

  
**allermetrix**  
*Mejorando la respuesta alérgica*



---

Los líquidos alérgenos mejoran el  
valor diagnóstico de alergia in vitro

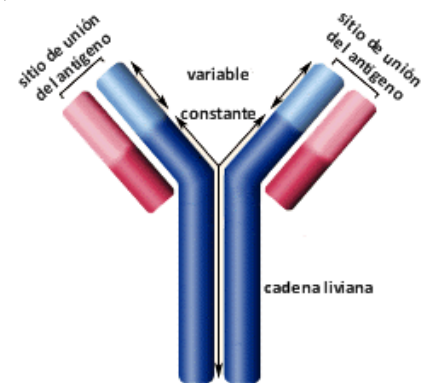
---

*Jay Weiss, Ph.D. y Gary Kitos, Ph.D. H.C.L.D*

Desde el descubrimiento de la IgE, la prueba de suero contra la IgE alergena específica ha sido utilizada en el diagnóstico de la alergia. La prueba de radioalergoadsorción (sigla en inglés RAST), descrita por primera vez por Wide et al. en 1967(1) ha sido mejorada con los años utilizando las nuevas tecnologías para mejorar el valor diagnóstico de la prueba. La mayoría de los fabricantes de diagnósticos han seguido utilizando los alérgenos en fase sólida. Al principio, la fase sólida era un disco de papel y, más recientemente, se ha utilizado una esponja de celulosa para el acoplamiento a los alérgenos. Allermatrix adicionalmente ha introducido mejoras en la prueba RAST, los alérgenos en fase líquida en vez de alérgenos de unión covalente a una fase sólida. Para un clínico o médico los alérgenos líquidos representan un gran avance tecnológico que mejora el rendimiento del ensayo y el valor diagnóstico de la prueba de IgE específica.

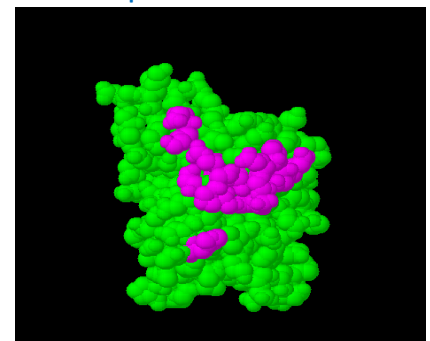
Los alérgenos son proteínas que inducen una respuesta IgE en personas predispuestas. Los alérgenos causan la activación de mastocitos, cuando la IgE específica para el alérgeno se une a la superficie. La sección de la proteína que se une el anticuerpo IgE, se llama epítipo o determinante antigénico. La zona del anticuerpo que se une al epítipo se llama sitio de unión del antígeno, la combinación de sitio, o parátipo. El sitio de combinación se encuentra siempre en la misma zona del anticuerpo, y hay 2 parátipos idénticos en cada uno de los anticuerpos IgE. Con el fin de activar un mastocito, por lo menos dos anticuerpos IgE deben entrecruzar un alérgeno, lo que indica que los alérgenos deben tener epítipos múltiples. Es evidente que la condición de los epítipos en el ensayo de IgE específica afectará la capacidad de IgE en suero para unirse a ellos. Es la estructura de estos epítipos que está bien conservada como alérgenos líquidos y no como alérgenos en fase sólida.

**Figura 1 paratopo anticuerpos o antígenos sitio de unión descrito en el modelo de la molécula de anticuerpo**



Los epítipos han sido evaluados durante muchos años por expertos en la inmunología y pueden describirse a grandes rasgos en dos grupos. Lineal (determinantes continuos) que consisten en una cadena de aminoácidos que pueden demostrar reacciones ante la zona combinante o sitio de anticuerpos. Discontinuos (determinantes conformacionales) tienen al menos 2 partes de la cadena de aminoácidos de proteínas o cadenas que no son continuas necesarias para la unión del anticuerpo. En general, los determinantes lineales no requieren que la estructura tridimensional de proteína nativa permanezca preservada. Para la unión de anticuerpos a epítipos de conformación, la estructura tridimensional debe estar presente en la proteína.

**Figura 2 Representación de un factor determinante en la conformación de alérgeno Bet v 1. Residuos morados indican sitio de unión del anti-Bet v 1 de anticuerpos.**



Los epítipos lineales son comúnmente evaluados mediante la síntesis de péptidos que cubren la totalidad de secuencias de aminoácidos de una proteína con secuencias superpuestas en cada péptido. De este modo, cada secuencia puede estar presente en

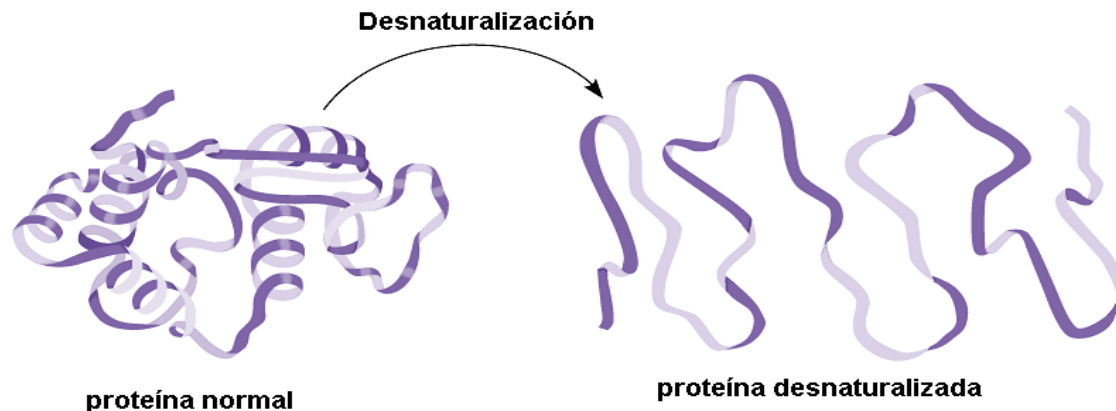
muchos péptidos. Los anticuerpos de las personas alérgicas son una prueba para ver si reaccionan con cualquiera de los péptidos. Péptidos que muestran reactividad después serán de nuevo evaluados para la inhibición de unión de la IgE nativa a la proteína entera. Cuanto más fuerte sea la inhibición de anticuerpos más probable que el péptido represente un epítopo del antígeno, o en el caso de los anticuerpos IgE, un alérgeno.

Los epítomos conformacionales se pueden demostrar por la capacidad de los anticuerpos a unirse a las proteínas que ocurren naturalmente y no a las proteínas desnaturalizadas o dañadas. Sachs et al(2) hábilmente demostró que 2 péptidos que solo eran estructuras desordenadas o random coils no unían anticuerpos del suero inmune. Sin embargo, cuando se mezclaron en la solución de péptidos pudo demostrarse que se complementan entre sí y forman una estructura secundaria, uniendo anticuerpos de antisuero. Estos anticuerpos tienen un sitio de unión que requiere de una estructura tridimensional específica de antígenos para reaccionar. Se ha estimado que hasta un 90% de todos los anticuerpos son de tipo conformacionales(3,4). En un informe, la inmunización en PBS (disolución salina tamponada con sulfato) sin adyuvante, similar a la exposición natural, provocó anticuerpos ante los determinantes conformacionales del inmunógeno los cuales reaccionaron mal con el inmunógeno desnaturalizado. También se ha demostrado que se requiere de determinantes conformacionales para iniciar una respuesta de alergia a los alimentos, y puede romper la tolerancia en los pacientes que han superado la enfermedad.

En un estudio reciente con mosaico, los alérgenos creados genéticamente(7), el suero aglutinante de pacientes alérgicos al alérgeno nativo se redujo en un promedio del 86,5% (intervalo: 65,4 a 96,4% de reducción) en la prueba con un mosaico de proteína. Se creó un mosaico genético de proteína para romper el ADN de la proteína original en 4 piezas diferentes, cada una aproximadamente la cuarta parte de la proteína original y ensamblada en una estructura de ADN que se transcribió en una sola proteína. Este mosaico de proteína tenía la misma composición de aminoácidos, y cada secuencia del péptido fue la misma que la proteína nativa. Sin embargo, la proteína del nuevo mosaico tenía los péptidos fuera de orden. La estructura del mosaico probablemente posee una estructura tridimensional diferente de la proteína nativa, pero tiene muchas partes lineales idénticas a la proteína. El suero aglutinante inferior de 28 donantes alérgicos a la proteína nativa apoya la importancia de los determinantes conformacionales para detectar IgE pertinentes.

Los alérgenos utilizados en ensayos de IgE específica se tratan de diversas maneras. Alérgenos en fase sólida pueden ser adsorbidos pasivamente en una superficie de plástico, como el poliestireno, o unidos covalentemente a una matriz como la celulosa. Se ha demostrado claramente que la adsorción en fase sólida sobre superficies de plástico desnaturaliza las proteínas(8,9). La unión del alérgeno químico a la celulosa también ha demostrado que desnaturaliza las proteínas y reduce la inmunoreactividad. En contraste, la biotinación de proteínas se ha demostrado que mantiene la conformación de la proteína natural y tiene 20 a 30 veces la inmunoreactividad de un alérgeno de fase sólida(5,10).

Figura 3 Representación de la desnaturalización de las proteínas, como ocurre en las fases sólidas que se utiliza para las pruebas de alérgeno



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

La unión no específica (sigla en inglés NSB), en un inmunoensayo es la cantidad de señal positiva creada por una muestra negativa. En el diseño de ensayo cuanto más bajo (fondo) mejor la capacidad para detectar pequeñas cantidades de analito, que es alérgeno IgE específica en estos ensayos. Los alérgenos líquidos tienen muy baja la unión no específica en contraste con los alérgenos en fase sólida que tienen un volumen de matriz asociada con la proteína unida covalentemente. Matrices, como la celulosa tienen fondo de adherencia más alto, lo que reduce la sensibilidad analítica de la prueba y puede atrapar agregados o complejos inmunes que pueden estar presentes en el suero de un paciente(9). Complejos inmunes Anti-IgE - IgE se han detectado en los pacientes con asma, con urticaria crónica, dermatitis atópica, varias enfermedades autoinmunes e incluso en pacientes normales(11,12,13). Estos inmunocomplejos pueden aumentar el entrecruzamiento debido a los efectos de cooperación de los sistemas de fase sólida.

Varios informes han demostrado las ventajas de los alérgenos en fase líquida sobre alérgenos en fase sólida. En un informe(10) Aalberse et al., demostró que gramo por gramo de alérgenos de fase en líquido une 20 a 30 veces más que el mismo alérgeno en fase sólida. Cuando se compara con un ensayo de IgE específica comercial, la fase líquida, une más IgE que los alérgenos de fase sólida correspondientes al kit comercial. En otro informe(15) 2 de 3 pacientes alérgicos a la leche, que tenían IgE específica frente a beta-lactoglobulina, una proteína de la leche, unieron más IgE al alérgeno de fase líquida que a una forma de fase sólida del mismo alérgeno. Los alérgenos líquidos preservan los epítomos importantes para detectar la IgE en suero alérgico.

El alérgeno de la IgE específica se encuentra en muy bajas concentraciones en el suero y el ensayo de sensibilidad *in vitro* es muy importante para el rendimiento clínico. Como resultado de ello, la unión no específica baja es un atributo importante en cualquier ensayo. La IgE específica de Allermatrix tiene una sensibilidad analítica de 0,05 kU / L en comparación con los ensayos destacados de fase sólida disponibles en el mercado que tienen una sensibilidad analítica de 0,11 kU / L.

Otro tipo de reacciones adversas a proteínas puede estar relacionado con las muestras. En un estudio, el principal ensayo comercial en fase sólida en el mercado se comparó con la prueba de la piel entre 53 alérgenos diferentes en 131 pacientes con rinitis crónica cuyo nivel de IgE total se había determinado. Uno de los hallazgos fue que los pacientes con una IgE total > 200 kU / L (IgE total alta) tenían un promedio más alto *in vitro* que la prueba cutánea de resultados positivos por paciente, 26,5 vs 21,5, respectivamente. En el grupo de pacientes con niveles de IgE total <200 kU / L (IgE total baja), *in vitro* tenían un promedio de 8,3 y en las pruebas de piel 15,3 con resultados positivos por paciente. En 52 de 53 alérgenos probados, estadísticamente se hallaron mucho más positivos en resultados *in vitro* en pacientes con IgE total elevada que IgE total baja. Sólo 14 de los alérgenos demostraron la misma diferencia significativa entre los pacientes de alto y bajo IgE total cuando se evaluaron mediante pruebas de la piel. No se esperaba un aumento en el 98% de los alérgenos vinculantes debido a la IgE total elevada. Los autores sugirieron que los pacientes podían tener IgE circulante que no es clínicamente reactiva en la piel. Otra explicación puede ser que el sistema de celulosa en fase sólida no funciona correctamente cuando los pacientes alérgicos tienen niveles elevados de IgE total.

Como se mencionó anteriormente, los complejos inmunes de anti-IgE - IgE a menudo están presentes en el suero de pacientes con varias enfermedades alérgicas, y se ha demostrado que cuanto más alto es el nivel de IgE total, es más probable se que formen(17). Dado que estos complejos inmunes son susceptibles a ser capturados por las matrices de fase sólida, se puede deducir que el aumento en la tasa de positividad *in vitro* con sistemas de celulosa en fase sólida no se debe al aumento de IgE específica, sino que la IgE no es específica para el alérgeno probado. En este estudio, el comportamiento de los sistemas de celulosa en fase sólida no es coherente con el rendimiento de pruebas cutáneas y parece más probable que se deba a una característica inherente del sistema porque el 98% de los alérgenos puestos a prueba exhibieron este comportamiento. Los sistemas de alérgeno líquido no son susceptibles a este problema porque no hay matriz para sostener la IgE específica ligada.

Ensayos de alérgenos líquidos tienen ventajas prácticas y técnicas sobre los ensayos de fase sólida. En sí los alérgenos líquidos permiten aplicaciones automatizadas no disponibles para los sistemas de fase sólida, los cuales reducen notablemente los errores de manejo. Técnicamente, tienen más sensibilidad analítica, unión baja no específica y conservan la conformación natural de los alérgenos. Clínicamente, los alérgenos líquidos miden con relevancia anticuerpos contra epítomos conformacionales. Conjuntamente todos los inmunoensayos de alérgeno líquido ofrecen a los médicos la información más fiable disponible para apoyar el diagnóstico de alergia.

## Referencias

- <sup>1</sup> Wide, L, et al. *Lancet*, 2(7526):1105-7, 1967
- <sup>2</sup> Sachs, D.H. et al., *PNAS*, 69:3790, 1972
- <sup>3</sup> Barlow, D.J. et al., *Nature*, 322:747, 1986
- <sup>4</sup> Ho, J. et al, *Vaccine*, 20:1169, 2002
- <sup>5</sup> Paus, D, and Winter, G, *PNAS*, 103:9172, 2006
- <sup>6</sup> Untermayr, E and E. Jensen-Jarolim, *Pharmacology and Therapeutics*, 112:787., 2006.
- <sup>7</sup> Ball, T, et al. *Allergy*, 64:569, 2009
- <sup>8</sup> Kilshaw, P.J., et al., *Clin. Exp. Immunol.* 66:481, 1986
- <sup>9</sup> Butler, JE, *Methods*, 22:4,2000
- <sup>10</sup> Aalberse, R.C, et al., *J. Immunol. Methods*, 87:51, 1986
- <sup>11</sup> Huber, A et al. *Int Arch Allergy Immunol.* 115:67, 1998
- <sup>12</sup> Ritter, C et al. *J Allergy Clin Immunol.* 88:793, 1991
- <sup>13</sup> Marone, G et al. *Clin Exp Allergy.* 29:17, 1999
- <sup>14</sup> Ehrlich, PH, et al. *J. Immunol.* 131:1906, 1983
- <sup>15</sup> Jylhä, S et al. *J. Immunol. Methods*, 350:63, 2009
- <sup>16</sup> Dolen, WK et al. *Annals of Allergy*, 69: 151, 1992
- <sup>17</sup> Scheuer, A. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 96:271, 1991



[www.allermetrix.com](http://www.allermetrix.com)  
Phone: +1-615-599-4100