

Detección de IgE específica.

Una forma de identificar los alérgenos responsables de los síntomas alérgicos es la detección de anticuerpos IgE específicos frente a dichos alérgenos. Estos anticuerpos están presentes en el suero o plasma de los pacientes alérgicos. Para su identificación En el Servicio de Alergia del Hospital La Fe se utiliza un autoanalizador (**ImmunoCAP®**, ThermoFisher-Phadia), que permite realizar un ensayo *in vitro* cualitativo y semicuantitativo. Esta técnica se utiliza exclusivamente para el diagnóstico clínico en enfermedades alérgicas mediadas por IgE.



Figura 1. Immuncap, Phadia®250

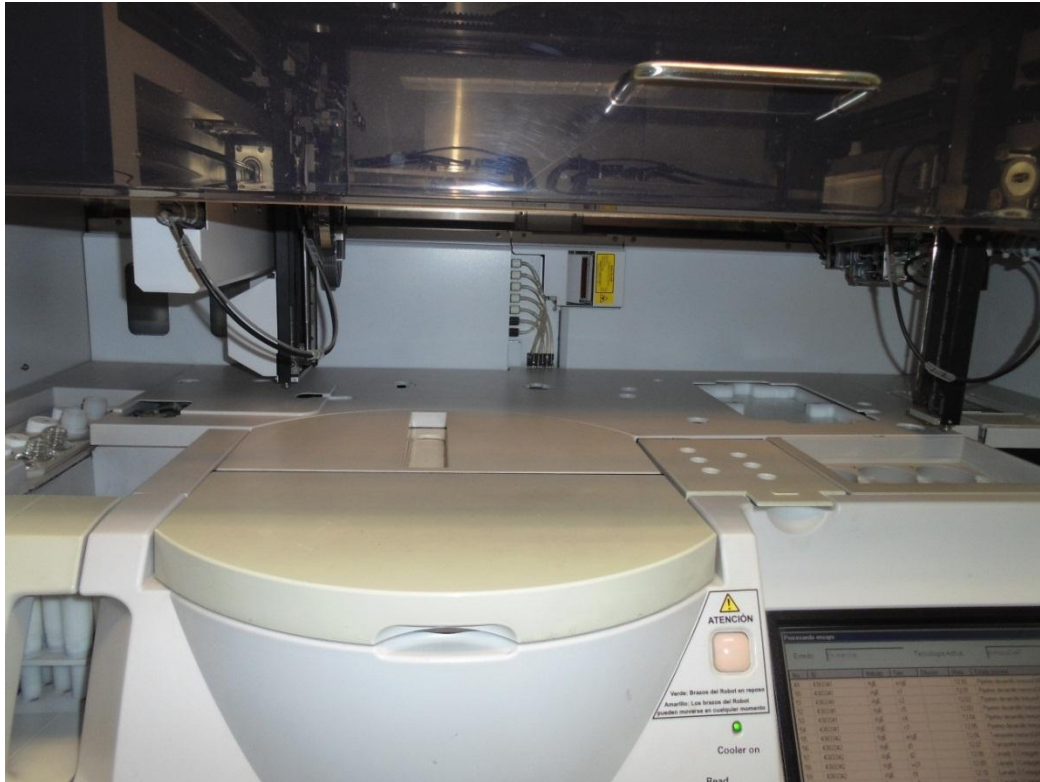


Figura 2. Imagen del contenedor refrigerado de los reactivos alérgicos del autoanalizador Immunocap, Phadia®250.

Procedimiento

Se utilizan muestras de suero o plasma (con EDTA o heparina) de sangre venosa o capilar. Las muestras pueden mantenerse a temperatura ambiente sólo mientras estén siendo manipuladas o a 2°-8°C durante una semana como máximo. Si se van a procesar a más largo plazo deben congelarse a -20°C.

Tan sólo se necesitan 40µl de suero para la realización de cada test (determinación de los niveles de IgE específica para un alérgeno concreto) y se pueden realizar múltiples determinaciones para cada muestra.

Los tubos con las muestras de suero o plasma se introducen en el autoanalizador por medio de una gradilla. Los alérgenos, acoplados a una fase sólida, se conservan en el interior refrigerado del autoanalizador. Un sofisticado software permite programar los tests a realizar a cada paciente, de forma que el proceso y el cálculo de los resultados se realizan de manera completamente automatizada.



Principio del test ImmunoCAP®

Esta tecnología se basa en una capacidad de unión extremadamente elevada entre los alérgenos fijados a la fase sólida y los anticuerpos IgE específicos presentes en el suero del paciente. Esto se consigue gracias a una alta capacidad de unión del alérgeno por miligramo de celulosa de la fase sólida, que garantiza la unión de todos los anticuerpos relevantes, independientemente de su afinidad (puesto que en ocasiones los anticuerpos se unen de forma débil o no específica a los alérgenos).

La fase sólida de ImmunoCAP® consiste en un derivado de celulosa que se introduce dentro de una cápsula (“cap”). El polímero hidrofílico altamente ramificado proporciona un microambiente ideal para los alérgenos, que se unen de forma irreversible, al mismo tiempo que mantienen su estructura original.

El test está diseñado como un inmunoensayo ELISA tipo sandwich.

Los alérgenos unidos de forma covalente a la fase sólida, reaccionan con la IgE específica en la muestra de suero del paciente.

Después de eliminar la IgE no específica, se añaden los anticuerpos anti-IgE marcados con enzimas.

Después de la incubación, los anticuerpos anti-IgE que no se han unido a la IgE, se eliminan por medio de un lavado. Se detiene la reacción, por medio de una solución y se mide la fluorescencia. Cuanto más elevada sea la fluorescencia, más IgE específica habrá en la muestra.

El proceso se puede seguir a través del monitor del autoanalizador.

No.	ID	Método	Test	Dilución	Hora	Estado proceso
49	4383341	tlgE	a-IgE		12:00	Pipeteo desarrollo ImmunoCAP
50	4383341	slgE	c1		12:01	Pipeteo desarrollo ImmunoCAP
51	4383341	slgE	c2		12:02	Pipeteo desarrollo ImmunoCAP
52	4383341	slgE	c5		12:03	Pipeteo desarrollo ImmunoCAP
53	4383341	slgE	c6		12:04	Pipeteo desarrollo ImmunoCAP
54	4383341	slgE	c7		12:05	Pipeteo desarrollo ImmunoCAP
55	4383342	tlgE	a-IgE		12:06	Transporte ImmunoCAP
56	4383342	slgE	d1		12:07	Transporte ImmunoCAP
57	4383342	slgE	d2		12:08	Lavado 3 Conjugate
58	4383342	slgE	w21		12:09	Lavado 3 Conjugate
59	4383342	slgE	r9		12:10	Lavado 2 Conjugate
60	CC-1	Tryp	aTryp		12:11	Lavado 2 Conjugate
61	CC-1	Tryp	aTryp		12:12	Lavado 2 Conjugate
62	4383783	Tryp	aTryp		12:13	Lavado 2 Conjugate
63	4383343	slgE	p1		12:14	Lavado 2 Conjugate
64	4383343	slgE	r25		12:15	Lavado 2 Conjugate

Figura 3. Imagen de la pantalla de ImmunoCAP Phadia®250 durante el procedimiento de análisis de IgE específica.

Cálculo de resultados

En los ensayos se incluye una curva de calibración que permite conocer la cantidad de IgE detectada frente a cada alérgeno mediante un software incluido en el autoanalizador, de forma que los resultados se pueden expresar cuantitativamente (en kUA de IgE por litro).

Aplicaciones:

Phadiatop®

Por medio del mismo autoanalizador se pueden realizar también determinaciones de IgE específica frente a mezclas de alérgenos, como es el caso de la prueba de Phadiatop®, utilizada como técnica de despistaje para pacientes alérgicos. Los resultados se pueden expresar cualitativamente o semicuantitativamente. En los resultados de Phadiatop® semicuantitativo, las unidades de respuesta se evalúan frente a la curva de calibración de la IgE específica y se expresan en PAU/L (Unidades Arbitrarias Phadia®/L), indicando el grado de sensibilización. PAU se definen como unidades arbitrarias de IgE específicas, no equivalentes a kUA de IgE específica. Para una evaluación cualitativa con Phadiatop®, los resultados se expresan como



positivos o negativos, considerando como positivo un nivel de IgE específica > 0,35 kU/L (es el punto de corte habitualmente utilizado).

Resultados semicuantitativos

Un valor de Phadiatop® PAU por debajo del límite de cuantificación indica que el paciente es no atópico (negativo), el nivel de anticuerpos IgE específica es indetectable. Valores altos de Phadiatop® PAU/l indica un alto grado de sensibilización, niveles altos de anticuerpos IgE específica frente a alérgenos comunes.

Resultados cualitativos

Los resultados de Phadiatop® se expresan como positivo o negativo. Un resultado Phadiatop® positivo indica que el paciente es atópico, un resultado Phadiatop® negativo indica que el paciente es no atópico, es decir, no sensibilizado a alérgenos comunes.

Ventajas e inconvenientes de Phadiatop®

En cuanto a las ventajas, es una prueba más sensible que la IgE total para la identificación de pacientes alérgicos. Los niveles de IgE total varían con la edad y pueden estar influidos por otras circunstancias además de los procesos alérgicos (los parásitos, el alcohol y algunas enfermedades hematológicas, pueden elevar los niveles de IgE total).

Al tratarse de la detección de IgE específica frente una mezcla de alérgenos, pueden producirse falsos negativos, si el paciente a estudiar está sensibilizado a un alérgeno no frecuente (no representado en la fase sólida).

Si el resultado es positivo, es necesario ampliar el estudio con el fin de identificar los alérgenos responsables de la sintomatología.

IgE frente a componentes alérgicos

Mediante la misma tecnología de Immucap®, también es posible detectar la presencia de anticuerpos IgE específicos frente a los componentes moleculares presentes en las diversas fuentes de alérgenos. Los componentes moleculares alérgicos son habitualmente las proteínas responsables de la reactividad frente a los anticuerpos IgE. Algunas de estas proteínas son específicas de algunas fuentes alérgicas (por ejemplo, la caseína en la leche) y



en otros casos se trata de proteínas que pueden estar presentes en múltiples fuentes alérgicas (por ejemplo, las profilinas, que pueden estar presentes en alimentos, pólenes o látex).

Gracias a la detección de anticuerpos IgE frente a los componentes moleculares de los alérgenos, podemos identificar con más exactitud los agentes responsables de los síntomas alérgicos, especialmente en los cuadros clínicos complejos, que habitualmente son frecuentes, así como orientar mejor su tratamiento.

Belén García Lorenzo
Ramón López Salgueiro
Dolores Hernández F. de Rojas
Servicio de Alergia
Hospital La Fe, Valencia