



Alergenos fúngicos: importancia de la estandarización de extractos de hongos y su aplicación en la práctica clínica

Héctor Ruiz Reyes,* Alain R. Rodríguez Orozco**

RESUMEN

Entre los aeroalergenos asociados con la rinitis alérgica y el asma, los hongos son una causa común de problemas relativos al diagnóstico y la terapéutica. La amplia variedad y distribución de especies fúngicas y su caracterización con respecto a su contribución para la respuesta alérgica resultan bastante complejas. Los extractos fúngicos utilizados para diagnosticar y tratar la sensibilidad de los hongos no son, con frecuencia, tan efectivos, y la estandarización de extractos fúngicos comerciales termina siendo extremadamente importante como procedimiento de diagnóstico y para decidir la administración de una inmunoterapia eficaz e inocua. Esta revisión hace mención de los pasos metodológicos más importantes para lograr la estandarización de los extractos fúngicos y finalmente comenta el uso clínico de estos extractos.

Palabras clave: hongos alergénicos, estandarización, vacunas, extractos fúngicos, inmunoterapia, asma, rinitis alérgica.

ABSTRACT

Among the aeroallergens associated to asthma and allergic rhinitis, the fungi are a common cause of diagnostic and therapeutic problems. The wide variety and distribution of fungal species and the complex characterization of their allergenicity, is a complex item. The fungus extracts used to diagnose and treat sensitizations are frequently non effective, and different varieties of extracts are globally distributed. The standardization of commercial fungi extracts results extremely important as diagnostic procedure as well as to decide an efficacious and safe immunotherapy. This paper reviews important methodological steps to the standardization of fungi extracts, and finally the clinical use of these extracts.

Key words: allergic fungi, standardization, vaccines, fungal extracts, immunotherapy, asthma, allergic rhinitis.

La inhalación sistémica de esporas y fragmentos de micelio de hongos puede inducir una afección alérgica respiratoria, tanto en las vías aéreas superiores como en las inferiores, en personas atópicas. Los componentes alergénicos de hongos contienen moléculas, como glucoproteínas, proteínas y polisacáridos, que pueden desencadenar reacciones de hipersensibilidad tipo I, mediada por la IgE.¹

El rol de algunos hongos como el factor etiológico del asma ha cobrado especial importancia en los últimos años; como en el caso de *Alternaria*, capaz de producir un alto número de reacciones asmáticas tardías en las pruebas de provocación específicas. La inhalación de esporas de *Alternaria* se ha asociado con el desencadenamiento de crisis asmáticas graves en algunos niños y adultos jóvenes, y constituye, incluso, un factor de riesgo de muerte por asma durante los meses de otoño.^{2,3} Entre los principales epítopes fúngicos de *Alternaria alternata* que causan alguna enfermedad alérgica conocidos hasta ahora se encuentran Alt a 1 (glucoproteína ácida de 28/30 kDa), el alérgeno prioritario a valorar en la inmunoterapia, que es reconocido por los anticuerpos de la IgE del 80 al 90% de los pacientes alérgicos a *Alternaria alternata* a partir de estudios de radioinmuno-electroforesis, de los cuales 86% tuvo reacción cutánea positiva;⁴ Alt a 2 (aldehído deshidrogenasa, proteína de 25 kDa), que reacciona con los anticuerpos de la IgE en 60% de los pacientes alérgicos a

* Alumno de la maestría en ciencias en farmacología básica. Laboratorio de inmunología.

** Doctor en ciencias. Profesor investigador. Laboratorio de inmunología. División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas Dr. Ignacio Chávez, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Correspondencia: Dr. Alain R. Rodríguez. Retorno del Colegio Militar 145, colonia Chapultepec Sur, CP 58260, Morelia, Michoacán.

Recibido: enero, 2006. Aceptado: marzo, 2006.

La versión completa de este artículo también está disponible en internet: www.revistasmedicas.com.mx

Alternaria,⁵ y otros epítopes, como Alt a 6 (proteína P2 ribosomal ácida de 11 kDa), Alt a 7 (proteína YCP4 de 22 kDa) y Alt a 10 (aldehído deshidrogenasa de 53 kDa), que reaccionan con el suero de menos de 8% de los pacientes alérgicos a *Alternaria*.⁶

Cladosporium herbarum es un hongo ampliamente distribuido en el ambiente, cuyas esporas son fuente inductora de reacciones alérgicas. La composición antigénica de este hongo se ha estudiado detenidamente, y se ha observado que su aislamiento es muy variable. De este hongo se conocen más de 60 extractos antigénicos, entre cuyos epítopes más importantes se hallan el Cla h 1 (antígeno 32), el Cla h 2 (enolasa o antígeno 54), el Cla h 3 (aldehído deshidrogenasa), el Cla h 4 (P2 ribosómica), el Cla h 5, el Cla h 6 (enolasa) y el Cla h 12.⁷ Por último, entre los hongos más estudiados está *Aspergillus fumigatus*, que puede inducir enfermedades alérgicas; algunos de sus epítopes alérgicos descritos son el Asp f 1 (mitogilina) y del Asp f 2 hasta el Asp f 18 y el Asp f 22 (enolasa). La alveolitis alérgica (pulmón del granjero), el asma o la rinitis alérgica pueden comenzar a evolucionar después de haber sufrido una exposición al *Aspergillus*.⁸

Uno de los problemas más grandes que existen para el estudio de la alergia a los hongos es la estandarización de los extractos antigénicos. Los extractos fúngicos son muy variables en cuanto a potencia y contenido alérgico, esta variación puede proceder del tipo de cepa utilizada o de los diferentes procedimientos de cultivo. Los hongos muestran polimorfismo entre la forma micelial y sus conidios, y además existen variaciones antigénicas importantes relacionadas con las condiciones externas de crecimiento, el tiempo, la temperatura de incubación, el pH y las concentraciones de nitrógeno y carbohidratos en los medios de cultivo utilizados. Estos alergenofúngicos pueden obtenerse del micelio, de las esporas del hongo, o de los metabolitos en el medio donde se realiza el cultivo.⁹

DIAGNÓSTICO DE LA ALERGIA A LOS HONGOS

El diagnóstico de alergia a los hongos es complicado, probablemente porque los extractos comerciales dis-

ponibles para los procedimientos de diagnóstico no son muy confiables en cuanto a su actividad alérgica, además de la gran variabilidad en composición comercial que hay entre un lote y otro. En los hongos, a diferencia de lo que ocurre con la mayor parte de los demás agentes etiológicos sensibilizantes, no se puede saber claramente dónde está la fuente original sensibilizante, si en los micelios, en las esporas o en sus metabolitos, por lo que no se sabe con claridad cómo se deben producir los extractos con actividad antigénica ni cuáles son los métodos más adecuados para realizar una estandarización. Además, existe gran variabilidad antigénica entre las cepas fúngicas.¹⁰

El abordaje clínico de los trastornos por hipersensibilidad a los hongos tiene grandes dificultades en el diagnóstico y aún más en el tratamiento específico mediante inmunoterapia. No se puede efectuar un buen diagnóstico alergológico si no se tienen extractos antigénicos óptimos, estandarizados y estables, que proporcionen resultados reproducibles, específicos y concordantes para todas las pruebas que se realicen, como las cutáneas de determinación de anticuerpos y de provocación, principalmente.¹¹

ESTANDARIZACIÓN DE ALERGENOS FÚNGICOS

Existen varias etapas bien diferenciadas en la estandarización de los alergenofúngicos:

Selección de la materia prima: el primer paso es disponer de una materia prima de excelente calidad. Ésta comprende la cepa o cepas utilizadas para la producción, el medio de cultivo y las condiciones de cultivo en cuanto al pH, la temperatura, el tiempo de incubación y la humedad. Una vez seleccionada la cepa productora de antígeno, corresponde cultivar el hongo buscando un crecimiento óptimo para disponer de una masa de micelio o levadura que permita la extracción de antígenos estructurales o bien un medio de cultivo en el que el hongo haya vertido sus metabolitos y proteínas alérgicas. Este paso es muy crítico, puesto que se utilizará un medio de cultivo determinado según la especie de hongo, se procederá a incubarlo a temperatura

adecuada. Como es evidente, son muchas variables que es necesario precisar a detalle, puesto que de ellas dependerá no sólo el volumen del extracto, sino la calidad del mismo.¹² Varios parámetros físico-químicos han de ser estandarizados y adaptados a las condiciones de cada especie. Por ejemplo, *Cladosporium* sp se desarrolla a temperaturas entre 22 y 25 °C, mientras que *Aspergillus fumigatus* lo hace entre 32 y 37 °C. Los antígenos de *Candida albicans* se preparan con cultivos que toman entre cinco y siete días, mientras que los de *Alternaria* sp suelen requerir entre tres y cuatro semanas y los dermatofitos cinco o seis semanas.¹³

Extracción de biomoléculas antigénicas: se considera que los extractos preparados a partir del medio de cultivo suelen ser muy útiles y de buen rendimiento. Blanco y colaboradores obtuvieron antígenos de *Aspergillus fumigatus* y prepararon soluciones antigénicas tanto de extracto micelar como de filtrado de cultivos, que fueron utilizadas para determinar, mediante ELISA, las concentraciones de anticuerpos específicos en el suero de pacientes con ABPA y de algunos individuos de control. Los resultados de este ensayo indicaron que los extractos micelares parecen más adecuados para su utilización en el diagnóstico inmunológico de ABPA.¹⁴

Así mismo, Martínez y colaboradores obtuvieron extractos de *Alternaria alternata* a partir de tres fuentes diferenciadas, dos de las cuales contenían antígenos somáticos (extracto periplasmático y extracto de micelio-esporas) y la tercera un filtrado de cultivo que contenía antígenos metabólicos. Los componentes proteicos antigénicos se evaluaron cuantitativamente mediante electroforesis SDS-PAGE y de alérgenos o proteínas fijadoras de la IgE (SDS-PAGE Immunoblotting).¹⁵ Disponer de extractos libres de productos nocivos, como las micotoxinas, o de materiales no antigénicos es fundamental, para ello éstos deben someterse a precipitación, diálisis, concentración y filtraciones aclarantes y esterilizantes.¹⁶

Conservación: la liofilización es, probablemente, el mejor sistema de conservación de los extractos alérgicos; aunque también suele utilizarse la ultracongelación.

Condiciones de extracción: las soluciones tamponadas y tiempos de extracción deben optimizarse para cada alérgeno en específico, con objeto de evitar pérdidas antigénicas. Según las conclusiones de varios autores que han estudiado este tema, se considera que el antígeno metabólico de la mayor parte de los hongos micelares es adecuado. Sin embargo, con las levaduras se prefiere utilizar extractos somáticos que por lo general ofrecen mayor contenido proteico.¹⁷

Mediante estudios por inmunotransferencia y pruebas *in vitro* pueden detectarse alérgenos mayores y menores de *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium chrysogenum*. Se observa que los extractos metabólicos tienen mayor contenido alérgico que los extractos somáticos; sin embargo, en muchos alérgenos se emplea una mezcla con diferentes proporciones de extracto metabólico y extracto somático, denominada antígeno total.¹⁸

Evaluación del extracto alérgico final: una vez que se dispone del extracto alérgico fúngico completamente procesado, es imprescindible proceder a su evaluación química e inmunológica. Cada lote de extracto se analiza cuantificando su contenido de proteínas y carbohidratos. El análisis incluye la determinación de su patrón proteico en geles de poliacrilamida y la detección de sus alérgenos mayores por inmunotransferencia. Los extractos son validados sólo si cumplen los criterios de identidad con el estándar establecido. Sin embargo, la reactividad inmunológica *in vitro* mediante el uso de sueros de referencia con anticuerpos IgE e IgG es esencial para conocer si existe la presencia adecuada de los antígenos mayores y menores. Para ello se utilizan diferentes métodos inmunológicos, y entre ellos tiene especial importancia la inmunoelectrotransferencia.¹⁹

VACUNAS CON ALÉRGENOS FÚNGICOS

Las vacunas que se utilizan contra las enfermedades alérgicas contienen alérgenos extraídos de sustancias biológicas a las cuales los pacientes son alérgicos. Las vacunas estandarizadas se preparan en fórmulas acuosas, glicerinadas y desecadas por congelación, y son compatibles para mezclarse con productos no

estandarizados.²⁰ Se debe tomar en consideración la calidad de los extractos alérgicos. Cuando las preparaciones son mixtas, la prescripción se realiza considerando los cruces antigénicos entre los elementos que las conforman y la potencia de degradación causada por las enzimas proteolíticas en los mismos. Debe especificarse la dosis de inicio y la de mantenimiento; así como también si el alergeno fúngico es estandarizado (unidades alérgicas [AU] o bioequivalentes de unidades alérgicas [BAU]) o no estandarizado (unidades de nitrógeno proteico [PNU] o dilución peso/volumen [p/v]). Los esquemas más recomendados de la duración ideal de la inmunoterapia indican que ésta debe tomar de tres a cinco años, aunque también existen otros esquemas a corto plazo que han sido menos estudiados.²¹

La fuente del material para las vacunas con hongos generalmente se obtiene cultivando éstos bajo condiciones controladas, como las que se mencionaron anteriormente. Los micelios y las esporas deben estar presentes en este material. Ya que la composición alérgica de un hongo es variable, una vacuna debe prepararse a partir de los tres últimos cultivos diferentes de la misma especie. Es muy importante que se usen condiciones de cultivo exactas para asegurar que la composición alérgica entre los cultivos de hongos sea similar. El material fúngico inicial debe obtenerse de centros bien establecidos, con una buena reputación que indique si producen materiales crudos para cultivo. Pocos laboratorios venden extractos fúngicos bien estandarizados, así que la inmunoterapia con estos alergenos sólo se recomienda en casos que no mejoren con farmacoterapia.²²

INMUNOTERAPIA CON EXTRACTOS FÚNGICOS

La desensibilización mediante alergenios fúngicos consiste en administrar cantidades gradualmente crecientes de un extracto alérgico a un sujeto alérgico para disminuir sus síntomas causados por la exposición al alergeno fúngico. La inmunoterapia es el único tratamiento etiológico contra las enfermedades alérgicas respiratorias mediadas por

anticuerpos IgE específicos.²³ Por ello, debe destinarse a los pacientes con rinitis y asma alérgicas luego de la exposición natural a alergenios, con alergia IgE mediada ante los aeroalergenios y demostrada por pruebas cutáneas o pruebas *in vitro*, cuando no es posible controlar los síntomas o evitar los aeroalergenios y los sujetos se benefician sustancialmente con un tratamiento tolerado de farmacoterapia.²⁴ Su eficacia clínica se ha demostrado siempre que, primero, se realice una indicación correcta, basada en la demostración de que la sensibilización al alergeno juega un papel relevante en la evolución de los síntomas y la gravedad de la enfermedad; segundo, se disponga de extractos alérgicos de alta calidad adecuados para procedimientos terapéuticos; y finalmente, se ejecute su administración en dosis y tiempo apropiados.²⁵

La inmunoterapia con alergenios de pólenes, insectos, epitelios de animales, cucarachas y ácaros del polvo es un tratamiento eficaz para la rinitis y el asma alérgicas. Respecto a la inmunoterapia con vacunas que contienen alergenios fúngicos, los hongos tienen varias características que los distinguen de otros alergenios inhalados: (1) existen cientos de especies diferentes de hongos; (2) los patrones de exposición a la mayor parte de las especies de hongos no se conocen bien; (3) la calidad de las vacunas de hongos es variable; y (4) no existen vacunas para muchos géneros de hongos.²⁶ Aunque podemos encontrar pocos estudios relativos a la inmunoterapia con alergenios con vacunas de hongos, hay dos estudios doble ciego, controlados con placebo, que mostraron que la inmunoterapia con vacunas estandarizadas de *Cladosporium* y *Alternaria* pueden ser eficaces en la rinitis o en el asma.^{27,28}

ESTABILIDAD MOLECULAR DE ALERGENIOS FÚNGICOS

Aunque es importante contar con extractos adecuadamente caracterizados, de alta potencia y consistentes entre lotes, también lo es mantener dicha potencia, pues hay que tener en cuenta que existen diversos factores que determinan la estabilidad del extracto, como el tiempo y la temperatura

de almacenamiento, las diluciones, los diluyentes y el tipo de alérgenos que se están manejando en la inmunoterapia; además, deben considerarse los fenómenos de reactividad cruzada entre diferentes especies de hongos.²⁹

Existen pruebas de que enzimas proteolíticas y glucosídicas se encuentran en algunos extractos de hongos que digieren los alérgenos de algunas vacunas de polen. Por ejemplo, la vacuna para *Aspergillus* ha mostrado que reduce la actividad de unión a la IgE de la vacuna para el pasto timothy cuando ambas se mezclan. Aun cuando no hay datos de que esta reducción de la unión a la IgE disminuya la eficacia de la inmunoterapia, estas interacciones no han sido bien estudiadas. Por esta razón puede ser deseable mantener las vacunas con alta actividad proteolítica-enzimática (por ejemplo, las vacunas para hongos) separadas de las que tienen baja actividad (pólenes). Y finalmente, debe considerarse la presencia de proteasas en extractos de hongos, como *Alternaria* y *Cladosporium*, capaces de degradar otras proteínas.³⁰

CONCLUSIONES

Los extractos alérgenos estandarizados tienen caracterizada adecuadamente su potencia, ésta se define como la actividad alérgica total, determinada por la suma de la actividad anticuerpo que tiene cada molécula de IgE específica para cada epítipo de cada alérgeno presente en el extracto. La determinación de la potencia de un extracto se realiza valorando las actividades alérgica total y la biológica, por tanto, la utilización de preparados adecuadamente estandarizados implica mayor precisión en el diagnóstico de enfermedades con participación de la IgE y en la especificidad e intensidad de esa reacción, por lo que todo ello resulta en mayor reproducibilidad del método y menor número de falsos positivos.³¹

La evaluación clínica, en tanto, plantea una serie de problemas especiales. El primero es que aún no contamos con materiales para realizar la prueba cutánea alérgica para la mayor parte de los hongos

ambientales. Los que están disponibles generalmente no están estandarizados, y la reactividad en la prueba cutánea varía para antígenos similares, con etiquetas idénticas producidas por diferentes fabricantes de antígenos. El detalle principal al momento de manejar pacientes con sensibilización demostrada a antígenos fúngicos y con una correlación clara con los síntomas clínicos es que éstos eviten los sitios en los que los hongos forjan su simiente.³²

La gran variabilidad entre los diferentes extractos es un problema especialmente presente en los extractos de hongos, ya que pueden existir grandes diferencias antigénicas de una cepa a otra: por el medio de cultivo, la fuente de donde se obtuvo y el procedimiento mediante el cual se produjo el extracto.³³ En la actualidad –excepto para algunos alérgenos–, la mayor parte de los extractos alérgenos de hongos comercializados no están estandarizados, por lo que el contenido alérgico de los diferentes extractos no puede compararse directamente. La mayor parte de los extractos fúngicos utilizados, tanto en el diagnóstico como el tratamiento, contienen otros componentes y otras proteínas no alérgicas. Algunos hongos filamentosos, como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Alternaria alternata*, son productores de micotoxinas (aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas, monometileter de alternariol, altertoxinas I y II, alenueno, alenusina, ácido tenuazónico, etcétera), por lo que debe evitarse su presencia en los extractos elaborados con fines diagnósticos y terapéuticos, por su potencial efecto tóxico o irritante.³⁴ Existe mucho por hacer en el campo de producción y estandarización biológica de los extractos fúngicos, como la realización de ensayos controlados a partir de la eficacia y la seguridad de la inmunoterapia con extractos fúngicos estandarizados en pacientes alérgicos hipersensibles a los antígenos de hongos.

REFERENCIAS

1. Chapman JA, Terll AL, Jacobs RL, Charlesworth EN, et al. Toxic mold: phantom risk vs science. *Ann Allergy* 2003;91:222-32.

2. Jalonen M, Stern DA, Wright AL, et al. *Alternaria* as a major allergen for asthma in children raised in a desert environment. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1356-61.
3. García R, Nader O, Morfin B. Correlación entre pruebas cutáneas positivas a hongos, IgE total, e IgE específica por ELISA y cultivos de hongos en el medio ambiente del paciente pediátrico alérgico. *Revista Alergia México* 2001;48:137-40.
4. De Vogue M, Thaker AJ, Curran I, Zhang L, et al. Isolation and expression of a cDNA clone encoding an *Alternaria alternata* Alt a 1 subunit. *Int Arch Allergy Immunol* 1996;111:385-95.
5. Bush RK, Sánchez H, Geisler D. Molecular cloning of a major *Alternaria alternata* allergen, rAlt a 2. *JNCI* 1999;104:665-71.
6. Achatz G, Oberkofler H, Lechenauer E, et al. Molecular cloning of major and minor allergens of major *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum*. *Mol Immunol* 1995;32:213-27.
7. Lockey RF, Bukantz SC, Bousquet J. Allergens and allergen immunotherapy. *Fungal Allergens*. U.S.A. 2004;237-8.
8. Busch RK, Portnoy JM. The role and abatement of fungal allergens in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107s:430-40.
9. Pontón J, Moragues MD, Gené J, Guarro J y col. Hongos y actinomicetos alérgicos. *Revista Iberoamericana de Micología* 2002.
10. Lizaso MT, García BE, Gómez B, Zabalegui A, et al. Treatment of allergy to mushrooms. *ANALES* 2003;26(Suppl 2).
11. Harold SN. Administración adecuada de inmunoterapia específica en pacientes alérgicos. *Alergia e Inmunol Pediatr* 1996;5:160-5.
12. Torres JM. Hongos y alergia o un binomio polémico. *Allergy Clin Immunol* 2002;17:139-40.
13. Torres JM. Mesa redonda: estado actual de la alergia a hongos. Estandarización de alergenos fúngicos. *Alerg Immunol Clin* 2003;18:106-21.
14. Blanco JL, García ME, Kurup VP. Immunoreactivity of antigen extracts of *Aspergillus fumigatus* isolated from different sources. *Rev Iberoam Micol* 1997;14:60-2.
15. Martínez A, Asturias JA, Pineda J, Lizaso MT y col. Extractos alérgicos de *Alternaria alternata* para diagnóstico y tratamiento. Reuniones anuales, Conferencia inaugural: ponencias de la edición 2001. España.
16. Martínez J, Martínez A, Gutiérrez G, Llazaes A y col. Influencia del proceso de obtención en la actividad alérgica y rendimiento de extractos de *Alternaria alternata*. *Rev Iberoam Micol* 1994;11:10-3.
17. Madrenys N, Torres JM. *Aspergillus fumigatus* comatic antigens: comparison between two methods of preparation and immunochemical characterization. *Allergol Immunopathol* 1995;23:164-70.
18. Cruz A. Caracterización bioquímica e immunoquímica de extractos alérgicos de *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium chrysogenum*. Tesis de la Facultad de Medicina. Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Celular. Universidad del País Vasco 1997.
19. The use of standardized allergen extracts. Position statement. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (AAAAI). *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:583-6.
20. Nelson H. Effects of preservatives and conditions of storage on the potency of allergy extracts. *J Allergy Clin Immunol* 1981;67:64-9.
21. Ávila L, Lerma-Ortiz L, Velásquez Y, Navarro BE y col. Reacciones adversas a la inmunoterapia en pacientes pediátricos. *Revista Alergia México* 2003;50:182-6.
22. Fischer TJ y col. Alergia e inmunología: programa de autoevaluación de conocimientos médicos MKSAP. 3ª ed, 2005:275-8.
23. Fernández-Caldas E. Presente y futuro de la inmunoterapia. *J Allergy Clin Immunol* 2001;16:6-12.
24. Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Immunotherapy in asthma: an updated systematic review. *Allergy* 1999;54:1022-41.
25. Páez YL, Del Río BE, Lerma L, Sierna JLL. Comparación de 4 extractos alérgicos para el diagnóstico de hipersensibilidad tipo 1 en niños con rinitis alérgica en el HIM FG. En: *Alergia, asma e inmunología pediátricas* 2002;10:16-20.
26. Salvaggio JE, Burge HA, Chapman JA. Emerging concepts in mold allergy: what is the role of the immunotherapy? *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:217-22.
27. Dreborg S, Agrell B, Foucard T, Kjellman NI, et al. A double-blind multicenter immunotherapy trial a children, using a purified and standardized *Cladosporium herbarium* preparation. I. Clinical results. *Allergy* 1986;41:131-40.
28. Horst M, Hejjauoi A, Horst V, Michael FB et al. Double-blind, placebo-controlled rush immunotherapy with a standardized *Alternaria* extract. *J Allergy Clin Immunol* 1990;85:460-72.
29. Nelson HS, Iklé D, Buchmeier A. Studies of allergen extract stability: the effect of dilution and mixing. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:382-8.
30. Rosenbaum M, Esch R, Schwartzman R. Effects of mold proteases on the biological activity of allergenic pollen extracts. *Am J Vet Res* 1996;57:1447-52.
31. Arduoso L. Allergens' characteristics for skin tests. *Archivos de Alergia e Inmunología Clínica* 2002;33:S43-S50.
32. Chapman JA. Actualización sobre los hongos ambientales y alergia a hongos. *Allergy and Asthma Proceedings* 2000;14:13-6.
33. Vailes L, Sridhara S, Cromwell O, Weber B, et al. Quantitation of the major fungal allergens, Alt a 1 and Asp f 1, in commercial allergenic products. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:641-6.
34. Malling HJ, Weeke B. EAACI Immunotherapy subcommittee. Position paper: immunotherapy. *Allergy* 1993;48:1-45.