

**Original****Actividad biológica de extractos de frutas de la familia rosácea propios liofilizados. Comparación con extractos comerciales**

M. D. Muro, M. T. Lizaso, B. E. García, S. Acero, J. M. Olaguibel, A. I. Tabar

*Sección de Alergología. Hospital Virgen del Camino. Pamplona*

**Introducción:** Las pruebas cutáneas con extractos comerciales de frutas y verduras son a menudo insatisfactorias por resultar negativas en situaciones claras de alergia. La prueba prick by prick con alimento natural solventa esta deficiencia pero la estacionalidad de muchos vegetales impide disponer de ellos durante todo el año. Hemos diseñado una técnica sencilla de liofilización utilizándola para extractos de frutas rosáceas (pulpa de melocotón, piel de melocotón, manzana y pera). **Objetivo:** Comparar la actividad biológica de nuestros extractos liofilizados con dos de los comerciales disponibles actualmente. **Material y Métodos:** 27 pacientes con clínica de anafilaxia o Síndrome de alergia oral por estas frutas y prick by prick y/o IgE sérica específica positivas a una o más de ellas. Diez sujetos controles a quienes se efectuó pruebas cutáneas. La actividad biológica de los extractos se evaluó "in vivo" mediante bioensayo de líneas paralelas e "in vitro" mediante inhibición del CAP. **Resultados:** El estudio "in vivo" demuestra una mayor actividad biológica de los cuatro extractos liofilizados respecto a los comerciales que se confirma con el estudio de Inhibición del CAP para los extractos liofilizados de piel de melocotón, manzana y pera. No se observan diferencias significativas entre los extractos comerciales estudiados. **Conclusiones:** Nuestros extractos liofilizados tienen una actividad biológica superior a la de los comerciales estudiados.

PALABRAS CLAVE: **Alergia alimentaria / extractos liofilizados / rosáceas.****Biologic activity of self-prepared lyophilized extracts of fruits from the Rosaceae family. Comparison with commercial extracts**

**Introduction:** The experience with commercial vegetable extracts is not satisfactory, therefore prick by prick test with natural food is recommended. The seasonal character of many vegetables makes impossible their use during all the year. In this work, we present the results obtained with our lyophilized food extracts: apple, pear, peel and pulp of peach compared with two commercial extracts. **Material and Methods:** 27 patients with anaphylaxis or oral allergic syndrome due to rosaceae fruits and positive prick by prick test or specific serum IgE for at least one of these fruits. 10 subjects as control group. Our extracts were prepared from raw juice. Prick test were made with three concentrations as is, 1/4 and 1/16. Wheal areas were studied by parallel line assay (PLA). CAP-Inhibition assay using the different extracts at tenfolded concentration (1-10,000) as liquid phase, was performed. **Results:** Commercial extracts were significantly less powerful than lyophilized extracts in the PLA and in CAP-Inhibition. There were not differences between both of the commercial extracts. **Conclusions:** Our lyophilized extracts of rosaceae fruits (apple, pear and peel and pulp of peach) have higher biological activity than the two studied commercial extracts, assessed by prick test (PLA) and confirmed by CAP-Inhibition.

KEY WORDS: **Food allergy / Lyophilized extracts / Rosaceae.****INTRODUCCION**

La experiencia del alergólogo con los extractos comerciales de alimentos, y en particular con los de origen vegetal, es insatisfactoria ya que en muchas ocasiones las pruebas cutáneas realiza-

das en pacientes con clínica alérgica clara son negativas.

En la práctica clínica diaria, la deficiencia de los extractos comerciales se solventa con el uso del alimento natural mediante la prueba de "prick by prick"<sup>1</sup>. Sin embargo, dada la estacionalidad de

**Tabla I.** Características de los pacientes alérgicos a rosáceas incluidos en el estudio

EDAD		CLINICA	PRICK					IgE (Ku/l)		
1	20	SAO: Me, Ot	Me pi +	Me pu +	Ma NT	Pe NT	Ot +	Me 1,0	Ma NT	Pe NT
2	42	SAO: Me, Ot	Me pi +	Me pu +	Ma NT	Pe NT	Ot -	Me NT	Ma NT	Pe NT
3	14	SAO: Me, Ot	Me NT		Ma +	Pe +	Ot +	Me NT	Ma 1,9	Pe -
4	18	Anaf: Me, Ma, Pe, Ot	Me pi +	Me pu +	Ma +	Pe +	Ot +	Me 4,0	Ma 6,5	Pe 1,4
5	15	Anaf: Me, Ma, Ot	Me pi +	Me pu +	Ma +	Pe +	Ot +	Me 2,0	Ma 3,6	Pe -
6	27	Anaf: Me, Ma, Ot	Me pi +	Me pu +	Ma +	Pe +	Ot +	Me 3,3	Ma 3,4	Pe -
7	19	SAO: Me, Ma, Pe, Ot	NT					Me 39,1	Ma 15,1	Pe 3,6
8	17	Anaf: Ma	Me NT		Ma +	Pe NT	Ot NT	Me 1,4	Ma 1,5	Pe 0,4
9	20	Anaf: Me, Ot	Me pi +	Me pu +	Ma +	Pe NT	Ot +	Me NT	Ma NT	Pe NT
10	20	SAO: Me, Ot	Me pi +	Me pu +	Ma +	Pe NT	Ot +	Me 2,2	Ma 2,0	Pe 0,5
11	32	Anaf: Me, Ma, Pe, Ot	Me pi +	Me pu +	Ma +	Pe +	Ot +	Me 3,2	Ma 6,0	Pe NT
12	14	Anaf: Me	Me pi +	Me pu +	Ma +	Pe +	Ot NT	Me 3,3	Ma 2,2	Pe 1,4
13	30	SAO: Me	Me pi +	Me pu +	Ma NT	Pe NT	Ot +	Me 0,8	Ma NT	Pe NT
14	35	Anaf: Me	Me pi +	Me pu +	Ma +	Pe +	Ot +	Me 11,7	Ma NT	Pe 6,1
15	20	Anaf: Me, Ma	Me pi +	Me pu +	Ma +	Pe +	Ot +	Me -	Ma 0,4	Pe NT
16	26	SAO: Me	Me pi +	Me pu +	Ma +	Pe +	Ot +	Me NT	Ma NT	Pe NT
17	22	Anaf: Me, Ma, Ot	Me pi +	Me pu +	Ma +	Pe +	Ot +	Me -	Ma 0,4	Pe NT
18	20	Anaf: Me, Ma, Ot	Me pi +	Me pu +	Ma +	Pe NT	Ot +	Me 7,0	Ma 6,1	Pe 4,0
19	14	SAO: Me, Ma, Pe	Me pi +	Me pu +	Ma +	Pe +	Ot +	Me 0,4	Ma 1,3	Pe NT
20	23	Anaf: Me, Ma, Ot	Me pi +	Me pu +	Ma +	Pe NT	Ot +	Me 4,0	Ma NT	Pe 3,7
21	18	Anaf: Me, Ma, Pe, Ot	Me NT		Ma +	Pe NT	Ot NT	Me 1,9	Ma 3,7	Pe NT
22	21	SAO: Me	Me pi +	Me pu +	Ma NT	Pe NT	Ot +	Me 0,56	Ma NT	Pe NT
23	22	Anaf: Me, Ma, Pe, Ot	Me pi +	Me pu +	Ma +	Pe +	Ot +	Me 5,2	Ma 6,9	Pe 2,1
24	22	Anaf: Me, Ma, Ot	Me pi +	Me pu +	Ma +	Pe +	Ot +	Me 1,8	Ma NT	Pe -
25	18	Anaf: Me, Ma	Me NT		Ma +	Pe +	Ot NT	Me 2,5	Ma 1,9	Pe -
26	20	Anaf: Me, Ma, Pe, Ot	Me pi +	Me pu +	Ma +	Pe +	Ot NT	Me 3,9	Ma 7,3	Pe 3,8
27	21	SAO: Me, Ot	Me pi +	Me pu +	Ma NT	Pe NT	Ot +	Me 1,3	Ma NT	Pe NT

SAO: Síndrome de alergia oral

Me pi: Piel de melocotón

+ : prueba positiva

Anaf: Anafilaxia

Me pu: Pulpa de melocotón

- : prueba negativa

Ot:Otras

Ma: Manzana

NT: no testado

Pe: Pera.

muchos vegetales, es imposible disponer de ellos para realizar este tipo de pruebas durante todo el año.

Existen estudios que demuestran que el uso de extractos liofilizados de vegetales proporciona unos resultados iguales a los obtenidos con el alimento natural<sup>2</sup>. Por ello, hemos elaborado nuestros propios extractos liofilizados, que aporten las ventajas de los vegetales frescos, obviando la limitación de su estacionalidad. En este trabajo presentamos los resultados obtenidos con los extractos de frutas de la familia rosácea: melocotón pulpa, melocotón piel, manzana y pera.

**OBJETIVO**

Nuestro objetivo consiste en comparar la actividad biológica de extractos liofilizados propios de pulpa de melocotón, piel de melocotón, manzana

y pera, con la de dos de los extractos comerciales que habitualmente se utilizan en nuestro entorno (Leti y Arístegui).

**MATERIAL Y METODOS**

**Pacientes**

En el estudio se incluyeron 27 pacientes de entre los que habían acudido a nuestra consulta que cumplieran los siguientes criterios: edad igual o superior a 14 años, historia de anafilaxia o Síndrome de alergia oral (SAO) en relación con la ingesta de una o varias de las frutas incluidas en el estudio, estudio prick by prick positivo ( $\varnothing > 3mm$ ) y/o IgE específica sérica positiva (clase 2 o superior, CAP- system) para al menos una de ellas. Los datos previos a la inclusión en el estudio se presentan en la Tabla I. Asimismo, se introdujeron 10 sujetos controles sin historia de alergia

**Tabla II.** Descriptiva de los prick realizados con las tres concentraciones de los extractos estudiados

Extracto (dilución)	Nº de casos con prick + ( $\varnothing > 3$ mm)			Area de pápula (mm <sup>2</sup> ) $\bar{X} \pm DS$		
	Liof	Leti	Aríst	Liof	Leti	Aríst
Melocotón piel (1)	27	21	19	68,7 ± 23,1	11,8 ± 3,9	11,8 ± 4,4
Melocotón piel (1/4)	27	13	12	50,1 ± 19,3	8,8 ± 3,9	9 ± 3,5
Melocot piel (1/16)	27	8	6	38,4 ± 16,3	6,8 ± 3,9	6,2 ± 3,7
Melocotón pulpa (1)	27	22	16	35,3 ± 15,7	11,1 ± 4,1	9,9 ± 5,9
Melocot pulpa (1/4)	26	10	7	23,1 ± 9,3	8,1 ± 3,7	6,7 ± 3,8
Meloc pulpa (1/16)	19	3	2	16,8 ± 7,7	5,3 ± 3,6	4,4 ± 3,4
Manzana (1)	27	10	20	28,9 ± 11,0	9,7 ± 3,2	11,0 ± 4,2
Manzana (1/4)	24	8	8	21,8 ± 9,3	7,7 ± 4,6	8,2 ± 3,3
Manzana (1/16)	21	2	3	15,9 ± 7,4	5,6 ± 3,3	5,2 ± 3,6
Pera (1)	26	26	24	24,2 ± 12,8	20,6 ± 8,8	18,7 ± 7,5
Pera (1/4)	23	20	21	17,9 ± 8,8	15,11 ± 6,9	13,4 ± 5,4
Pera (1/16)	21	17	15	12,8 ± 6,0	11,1 ± 5,7	9,8 ± 4,6

a este tipo de frutas para realizar estudio en prick con los extractos liofilizados.

#### Preparación de extractos propios

Los extractos se prepararon a partir de los zumos de manzana sin pelar, pera sin pelar y pulpa de melocotón (este último diluido al 50% en PBS). El extracto de piel de melocotón se obtuvo tras majar en un mortero piel de melocotón al 50% P/V en PBS. Posteriormente, se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 15 minutos y el sobrenadante se distribuyó en viales de 2 ml que se congelaron durante 24 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Una vez congelados, los viales se colocaron en la boca del liofilizador ("Cryodos" de Telstar S.A. Tarrasa, España) para comenzar la liofilización (condiciones: 1 mbar y  $-40^{\circ}\text{C}$ ) que se mantuvo durante 20 horas. Los extractos liofilizados se almacenaron hasta su uso a una temperatura entre 4 y  $8^{\circ}\text{C}$ . Cuando llegó el momento de su utilización tanto en el estudio "in vivo" como "in vitro", se reconstituyeron con un volumen igual al inicial, 2ml, 50% PBS y 50% glicerina, preservándolos de la luz. El estudio se efectuó en la primera semana tras su reconstitución.

#### Extractos comerciales

Se utilizaron dos de los extractos disponibles actualmente en el mercado: Ifidesa-Arístegui y Leti por ser dos extractos utilizados habitualmente y porque de ambos podemos disponer de las fracciones de piel y pulpa de melocotón por separado.

#### Pruebas cutáneas

Se realizaron en prick y por duplicado en el antebrazo de cada paciente con lancetas ALK-Abelló. Se prepararon tres concentraciones factor 4 de cada extracto (tal cual, 1/4 y 1/16), utilizando PBS como diluyente, que se dispusieron en orden invertido en cada uno de los duplicados. Los extractos comerciales y el liofilizado de cada una de las frutas se dispusieron a la misma altura en el antebrazo para que no hubiera diferencias en la respuesta cutánea que pudieran influir en el resultado de la prueba. Como control negativo se utilizó CINA y como positivo Histamina 10 mg/ml. Antes de la realización del prick, se suspendió previamente toda medicación que pudiera modificar el resultado de la prueba. La lectura a los 15 minutos se realizó perfilando las pápulas con rotulador y pasándolas con papel tipo "cello" a un papel milimetrado para posterior cálculo de áreas por planimetría y estudio mediante ensayo de líneas paralelas (PLA)<sup>3</sup>. Las diluciones de los extractos se desecharon a las 24 h de su preparación.

#### Parámetros "in vitro"

Para el estudio "in vitro" se tomó una muestra de suero de cada paciente. Una alícuota se procesó para determinación de IgE específica frente a manzana, pera y melocotón (CAP-system, Pharmacia) y otra alícuota se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso en los ensayos de inhibición del CAP. Para estos ensayos se constituyó para cada fruta una mezcla con los sueros con IgE  $> 3,5$  KU/l (Clase

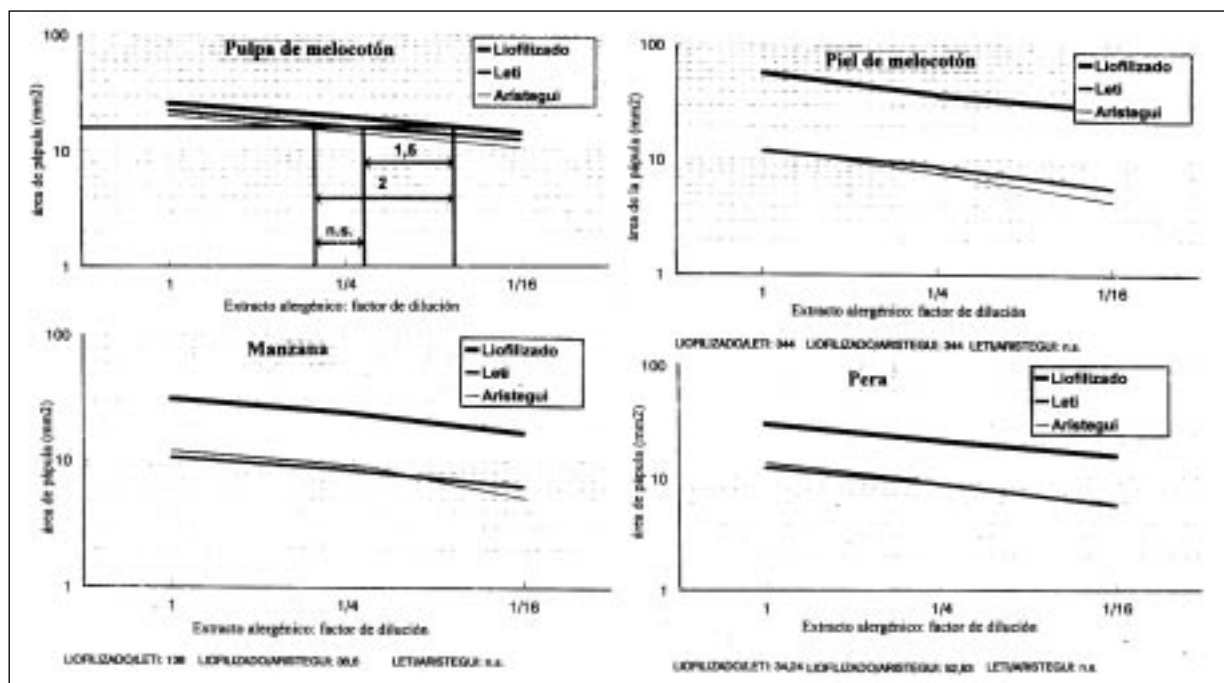


Fig. 1. Estudio PLA: Comparación de la actividad biológica de los extractos de pulpa de melocotón, piel de melocotón, manzana y pera.

3) para la fruta en cuestión. Las fases sólidas utilizadas fueron los inmunoCAPs comerciales (Pharmacia) y se incubaron con 20 ml de suero y 30 ml de PBS o del extracto inhibidor (liofilizado, Leti o Arístegui) en diluciones factor 10 desde la concentración madre hasta la concentración 1/10000. Las diluciones de los extractos se efectuaron con PBS y el estudio se realizó inmediatamente después de haber sido obtenidas.

### RESULTADOS

En la Tabla II se presenta la distribución de la frecuencia de Prick positivo para cada extracto y sus diluciones, así como el valor medio del área de la pápula y su desviación estándar. Las pruebas cutáneas realizadas en los pacientes del grupo control con los extractos liofilizados fueron negativas.

La Fig. 1 muestra los resultados del PLA con los dos extractos comerciales y el liofilizado para cada una de las frutas. Respecto a la pulpa de melocotón, se observa que para conseguir el mismo tamaño de pápula con los tres extractos son necesarias concentraciones mayores de los extrac-

tos comerciales que del liofilizado. La actividad del extracto liofilizado es 2 y 1,5 veces superior que la de los extractos de Leti y Arístegui, respectivamente ( $p < 0,05$ ), no observándose diferencias significativas entre los comerciales.

Las diferencias en la actividad del liofilizado respecto a los comerciales son mucho mayores para el resto de las frutas estudiadas. Así, en los resultados obtenidos con los extractos de piel de melocotón, los cálculos del PLA demuestran que el extracto liofilizado es 344 veces más potente que los comerciales ( $p < 0,05$ ) sin existir diferencias significativas entre los comerciales.

En el caso de los extractos de manzana, también se observa una gran diferencia entre el extracto liofilizado y los comerciales, de tal forma que la actividad del liofilizado es 138 veces mayor que el extracto de Leti ( $p < 0,05$ ) y 38 veces mayor que el de Arístegui ( $p < 0,05$ ) sin apreciarse, tampoco en esta ocasión, diferencias significativas entre la actividad de los extractos comerciales.

Finalmente, algo similar ocurre con la pera, observándose que nuestro extracto liofilizado tiene una actividad 34 veces mayor que el de Leti ( $p$

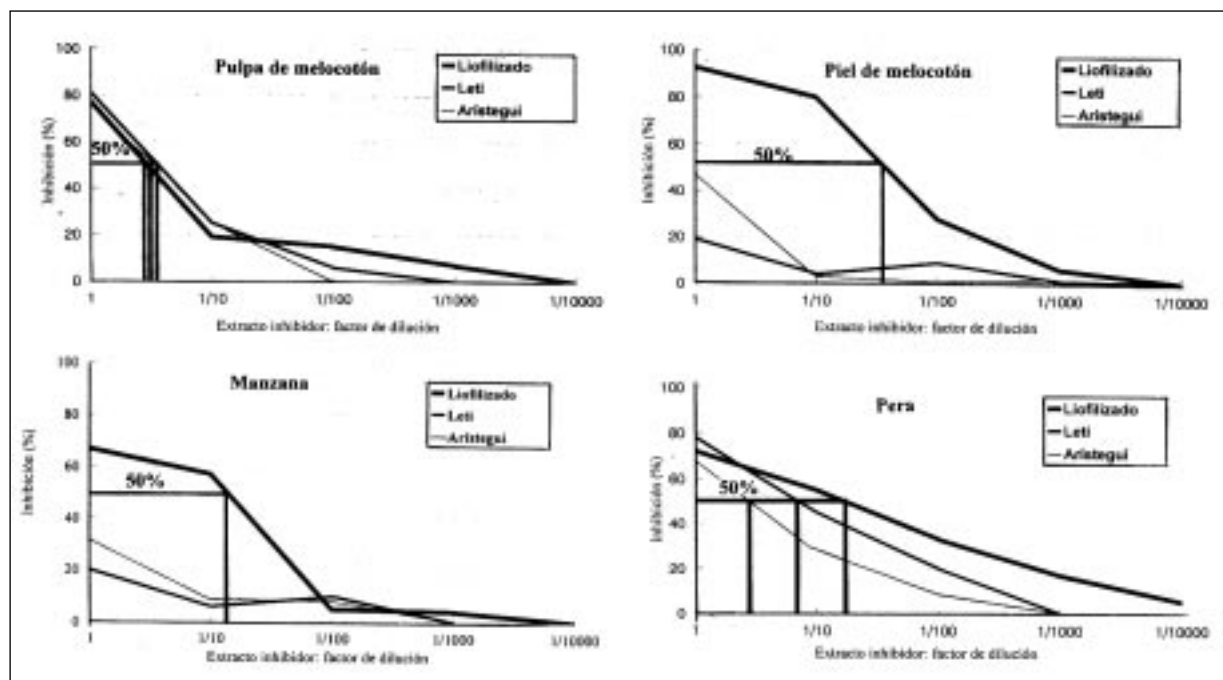


Fig. 2. Inhibición del CAP: pulpa de melocotón, piel de melocotón, manzana y pera.

$< 0,05$ ) y 52 veces mayor que el de Arístegui ( $p < 0,05$ ) sin existir tampoco diferencias significativas en la actividad de los extractos comerciales.

En el ensayo de inhibición del CAP, la máxima captación de IgE específica fue de 6,3 Ku/l para el pool de sueros utilizado en el estudio de piel y pulpa de melocotón, 4,8 Ku/l para el pool utilizado en el estudio de inhibición de manzana y 2,6 Ku/l para el utilizado en la inhibición de pera.

En la Fig. 2 se presentan los resultados de la Inhibición del CAP. Respecto a los extractos de pulpa de melocotón, ya en el PLA podíamos observar que la diferencia de actividad entre los comerciales y el liofilizado, aunque significativa, era menor que con las otras frutas. En la Inhibición del CAP no hay diferencias significativas; con los tres extractos se llega a inhibiciones cercanas al 80% con la concentración mayor y el 50% de inhibición se encuentra entre las concentraciones 1 y 1/10.

Sin embargo, se observan grandes diferencias entre el extracto liofilizado y los comerciales para la piel de melocotón. Con el liofilizado se llega a una inhibición casi completa (92,5%) mientras que con los comerciales no se llega siquiera al 50% con ninguno de ellos.

Resultados similares se obtienen con la manzana, llegándose a un 70% de inhibición con el liofilizado y sin llegar tampoco al 50% con ninguno de los dos comerciales.

Por último, con el extracto de pera, y en contra de la clara diferencia de actividad observada en el estudio "in vivo", con los tres extractos se alcanzan inhibiciones similares, cercanas al 75%, si bien el 50% de inhibición se consigue con concentraciones del extracto liofilizado menores que los comerciales.

## DISCUSION

El diagnóstico de la alergia alimentaria es uno de los temas pendientes de la alergología pues existen pocos extractos estandarizados y el número de alérgenos mayoritarios identificados es escaso, pudiendo incluso no estar representados en el material de diagnóstico<sup>4</sup>. Si fuera posible disponer de extractos estandarizados para los alimentos, la prueba cutánea y el estudio "in vitro" tendrían un verdadero valor diagnóstico como así lo demostró Aas, ya en 1973, al utilizar como extracto el alérgeno M del

bacalao en el diagnóstico de alergia al pescado y con el que obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100%<sup>5</sup>. Sin estandarización, la prueba cutánea y el RAST comercial con alimentos sólo deberán ser tomados como una guía de diagnóstico<sup>6</sup>.

Pero, hasta que la estandarización de extractos de alimentos sea una realidad, deben utilizarse alternativas para mejorar el diagnóstico. Sin duda alguna, la historia clínica es fundamental, complementándose con la provocación oral, preferiblemente doble ciego<sup>7</sup>, que no está exenta de inconvenientes<sup>8-10</sup>.

En el deseo de obtener mejores extractos, se ha intentado optimizar el método de extracción de los alérgenos de frutas y verduras y su conservación<sup>11, 12</sup> aunque la prueba cutánea con el alimento natural sigue dando los mejores resultados<sup>13, 14</sup>. Por ello, y para solucionar el problema de la carencia de alimentos vegetales durante todo el año, hemos procedido a su liofilización, basándonos en estudios previos en los que se aprecia un rendimiento de los extractos vegetales liofilizados en prick similar al alimento natural<sup>2</sup>. En 1985, Yunginger y Jones<sup>15</sup> utilizan la liofilización para asegurar una adecuada estabilidad en el método que proponen para la estandarización de los extractos de cacahuete.

El método que hemos utilizado en la preparación de los extractos de frutas ha sido el que empleamos habitualmente en nuestro laboratorio para la fabricación de extractos liofilizados. Como conservante utilizamos la solución del extracto en glicerina al 50% una vez reconstituido, ya que se ha demostrado que es el modo con el que menor pérdida de actividad hay durante el almacenamiento una vez reconstituidos<sup>16</sup>. No obstante, la pérdida de actividad biológica de los extractos liofilizados una vez reconstituidos no ha sido considerada en este trabajo, en el que dichos extractos fueron utilizados en un máximo de una semana tras su reconstitución.

Los extractos se elaboraron con frutas naturales y crudas pues es así como se ingieren habitualmente. Los de manzana y pera se prepararon a partir de las frutas sin pelar pero para el melocotón se separó la piel y la pulpa ya que algunos pacientes refieren, sobre todo con esta fruta, síntomas en relación exclusivamente con la piel. De hecho, ya ha sido demostrada una mayor alergenidad de la piel del melocotón<sup>17</sup>.

Al cuantificar la actividad de nuestros extractos respecto a los comerciales tanto "in vivo" como

"in vitro" mediante el estudio PLA y la Inhibición del CAP, hemos observado unos resultados muy superiores con los liofilizados. Sólo los extractos comerciales de pulpa de melocotón han presentado una actividad elevada, similar a la del liofilizado.

A pesar de los resultados expuestos, es necesario recalcar que la liofilización de los extractos sólo supone una mejora práctica del diagnóstico de la alergia alimentaria a frutas y verduras puesto que la cuestión última para un buen funcionamiento de los extractos alimentarios, de la misma manera que para los neumoaérgenos, es su estandarización<sup>18</sup>. Sin embargo, hoy por hoy, los laboratorios dedicados a la investigación están mucho más interesados en la estandarización de neumoaérgenos, posiblemente porque este trabajo puede ser rentabilizado con la comercialización de extractos para inmunoterapia, hecho todavía imposible en la alergia alimentaria.

Finalmente, concluimos que:

– Nuestros extractos liofilizados de frutas de la familia rosácea (melocotón pulpa, melocotón piel, manzana y pera) tienen una actividad biológica superior, estadísticamente significativa, a la de los dos extractos comerciales estudiados, valorada por prueba cutánea y estudio PLA y confirmada por estudio "in vitro" mediante inhibición del CAP para los extractos de piel de melocotón, manzana y pera.

– No hemos encontrado diferencias significativas en la actividad biológica de los dos extractos comerciales estudiados.

– Por tanto, consideramos que la utilización de estos extractos liofilizados puede mejorar el diagnóstico clínico.

## BIBLIOGRAFIA

1. Dreborg, S., Foucard T.: Allergy to apple, carrot and potato in children with birch pollen allergy. *Allergy* 1983; 38: 167-72.
2. Deluce Ch., Dunoyer-Geindre S., Girard J. P.: Comparative analysis of lyophilized fresh fruits and vegetables with commercial extracts for skin testing of patients with food allergy. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1991; 1 (1): 53-7.
3. Finney D. J.: Statistical method in biological assay. 3th ed. London: Charles Griffin & Co Ltd, 1978; 69-104.
4. Pastorello E. A.: Evaluating new test for the diagnosis of food allergy. *Allergy* 1995; 50: 289-91.

5. Aas K., Lundkvist U.: The radioallergosorbent test with a purified allergen from codfish. *Clin Allergy* 1973; 3: 255-61.
6. Sampson H. A., Albergo R.: Comparison of results of skin test, RAST, and double-blind, placebo-controlled food challenges in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 74: 26-33.
7. May C. D.: Are confusion and controversy about food hypersensitivity really necessary? *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75: 329-33.
8. Ortolani C., Pastorello E. A., Farioli L., Spano M., Pravettoni V., Berti C., et al: IgE-mediated allergy from vegetable allergens. *Ann Allergy* 1993; 71: 470-6.
9. Bahna S. L.: Blind food challenge testing with wide-open eyes. *Ann Allergy* 1994; 72: 235-8.
10. Ortolani C., Spano M., Pastorello E. A., Bigi A., Ansaloni R.: The oral allergy syndrome. *Ann Allergy* 1988; 61: 47-52.
11. Rudeschko O., Fahlbusch B., Henzgen M., Schlenvoigt G., Herrman D., Jäger L.: Optimization of apple allergen preparation for in vivo and in vitro diagnostics. *Allergy* 1995; 50: 262-8.
12. Björkstén F., Halmepuro L., Hannuksela M., Lahti A.: Extraction and properties of apple allergens. *Allergy* 1980; 35: 671-7.
13. Meseguer J., Hernández J., Negro J. M., García J., Pagán J. A.: Estudio comparativo entre pruebas cutáneas realizadas con alimentos naturales y con extractos antigénicos comerciales. *Rev Esp Alergol Immunol Clin* 1987; 2: 376-80.
14. Ortolani C., Spano M., Pastorello E. A., Ansaloni R., Magri G. C.: Comparison of results of skin prick test (with fresh foods and commercial food extracts) and RAST in 100 patients with oral allergy syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 683-90.
15. Yunginger J. W., Jones R.: A review of peanut chemistry-implications for the standardization of peanut extracts. Presented at 4th Int Paul Ehrlich Symposium on Regulatory Control and Standardization of Allergenic extracts, Bethesda, MD, 1985, October 16-18.
16. Nelson H. S.: Effect of preservatives and conditions of storage on the potency of allergy extracts. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 67: 64-9.
17. Leonart R., Cisteró A., Carreira J., Batista A., Moscoso J.: Food allergy: identification of the major IgE-binding component of peach (*Prunus persica*). *Ann Allergy* 1992; 69: 128-30.
18. Reed C. Yunginger J. Evans R.: Quality assurance and standardization of allergy extracts in allergy practice. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84: 4-8.

M<sup>a</sup> Dolores Muro Leyún  
 Avda. España nº 76, 2<sup>o</sup>D  
 San Sebastián de los Reyes  
 28700 Madrid