

Diagnóstico in vitro de alergias tipo I, Detección de anticuerpos tipo IgE específico en contra alérgenos del ambiente y comidas. (Inhalantes y alimentos).

Prof. Lic. Noel Silva+*, Lic. Natacha Camacho*, Lic. Nirsén García*, Lic. María Gabriela Bastidas.*

Las alergias representan actualmente un grupo de patologías de gran prevalencia en nuestro país. Aproximadamente el 20-30% de la población padece de algún tipo de alergia. En el año de 1964 fueron detectadas por primera vez las Inmunoglobulinas de clase E (IgE). Las mismas juegan un rol muy importante en el desarrollo de las reacciones alérgicas, especialmente en aquellas que se han clasificado dentro del tipo I.

Producción de anticuerpos tipo IgE:

Luego de su transformación en "células plasmáticas", los linfocitos B, secretan varios anticuerpos, estos circulan por el organismo y son responsables de la inmunidad de tipo humoral. La transformación de los linfocitos B a células plasmáticas está regulada por células "helper" y células supresoras. Si este mecanismo de regulación falla por alguna razón idiopática, un antígeno inofensivo, inocuo y frecuente, puede originar la transformación de un linfocito B en una célula plasmática. Luego, esta célula producirá IgE en contra de ese antígeno.

La unión de las IgE al antígeno relevante (alérgeno), causa la liberación de varios mediadores citoquímicos de alta efectividad por los mastocitos (entre ellos, la histamina). Estos mediadores son responsables de los síntomas típicos de las reacciones alérgicas tales como urticaria, dermatitis, rinitis, fiebre del heno, asma y choque anafiláctico.

anticuerpos específicos de la clase E (anticuerpos IgE) en contra del mismo. Cuando el contacto con la sustancia o antígeno desencadenante se repite, los anticuerpos IgE reaccionan con el alérgeno y conducen a la liberación de mediadores como la histamina, leucotrienos, prostaglandinas, entre otros, los que por su parte conducen a los síntomas asociados con la alergia.

Alergias tipo I:

Dentro de la clasificación actual de las alergias, se ha establecido que aquellas mediadas por anticuerpos de tipo IgE, se denominan "Alergias Tipo I", sin embargo es importante conocer que no toda reacción de hipersensibilidad en un paciente, corresponde a este mecanismo, y que por lo tanto hay que investigar la ocurrencia de otros tipos de reacciones alérgicas, distintas a las mediadas por la IgE, como aquellas mediadas por células (reacciones tipo IV), pseudoalergias, entre otras.

Con la detección de estos anticuerpos específicos de IgE en el suero es posible identificar los alérgenos desencadenantes de reacciones de hipersensibilidad alérgicas, siempre y cuando el individuo haya estado en contacto previo con la sustancia en cuestión en el transcurso de su vida reciente.

Históricamente el diagnóstico de las Alergias tipo I ha sido realizado en base a la historia clínica del paciente y las pruebas de piel y/o de provocación con las sustancias sospechosas alérgicas; empero, desde finales de los setenta se han desarrollado técnicas de laboratorio para medir los anticuerpos de tipo IgE Específico en el suero de los individuos (diagnóstico *in vitro*).

Determinación de IgE específica sérica:

Para el diagnóstico *in vitro*, el ensayo inmunoquímico (EIA) es una herramienta de gran utilidad para la determinación cuantitativa de anticuerpos de IgE específicos en el suero sanguíneo humano y/o animal. El test se debe realizar para la confirmación de una alergia a la luz de la historia clínica y/o del diagnóstico por pruebas de piel (*in vivo*). También como esclarecimiento en aquellos casos en donde los resultados de las pruebas de piel no son coincidentes con la anamnesis.

Las pruebas *in vitro* para determinación de IgE Específica se han denominado históricamente con los acrónimos RAST o EAST dependiendo del método de detección utilizado. (Radio o Enzyme Allergo Sorbent Test). Si bien las pruebas *in vitro* no sustituyen a las pruebas *in vivo* (skin prick test), se ha demostrado que pueden ser complementarias y de gran ayuda en el diagnóstico de Alergias tipo I, especialmente en algunas situaciones como las que se enumeran a continuación:

1. Niños inquietos o que características particulares que puedan impedir la realización de pruebas de piel.
2. Pacientes con dermatogramas o hipersensibles.
3. Pacientes con tratamiento antihistamínico.
4. Venenos de insectos.
5. Pacientes nerviosos.
6. Las sustancias alimenticias que son de difícil ensayo en pruebas de piel.
7. Pacientes en donde los mastocitos se ubican muy profundamente en la piel.

El fundamento básico de las pruebas inmuno-enzimáticas de determinación de IgE específica, es la sensibilización o impregnación de diversos tipos de soportes (sólidos y/o líquidos) con extractos purificados de las sustancias "alérgicas" (Antígeno) a investigar, y su posterior enfrentamiento con el suero del paciente en cuestión; en el caso de encontrarse anticuerpos de tipo IgE específicos a dicha sustancia, se producirá en el complejo inmune respectivo, que posteriormente podrá ser detectado y cuantificado mediante la técnica de EIA.

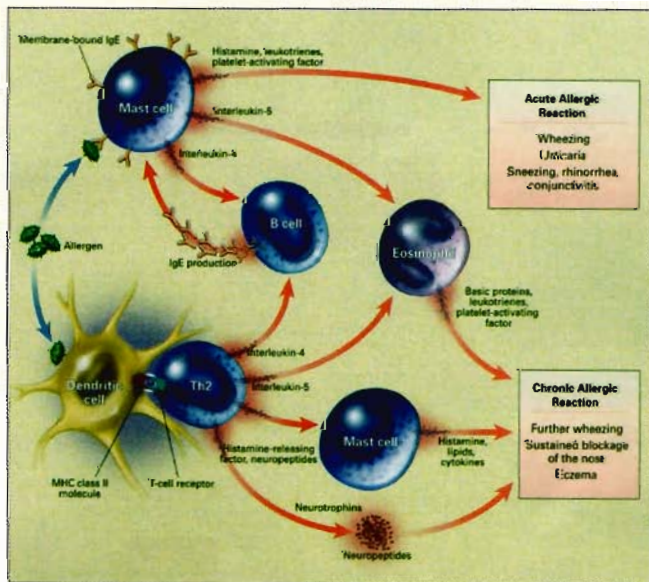


Figura 1.: Fisiopatología de la reacción alérgica mediada por IgE (Tipo I).

A todas las reacciones alérgicas les ha precedido igualmente un primer contacto asintomático con el alérgeno o antígeno en cuestión, en el cual se forman

* Cátedra de pasantías hospitalarias, Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina, + Universidad Central de Venezuela. Laboratorio de Producción y Control de Calidad, Corpodiagnostica, C. A., Caracas, Venezuela. Email: laboratorio@corpodiagnostica.com

Como ejemplo, a continuación presentamos el fundamento de la técnica Allergy Screen Immunoblott (r-Biopharm, Alemania), el cual es un método cuyo soporte es sólido y el método de detección es enzimático:

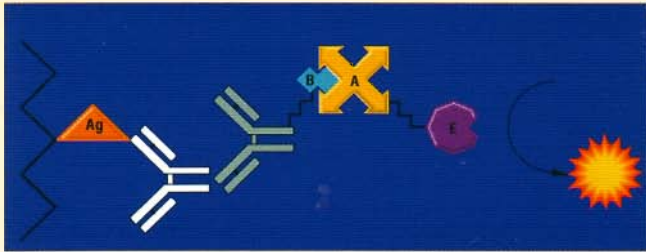


Figura 2: Determinación de IgE específica en fase sólida, Allergy Screen Immunoblott (R-Biopharm, Alemania).

1. Los anticuerpos IgE específicos del suero se fijan a los antígenos (Ag) alergénicos impresos en la membrana del test.
2. El anticuerpo conjugado detector (B), se une a las IgE específicas fijadas.
3. El anticuerpo enzimático (A) se une a (B) y en presencia del sustrato se forma una banda color morado, cuya intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de IgE fijada.

Por razones de espacio, en la presente monografía no explicaremos los soportes en medio líquidos, por lo que recomendamos a los lectores interesados investigar en otras bibliografías para su conocimiento particular.

Consideraciones acerca de los soportes y métodos de detección usados en la determinación de las concentraciones de IgE específico en suero. Se entiende por soporte, el medio (sólido o líquido) en el cual son sensibilizados (fijados) los componentes o sustancias alergénicas, en los ensayos de determinación de IgE o IgG específica en suero.

Tipos de soportes sólidos utilizados para determinación de IgE específica:

1. Celulosa.
2. Nitrocelulosa.
3. Plástico.
4. Otros.

Las sustancias alergénicas poseen diferentes epítopes en su estructura molecular, que pueden generar uniones con anticuerpos específicos en contra de las mismas.

Por ejemplo, el alérgeno "leche", es realmente una mezcla de epítopes, dentro de los cuales se incluyen antígenos individuales de relevancia como la caseína, la alfa-lactoalbumina, beta-globulina y otros.

En el suero de individuo pueden existir distintos factores inmunológicos diferentes a los anticuerpos de tipo IgE específico, que se pueden unir a los distintos epítopes presentes en las sustancias alergénicas fijadas en los soportes utilizados por el método.

Por ejemplo existen anticuerpos de tipo Inmunoglobulina G, (IgG específicos), que también se pueden unir a las sustancias alergénicas analizadas, así como también algunas uniones inespecíficas, presentes en cualquier reacción inmunológica a nivel molecular.

Queda claro que se producirá una competencia entre los anticuerpos IgE y los otros factores antes mencionados, para unirse a los epítopes presentes en el soporte, lo cual se traduce en una disminución cuantitativa de los sitios de unión molecular para la IgE presente en el suero del paciente.

De lo anterior se desprende que **es muy importante proporcionar soportes con el tamaño y porosidad adecuados en donde se pueda garantizar suficientes sitios de unión para los extractos alergénicos, de forma de garantizar la mayor presentación posible de epítopes para la unión con los IgE específicos que estén presentes en el suero del paciente**, y se logre disminuir entonces el efecto del fenómeno de competencia que se produce con los anticuerpos IgE y otros anticuerpos y/o factores inespecíficos presentes en la muestra, mejorando la sensibilidad analítica de la técnica. Por ejemplo: Un paciente sensible a la caseína, con una mediana concentración de anticuerpos IgG en contra la leche, podría generar que la IgE (que fisiológicamente se encuentra en mucho menor concentración que la IgG), no

encuentre suficientes sitios de unión en el ensayo, lo cual se traduciría en un resultado bajo o indetectable de IgE específico, a una sustancia que realmente le podría estar causando una alergia tipo I. (Falso Negativo).

Existen diversos tipos de reveladores o marcadores, que se utilizan en los inmunoensayos para determinar la cantidad del analito en cuestión, presente en la muestra.

Por ejemplo: Enzimas (ELISA), < Quimioluminiscencia, < Fluorescencia (ordenado de menor a mayor sensibilidad o capacidad de detección). Dependiendo de la sustancia que se desee determinar, un marcador puede ser más útil que otros. Normalmente los marcadores fluorescentes y quimioluminiscientes, son más costosos, y requieren de instrumentación dedicada para su elaboración, pero son los que proporcionan una sensibilidad o capacidad de detección mayor, por eso se utilizan en muchas sustancias de baja concentración sérica como por ejemplo algunas hormonas, antígenos de agentes infecciosos, etc.

Sin embargo cuando el soporte es suficientemente grande (espacio físico en donde está sensibilizado el alérgeno), y el sustrato enzimático utilizado es de alta sensibilidad (por ejemplo p-NPP o BCIP / NBT,) se puede lograr una detección adecuada de los niveles de IgE específica en suero humano. Ej. R-Biopharm RIDASCREEN o Allergy Screen.

En el caso de la sensibilidad de detección de los reveladores enzimáticos más frecuentemente utilizados en inmunoensayos, se tiene que: TMB < p-NPP < BCIP / NBT

(Ordenado de menor a mayor sensibilidad o capacidad de detección).

Por el contrario si el soporte posee una superficie pequeña y poco porosa y el sustrato enzimático usado es de media sensibilidad (TMB), es lógico esperar que la sensibilidad del método sea inferior. Ej.: Soportes de fase solida fabricados en material plástico con sustratos enzimáticos basados en TMB. (Ver figura 3).

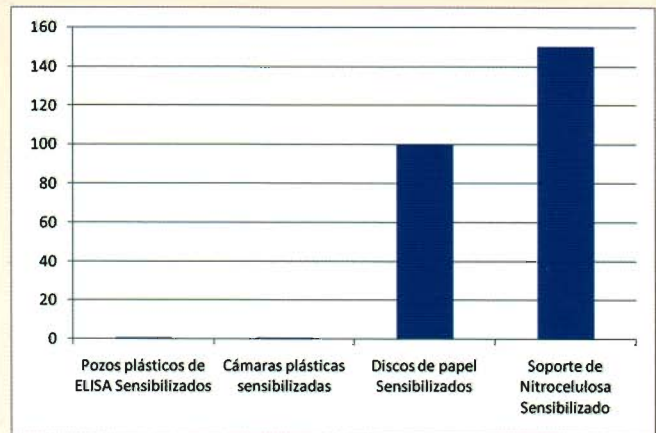


Figura 3: Sensibilidades de los distintos soportes sólidos utilizados en determinaciones de IgE Específica.

Reporte de IgE específica.

Prácticamente todos los organismos recomiendan usar un sistema de clases desde 0 a 6, como ejemplo consideraremos la publicación de la FDA (Food and Drug Administration de USA) vigente para las pruebas de IgE específica: **Radioallergosorbent Test (RAST) Methods for Allergen-Specific Immunoglobulin E (IgE) 510(k); Final Guidance for Industry and FDA Document issued on: August 22, 2001.**

En base a esta guía, y en las recomendaciones de gran número de médicos de nuestro país, recomendamos los siguiente "traducción" de comentarios para mejorar las interpretaciones de las clases antes señalada

Prevalencia de alérgenos (alimentos e inhalantes en Venezuela). Según los resultados analizados en nuestro Laboratorio de Producción y Control de Calidad entre 2007 y 2008, para más de 500 pacientes, las concentraciones de IgE específica más frecuentemente observadas fueron para las siguientes 10 sustancias inhalantes:

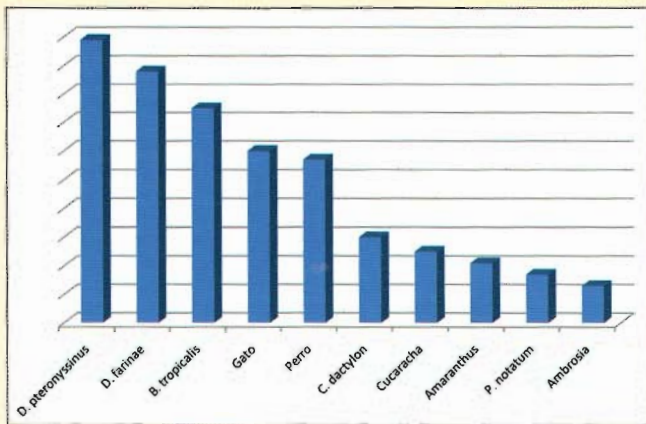


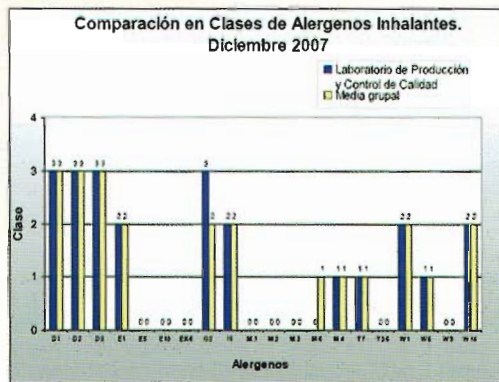
Figura 4.: Prevalencia de los 10 principales Alérgenos inhalantes reportados en las determinaciones de IgE específica en el Laboratorio de Producción y Control de Calidad de Corpodiagnostica, C. A.

En el caso de las comidas, la prevalencia depende de factores como la edad y costumbres alimenticias de la población en estudio, por lo cual es muy difícil establecer un índice general sin embargo, los alérgenos más frecuentemente reportados son: **piña, queso gouda, leche en polvo, cerdo, harina de trigo, maní, maíz, clara de huevo, soya, tomate, naranja, mezcla de mariscos, cangrejo, cebada, camarones y pollo.**

Control de Calidad en determinación de IgE específica:

Aunque la mayoría de los equipos de diagnóstico comerciales que se consiguen en el mercado incluyen sueros de concentración conocida para algunas alérgenos (principalmente para ácaros), es importante el desarrollo de programas de control de calidad externo interlaboratorios, que busquen mejorar la exactitud de las determinaciones reportadas por los laboratorios de bioanálisis.

Nuestro laboratorio implementó en el año 2007 el Primer Programa de Control de Calidad Externo en Venezuela, para la determinación de IgE específica mediante el método inmunoblott Allergy Screen de R-Biopharm Alemania. En el mismo participaron 17 instituciones de salud de todo el país, incluyendo a nuestro laboratorio como un participante más, evaluándose resultados para 20 alérgenos, de un mismo pool de sueros, y controlando todas las variables involucradas (ej. Lote de reactivos, procedimientos, entre otros). Obteniendo los resultados que se presentan a continuación:



Nivel de Evaluación	Nº de Laboratorios por nivel de evaluación
Excelente	1
Adecuado	6
Aceptable	2
Aceptable con observaciones	3
Revisión	5
Nº de Laboratorios participantes	17

Figuras 5 y 6: Resultados del Programa de Control de Calidad Interlaboratorios en diagnóstico de IgE específica, organizados por el Laboratorio de Producción y Control de Calidad de Corpodiagnostica a finales del año 2.007.

La realización del programa permitió detectar oportunidades de mejoras en la ejecución de los procedimientos por parte de los usuarios de cada laboratorio, así como de la instrumentación y componentes utilizados en el desarrollo de la técnica, en aras de mejorar de forma continua la exactitud y variabilidad obtenida por dicha técnica.

Este programa de control de calidad inter-laboratorios se seguirá efectuando de forma semestral, de forma de garantizar la calidad y exactitud de los resultados obtenidos mediante el método inmunoblott Allergy Screen de r-biopharm Alemania.

Conclusiones:

A más de 25 años del inicio de su utilización, las pruebas in vitro aún constituyen un nuevo paradigma dentro del diagnóstico de Alergias tipo I, en donde claramente se visualizan algunas ventajas frente a las pruebas de piel, tales como la estandarización, cuantificación y el procedimiento poco invasivo de las mismas sobre los pacientes.

Sin embargo su objetivo no ha sido ni será sustituir a las pruebas de piel, sino complementar el complejo mundo del diagnóstico de hipersensibilidades de los pacientes que acuden a la consulta de los médicos especialistas en búsqueda de un tratamiento adecuado para su Alergia.

Se considera que aún son necesarios muchos estudios adicionales y el desarrollo de técnicas de laboratorio, cada vez más sensibles y mejor adaptadas a la realidad particular de cada alérgeno ensayado (especialmente en el caso de los alimentos y las drogas terapéuticas) y de los individuos en estudio, de forma de conseguir mejoras en los reportes y por lo tanto tratamientos exitosos que mejoren la calidad de vida de los pacientes.

Bibliografía



Acerca del autor: Noel Silva Domínguez, es licenciado en Bioanálisis con cursos en técnicas inmunológicas y alérgicas realizados en Alemania y Austria. Actualmente se desempeña como fundador y Director General de Corpodiagnostica C. A., Primera empresa proveedora de productos para Diagnóstico Clínico certificada según norma ISO 9001:2000 en Venezuela y profesor contratado de la Cátedra de Pasantías Hospitalarias de la Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Medicina de la UCV. Adicionalmente, realiza investigación en distintas áreas del Bioanálisis, principalmente en Alergia, Sepsis y Gastroenteritis y ha dictado conferencias en dichas áreas en diferentes eventos científicos en Venezuela, Panamá y Alemania.

El Laboratorio de Producción y Control de Calidad de Corpodiagnostica C. A., es un departamento de la organización, dentro de su funciones está la realización de pruebas in vitro para el diagnóstico de Alergia. Actualmente el laboratorio más grande de Venezuela en número de determinaciones anuales de IgE Específica realizados. **Cortesía: Corpodiagnostica, c.a.**



La Revista Bioanálisis felicita al Comité Organizador del XIII Congreso Venezolano de Bioanálisis "Homenaje al Lic. Patricio Quilarche", realizado en la Isla de Margarita del 27 al 31 de Mayo de 2008; integrado por: Lic. Douglas Gutiérrez, Presidente; Lic. Arnoldo Gualdrón, Sec. General; Lic. Ana Michini, Sec. Asuntos Científicos y Docentes; Lic. Oscar Hernández, Sub-Sec. Asuntos Científicos y Docentes; Lic. Yosaida Valdivieso, Sec. Finanzas; Lic. Maritza Herrera, Sub-Sec. Finanzas; Lic. María Isabel Mata, Sec. Relaciones Públicas, Lic. Yumelis González; Sub-Sec. Relaciones Públicas.

Así como también a la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas, la Junta Directiva del Colegio de Bioanalistas del Estado Nueva Esparta y al Comité Ejecutivo de la Federación de Colegios de Bioanalistas de Venezuela FECOBIOVE. Por la realización de éste importante evento, exponiendo Cursos pre-congreso en bacteriología, bioquímica, gerencia y salud, hematología; al igual que su excelente programa científico por especialidad: en bioquímica, hematología, inmunología, educación, gerencia y salud, micología y parasitología, bacteriología.