

Nuevas Técnicas de diagnóstico molecular en alergología

Ruperto González Pérez

Alergólogo, Hospital Universitario de Canarias

.....

Las fuentes alergénicas (alimentos, polenes, ácaros,...) están compuestas por múltiples proteínas, cada una de las cuales son potencialmente capaces de inducir una reacción alérgica por sí misma. En los últimos años se han realizado importantes esfuerzos con el fin de detectar los componentes alergénicos presentes en las diferentes fuentes alergénicas. Estas investigaciones han conducido a identificar sensibilizaciones a componentes que pueden estar presentes en múltiples fuentes alergénicas y que justificarían cuadros clínicos complejos, que habitualmente son frecuentes. El establecimiento de patrones de sensibilización a componentes alergénicos específicos y un mejor conocimiento de la reactividad cruzada han contribuido de manera fundamental a un mejor diagnóstico y tratamiento.

Mejoras en la identificación, aislamiento y purificación de gran número de alérgenos de diverso origen así como la aplicación de la tecnología DNA recombinante al campo de la Alergología para la producción biotecnológica de alérgenos de elevada pureza y calidad consistente lote a lote, de forma que el uso de alérgenos purificados, naturales o recombinantes, supone un salto de calidad real en la Alergología clínica. La combinación de estos avances de la biología molecular con los producidos en la nanotecnología ha permitido el desarrollo de nuevas tecnologías, entre las que se encuentran las denominadas micromatrices o microarrays. El microarray de proteínas permite la detección de IgE específica frente a múltiples moléculas de forma simultánea, posibilitando el denominado diagnóstico molecular o diagnóstico por componentes (component-resolved diagnosis CRD), que tiene un interés especial en el diagnóstico de alergia alimentaria así como en el diagnóstico de precisión de pacientes polisensibilizados. El primer ensayo experimental de micromatrices aplicado a alergia fue publicado en el año 2000. El término *Component resolved diagnosis* (CRD) acuñado por el grupo de Valenta en Austria al final de los años noventa abre una nueva etapa en el concepto diagnóstico e inmunopatológico de la alergia. Esta técnica

se realiza con el kit comercial ImmunoCAP ISAC® sIgE 112. Es un inmunoensayo de fase sólida. Los componentes alergénicos (más de 100) son inmovilizados en un sustrato sólido en formato de micromatriz (portaobjetos) y reaccionan con la IgE específica existente en la muestra del paciente. Bastan 30µl de suero o plasma por paciente para realizar la prueba en 112 pocillos.

Aquellos componentes que reaccionan con el suero del paciente son detectados por un anticuerpo secundario (Anti-IgE humana) marcado con un fluorocromo. El procedimiento va seguido de la medida de la fluorescencia mediante un escáner de micromatriz. Cuanto más elevado sea el valor de respuesta, más IgE específica habrá en la muestra. Los resultados de la prueba se analizan con el software Phadia Microarray Image Analysis (MIA) y se calculan unidades estandarizadas ISAC para IgE específica (ISU-E).

El uso de un panel adecuado de alérgenos purificados, naturales o recombinantes, permite mejorar las técnicas diagnósticas tradicionales de detección de IgE específica basadas en el uso de extractos completos en cuanto a reproducibilidad y estabilidad, especialmente en el caso de los alimentos vegetales con bajo contenido proteico, y que poseen actividad enzimática que degrada los alérgenos. El CRD nos va a permitir identificar los patrones individuales de sensibilización frente a diferentes proteínas de una misma fuente alergénica, con la posibilidad de identificar:

- Patrones de sensibilización según el área geográfica.
- La sensibilización a proteínas asociadas a un mayor riesgo de reacciones graves, como las proteínas transportadoras de lípidos ("lipid transfer proteins": LTP).
- Sensibilización a proteínas homólogas en diferentes fuentes alergénicas con posible implicación en fenómenos de reactividad cruzada.

- Indicar de forma precisa una inmunoterapia hiposensibilizante.

La tecnología de los microarrays constituye por tanto un avance importante en el diagnóstico de la alergia, nos permite establecer un diagnóstico molecular preciso, conocer los patrones de sensibilización que presenta un paciente con las diferencias propias según el área geográfica a la que pertenece y detectar sensibilización a moléculas responsables de síndromes de reactividad cruzada. Una clara indicación de esta herramienta es en el estudio del paciente polisensibilizado y en la indicación precisa de una inmunoterapia.

Por otra parte y tal y como apuntan algunos autores existen algunas limitaciones en la técnica, tales como la composición del panel de alérgenos, que puede no ser el más adecuado para algunas áreas geográficas. Por otra parte la evaluación de la sensibilidad, especificidad y puntos de corte para cada alérgeno, en series de pacientes verdaderamente alérgicos y en controles para cada proteína representada en el microarray, constituye una necesidad real para poder situar a esta prometedora herramienta en su justo lugar en el diagnóstico alergológico en general y en el de la alergia alimentaria en particular. No debemos olvidar que todos los test *in vitro* deben ser evaluados junto con la historia clínica del paciente, ya que una sensibilización (detectada *in vitro* por la presencia de anticuerpos IgE específicos) no implica necesariamente una respuesta clínica frente a dichos alérgenos.

Nota. Resumen de la ponencia presentada en el Curso de Primavera de la Sociedad Canaria

de Pediatría de Santa Cruz de Tenerife. Marzo de 2018

Bibliografía

1. Poulsen LK, Pedersen MH, Dufva M. Allergology on a chip. *Clin Exp Allergy* 2007; 37:1736-1737
2. Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Gronlund H. The recombinant allergenbased concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy* 1999; 29:896-904
3. Sanz Larruga ML. Repercusiones clínicas del diagnóstico molecular en alergia. En: *Alergoaragón, ponencias de la edición 2013*
4. Wiltshire S, O'Malley S, Lambert J, Kukanskis K, Edgar D, Kingsmore SF et al. Detection of multiple allergen-specific IgEs on microarrays by immunoassay with rolling circle amplification. *Clin Chem* 2000; 46:1990-1993
5. González-Pérez R, Poza-Guedes P, Pineda F, Matheu V, Sánchez-Machín MI. Patterns of IgE sensitization to *Dermatophagoides pteronyssinus* in persistent allergic rhinitis from subtropical Tenerife, Spain. *J Allergy Clin Immunol* 2018 (aceptado para publicación en febrero de 2018)
6. Krause S, Reese G, Randow S, Zennaro D, Quarantino D, Palazzo P et al. Lipid transfer protein (Ara h 9) as a new peanut allergen relevant for a Mediterranean allergic population. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124:771-778
7. Salcedo G, Diaz-Perales A. Component-resolved diagnosis of allergy: more is better? *Clin Exp Allergy* 2010; 40:836-838

