Chapman MD, Wünschmann S, Pomés A. Proteases as Th2 adjuvants. Curr Allergy Asthma Rep 2007;7:363-7.
10. Smith PK, Harper JI. Serine proteases, their inhibitors and allergy. Allergy 2006;61:1441-7.
11. Park JW, Kim KS, Jin HS, Kim CW, Kang DB, Choi SY, et al. Der p 2 isoallergens have different allergenicity, and quantification with 2-site ELISA using monoclonal antibodies is influenced by the isoallergens. Clin Exp Allergy 2002;32:1042-7.
12. Piboonpocanun S, Malainual N, Jirapongsananuruk O, Vichayanond P, Thomas WR. Genetic polymorphisms of major house dust mite allergens. Clin Exp Allergy 2006;36:510-6.
13. Weghofer M, Thomas WR, Kronqvist M, Mari A, Purohit A, Pauli G, et al. Variability of IgE reactivity profiles among European allergic patients. Eur J Clin Invest 2008;38:959-65.
14. Hewitt CR, Brown AP, Hart BJ, Pritchard DI. A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: innate protection by antiproteases. J Exp Med 1995;182:1537-44.
15. Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. Lancet 1911;1:1572-3.
16. Freeman J, Noon L. Further observation on the treatment of hay fever by hypodermic inoculation of pollen vaccine. Lancet 1911;2:814-7.
17. Jeong KY, Hong CS, Yong TS. Recombinant allergens for diagnosis and immunotherapy of allergic disorders, with emphasis on cockroach allergy. Curr Protein Pept Sci 2006;7:57-71.

18. Ferreira F, Briza P, Inführ D, Schmidt G, Wallner M, Wopfner N, et al. Modified recombinant allergens for safer immunotherapy. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2006;5:5-14.
19. Himly et al. Standardization of allergen products: 1. Detailed characterization of GMP-produce recombinant Bet v 1.0101 as biological reference preparation. *Allergy* 2009;64:1038-1045
20. Grier TJ. Laboratory methods for allergen extract analysis and quality control. *Clin Rev Allergy Immunol* 2001;21:111-40
21. Van Ree R, Dorpema JW, Vieths S. Allergy vaccines: a need for standardization in mass units of major allergen. *Pharmeuropa Bio Sep* 2005(1):27-30.
22. Brunetto B, Tinghino R, Braschi MC, Antonicelli L, Pini C, Iacovacci P. Characterization and comparison of commercially available mite extracts for in vivo diagnosis. *Allergy* 2010;65:184-90.
23. Larsen JN, Dreborg S. Standardization of allergen extracts. *Methods Mol Med* 2008;138:133-45.
24. Kyoung Yong Jeong, et al. Optimization of Allergen Standardization *Yonsei Med J* 2011; 52:393-400.
25. Dreborg, S. Precision of biological standardization of allergenic preparations. *Allergy*, 1992;47:291-294.
26. Canonica et al. Recommendations for Standardization of Clinical Trials with Allergen Specific Immunotherapy for Respiratory Allergy. A Statement Of A World Allergy Organization (WAO) taskforce. *Allergy* 2007;62:317-324
27. Chapman Et Al. The European Union CREATE Project: A model for international standardization of allergy diagnostics and vaccines. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122:882-889
28. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54
29. Allergen products (Producta allergenica). *European Pharmacopeia* 1997;1063-8
30. S.Dreborg Et Al. Results of biological standardization with standardized allergen preparations. *Allergy* 1987;42 : 109-11
31. Maasch HJ, Wihl JA, Schultze-Werninghaus G, Geissler W, Wahl R. A manufacturer's criteria for in-house reference preparations for RAST inhibition. *Ann Allergy* 1987;59:29-33.
32. Kraft D, Sehon A. *Molecular Biology and Immunology of Allergens*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1992.
33. Bousquet J. Clinical use of recombinant allergens and epitopes. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt. Sera Impfstoffe Frankf A M* 1994;87:257-62.
34. Mohapatra SS. Recombinant allergens and allergen standardization. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:921-2.
35. The use of standardized allergen extracts. Position Statement. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (AAAAI). *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:583-6.
36. Dominguez-Calderon F, Becerril-Angeles M, Castillo-Vallejo F. Comparative study of allergens produced in Mexico. *Ann Allergy* 1991;66:106