



Capítulo 2

Diagnóstico molecular

Molecular diagnostics

María del Carmen Jiménez-Martínez,* Henry Velázquez-Soto

RESUMEN

Este capítulo es una amplia revisión de las diversas tecnologías utilizadas en el diagnóstico molecular de alergia, incluye algunas técnicas tradicionales de plataforma única que dieron origen y fundamento a las pruebas moleculares basadas en inmunoensayos múltiples. Los autores discuten la importancia en la obtención, características, ventajas y limitantes de los alergenos utilizados en estas plataformas y por último, se comparan las distintas plataformas, sencillas y múltiples, considerando su sensibilidad y especificidad analítica.

INTRODUCCIÓN

Las pruebas diagnósticas de alergia han evolucionado a la par de la tecnología biomédica y del conocimiento de los componentes alergénicos, de tal forma que han revolucionado el diagnóstico médico. En este sentido podemos **definir el diagnóstico molecular de alergia como el uso de tecnologías basadas en diversas plataformas**, alergenos recombinantes e IgE específicos de epítopos alergénicos que permiten un estudio puntual^{1,2} y en consecuencia, un abordaje médico de precisión. Conocer las tecnologías actuales y sus aplicaciones en el diagnóstico molecular de la alergia es fundamental para tomar una decisión terapéutica basada en evidencias.

1. VALOR DIAGNÓSTICO DE LA IGE

El descubrimiento de la actividad reaginica en la inmunoglobulina E (IgE) por Ishizaka en 1966 generó una revolución en el conocimiento de la alergia que impactó en el desarrollo de diversas herramientas de diagnóstico y tratamiento.³ Usualmente, la concentración sérica de IgE en individuos sanos se encuentra por debajo de 1 µg/mL, ésta es una concentración muy baja de proteínas, por lo que para una correcta medición se han desarrollado diversos métodos que reportan la cantidad de IgE sérica en unidades UI/mL o kUI/L, de tal forma que 1 kUI/L es equivalente a 1 UI/mL y a 2.4 ng/mL.⁴

* Autor corresponsal.

Citar como: Jiménez-Martínez MC, Velázquez-Soto H. Capítulo 2. Diagnóstico molecular. Alergia Asma e Inmunología Clínica y Alergia. 2022; 31 (s1): s42-s56. <https://dx.doi.org/10.35366/108838>

1.1. Fundamento de los métodos diagnósticos *in vitro* de las enfermedades alérgicas

El fundamento de los métodos diagnósticos basados en la detección de anticuerpos depende de la visualización de la reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ab) (*Figura 1*). Es importante recordar que la mayoría de estos métodos se enfocan en la detección de

la IgE, por lo que se utilizan en el diagnóstico de enfermedades alérgicas mediadas por este anticuerpo; sin embargo, no existe limitación técnica para determinar otros isotipos de anticuerpos por las mismas metodologías que serán descritas en este capítulo y más bien su limitación depende de su aplicabilidad clínica, por lo que usualmente se utilizan en investigación las determinaciones de isotipos diferentes a la IgE en el estudio de un paciente alérgico. Bajo esta premisa, es posible identificar y cuantificar la concentración de IgE total (IgE) e IgE específica (IgE) a ciertos alergenos a través de la reacción antígeno-anticuerpo.⁵

En todas las metodologías de detección de anticuerpos, la IgE en el suero del paciente será el antígeno para cuantificar y éste será reconocido a través de un segundo anticuerpo formando un complejo Ag-Ab. Para llevar a cabo estos ensayos, un anticuerpo específico para la fracción Fc de la IgE deberá ser adsorbido a una fase sólida, generalmente en superficies de poliestireno o celulosa. Este anticuerpo es el anticuerpo primario o de captura. Para el caso de la determinación de la IgE se facilita una primera interacción Ag-Ab con el alergeno cuya especificidad se sospecha, también adsorbido a una fase sólida. En ambas determinaciones, IgE o IgE , un anticuerpo secundario o de detección conjugado a distintas moléculas acorde al método usado permitirá la cuantificación de la IgE en la muestra del paciente, por ejemplo, una enzima y un sustrato colorido, quimiluminiscente o fluorescente. De forma simultánea, en todos estos métodos de medición se incluye una curva de calibración que contiene concentraciones conocidas de IgE para poder extrapolar los valores obtenidos en la medición de la muestra, permitiendo reportar las concentraciones detectadas en unidades estandarizadas como ng, μg o UI.^{5,6}

1.2. Evolución de las pruebas diagnósticas en alergia

Actualmente existen múltiples tecnologías de diagnóstico para la identificación de diversos perfiles de sensibilización a alergenos. Estas metodologías incluyen inmunoensayos de plataforma única para el reconocimiento de un solo alergeno por ensayo (sencillas) descritos casi inmediatamente después del descubrimiento de la IgE y de plataformas de detección múltiple para el reconocimiento de más de un alergeno por ensayo, las cuales fueron desarrolladas posterior al año 2000 (Figura 2).

2. DIFERENCIAS TÉCNICAS EN LOS DIVERSOS MÉTODOS UTILIZADOS EN LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS PARA DETERMINACIÓN DE IGE

2.1. Radio-Allergo Immunosorbent Test (RAST)

El ensayo radio-alergo-inmunoabsorbente o RAST fue el primer método desarrollado *in vitro* para la determinación de IgE específica. Aunque en la actualidad es una técnica completamente en desuso, se incluye en este capítulo por su importancia histórica, ya



Figura 1:

Reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ab). La reacción Ag-Ab es el fundamento de los métodos diagnósticos utilizados en las determinaciones de IgE total y específica.

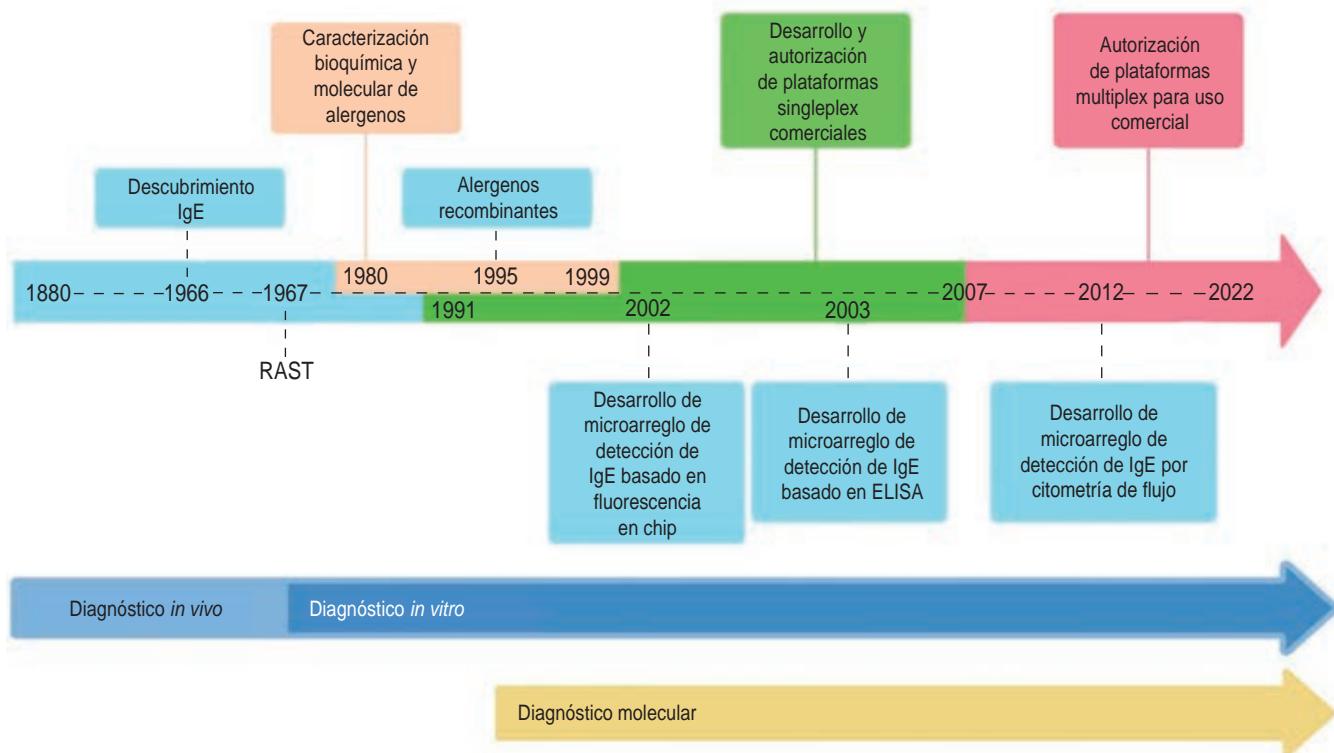


Figura 2: Evolución de las pruebas diagnósticas de alergia. Se muestran los momentos más relevantes en el desarrollo de las pruebas diagnósticas de alergia, desde el inicio con las pruebas de diagnóstico *in vivo* en 1880 (que continúan al día de hoy), pasando por el descubrimiento de la IgE y la explosión ulterior de los inmunoensayos de detección. Tres momentos relevantes se indican en la figura: la caracterización bioquímica y molecular de los alergenos (que continúa a la fecha, pero cuya expansión más importante fue antes del año 2000), el desarrollo y autorización para comercialización de las plataformas singleplex y, el desarrollo y autorización para la comercialización de las plataformas multiplex. El diagnóstico molecular de alergia surge formalmente cuando la biología molecular y la biotecnología permitieron la inclusión de los alergenos recombinantes en las diversas metodologías diagnósticas. Es importante mencionar que la autorización para la comercialización de las diferentes plataformas de diagnóstico molecular ocurre en tiempos posteriores a su desarrollo y en diferentes momentos entre países, ya que depende de sus propias entidades regulatorias sanitarias.

que este método destacó por ser no invasivo, evitando la exposición directa del paciente a los alergenos a evaluar⁶ y dando pie al desarrollo técnico-científico posterior en la determinación de IgE.

Esta prueba se basa en el principio de la reacción antígeno anticuerpo, en el que el alergeno se adsorbe covalentemente a una superficie sólida y después se añade el suero del paciente. Los anticuerpos IgE presentes en la muestra del paciente se unen al alergeno adsorbido, para visualizar la reacción se añade un anticuerpo secundario anti-IgE radio-yodado. La radiación detectada es directamente proporcional al número de complejos Ag-Ab formados.⁷

2.2. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

El método de ELISA o ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas es una técnica ampliamente utilizada en una gran diversidad de determinaciones clínicas y también se usa en la cuantificación de IgE.

El fundamento de este método consiste en la **formación del complejo antígeno-anticuerpo en una placa sólida, donde el anticuerpo de detección se encuentra acoplado generalmente a una enzima oxidante que actuará sobre un sustrato induciendo el cambio**

de coloración en la solución. La placa de reacción será analizada en un espectrofotómetro donde la absorbancia (logaritmo negativo de la transmitancia) será proporcional al número de complejos anti-IgE- IgE formados, pudiendo así estimar la concentración de inmunoglobulina E en la muestra de los pacientes^{8,9} (Figuras 3 y 4).

El método de ELISA sustituyó los métodos que utilizaban marcadores radioactivos por ser un método seguro, sencillo en su proceso y rápido en la obtención del resultado.

2.3. Quimioluminiscencia

Los métodos basados en quimioluminiscencia tienen un procedimiento muy similar al de ELISA. A diferencia del anticuerpo de detección utilizado, éste se encuentra conjugado a una enzima generalmente fosfatasa alcalina que podrá actuar sobre un sustrato como el fosfato de adamantil dioxetano, con la capacidad de generar una señal quimioluminiscente, la cual será proporcional a la concentración de IgE. Los métodos basados en quimioluminiscencia tienen mejor sensibilidad que los métodos basados en absorbancia¹⁰ (Figura 5).

2.4. Fluoro-enzimo-inmuno ensayo (FEIA)

Al igual que los métodos mencionados anteriormente, el fundamento del FEIA consiste en la formación de los complejos antígeno anticuerpo; sin embargo, el anticuerpo de detección en este método se encuentra acoplado a una enzima con capacidad de actuar sobre sustratos que generen fluorescencia con la reacción. Una de las enzimas utilizadas con mayor frecuencia es la β -galactosidasa, que actúa sobre el metilumbeliferyl- β -D-galactósido para que éste genere fluorescencia. De manera similar a los métodos previamente descritos, la fluorescencia será proporcional a la cantidad de IgE presente en la muestra del paciente¹¹ (Figuras 5 y 6).

2.5. Inmunoblot

Esta técnica es semejante a las anteriores, con las diferencias puntuales en el tipo de soporte donde se absorben los alergenos o antígeno de captura, y el sustrato utilizado en el revelado de las reacciones.

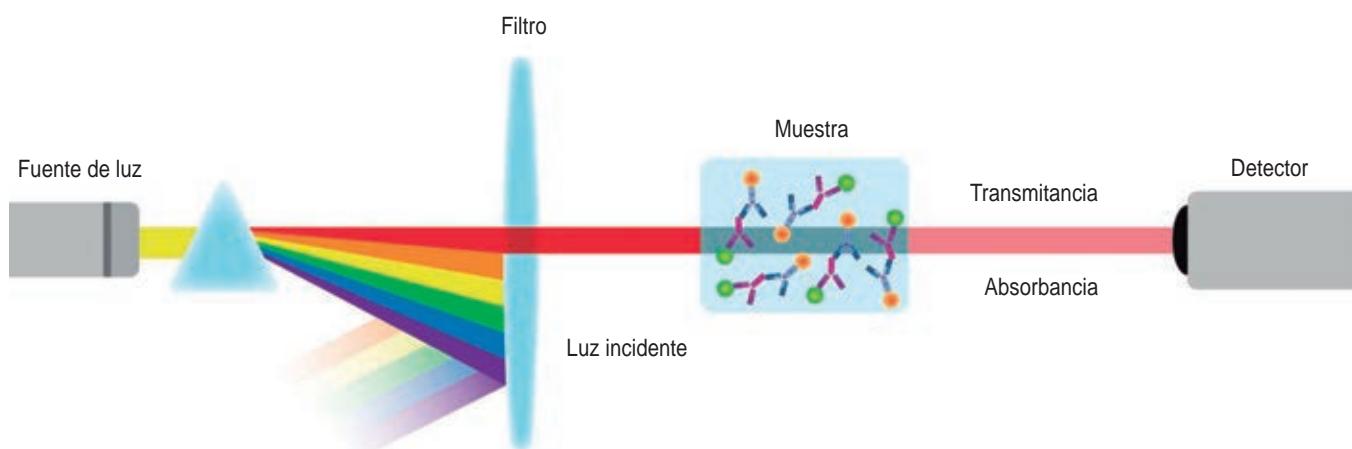


Figura 3: Característica de la lectura por espectrofotometría. El cambio en la coloración de la solución es producto de la reacción enzimática con el sustrato y secundario a la reacción Ag-Ab. La variación colorimétrica se detecta a través de la lectura de la absorbancia de la muestra.

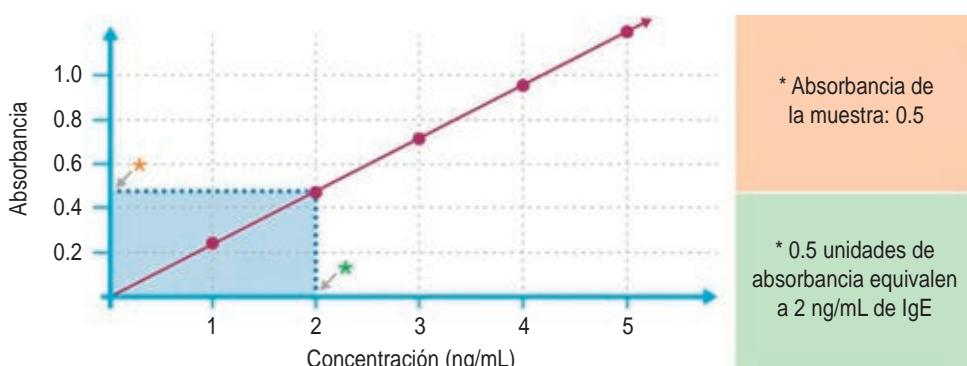


Figura 4: Gráfica de absorbancia y concentración de proteína en la metodología de ELISA. En cualquier método de ELISA cuantitativo y ante un control positivo, los valores de la absorbancia indican la concentración de la proteína que se pretende identificar, en este caso IgE total o específica.

Los inmunoblotas utilizan como soporte membranas poliméricas, los anticuerpos de detección se encuentran conjugados a fosfatasa alcalina y el sustrato que por lo general se utiliza es el nitro azul de tetrazolio 5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato, los cuales al reaccionar forman precipitados coloreados sobre la membrana. En este método **la intensidad de la marca de reacción será proporcional a la concentración de anticuerpos IgE**.¹¹⁻¹³

2.6. Inmunoensayo en chip

En esta metodología los **alergenos son inmovilizados en el chip** permitiendo que reaccionen con la IgE del paciente. Al usar este método algunas plataformas comerciales utilizan la técnica de **florescencia**, mientras que otras prefieren técnicas **colorimétricas** para realizar la medición en el chip.¹⁴

2.7. Determinación de IgE específica en las metodologías descritas

Para la determinación de s IgE, en las técnicas anteriormente mencionadas, el alergeno o componente alergénico deberá ser adsorbido en el soporte al realizar la determinación. Los anticuerpos del paciente presentes en el suero deberán reaccionar en primera instancia y de manera específica con su antígeno (alergeno); finalmente, para determinar la concentración de s IgE se seguirán las mismas rutas metodológicas descritas con anterioridad para la IgE total.⁸⁻¹⁴

3. ALERGENOS UTILIZADOS EN EL DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO

La importancia de la determinación de **la especificidad de la IgE en la clínica depende de una adecuada interacción Ag-Ab**, en el que el antígeno corresponde al alergeno que se pretende asociar a la sintomatología alérgica. En este sentido, el uso y desarrollo de la tecnología enfocada en la extracción y purificación de los alergenos marcó la primera etapa en el desarrollo de las técnicas de determinación de s IgE. Posteriormente, el desarrollo de la biología molecular y la biotecnología permitieron controlar de una manera muy puntual la expresión y pureza de ciertas proteínas, avanzando al uso de alergenos recombinantes en las metodologías señaladas con anterioridad y marcando el inicio del diagnóstico molecular de la alergia¹⁵ (Figuras 2 y 7).

3.1. Extractos alergénicos

Los extractos alergénicos son resultado del proceso de extracción con solventes de las fuentes alergénicas naturales. Los procesos a los que las fuentes primarias de alergenos son sometidas permiten obtener una mezcla de distintos componentes tanto alergénicos como no alergénicos, lo que representa una limitante en cuanto a la precisión del diagnóstico y su verdadero impacto clínico.

3.2. Alergenos nativos

Los alergenos nativos son alergenos puros. La importancia de los extractos alergénicos en el desarrollo del diagnóstico molecular de la alergia radica en que estas técnicas aparentemente rudimentarias permitieron aislar y purificar alergenos particulares, lo que hoy conocemos como alergenos nativos; identificar los epítopos inmunogénicos de esos alergenos a través de la demostración de su alergenidad, es decir, demostrando su unión con anticuerpos del isotipo IgE provenientes de pacientes alérgicos, y facilitando su caracterización molecular, que incluye la secuenciación proteica. Sus cambios postraduccionales (glicosilación), la identidad, integridad y pureza es lo que dio pie a su clonación, expresión y purificación biotecnológica.^{15,16}

3.3. Alergenos recombinantes

Los alergenos recombinantes son alergenos puros que expresan los epítopos inmunogénicos a los que se les ha asociado cierta importancia clínica. Son obtenidos al insertar el ADN codificador (en bacterias o células eucariotas) para determinados componentes proteicos o componentes alergénicos presentes en los alergenos nativos. Este proceso biotecnológico permite la producción de grandes cantidades de estos alergenos, mismos que pueden ser utilizados en las técnicas diagnósticas mencionadas. Este método de obtención garantiza la especificidad y precisión del resultado, ya que elimina la pre-

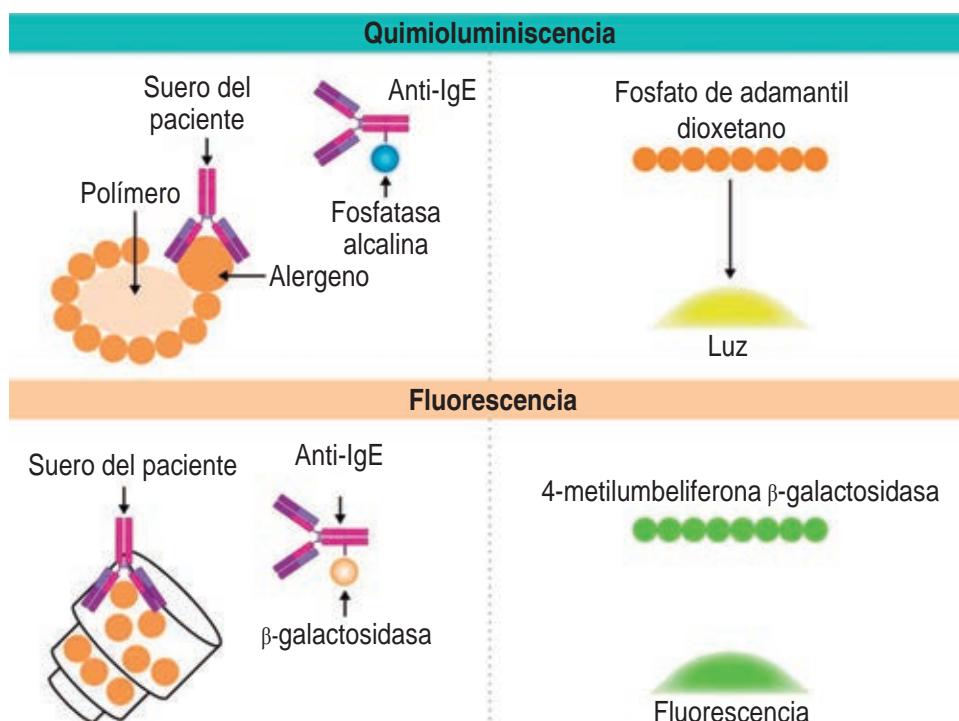


Figura 5:

Fundamentos de las técnicas de quimioluminiscencia y fluorescencia. En ambas técnicas la reacción Ag-Ab permite la identificación de la IgE total o específica, en el caso de la quimioluminiscencia la reacción química se detecta con luz, en el segundo caso por fluorescencia.

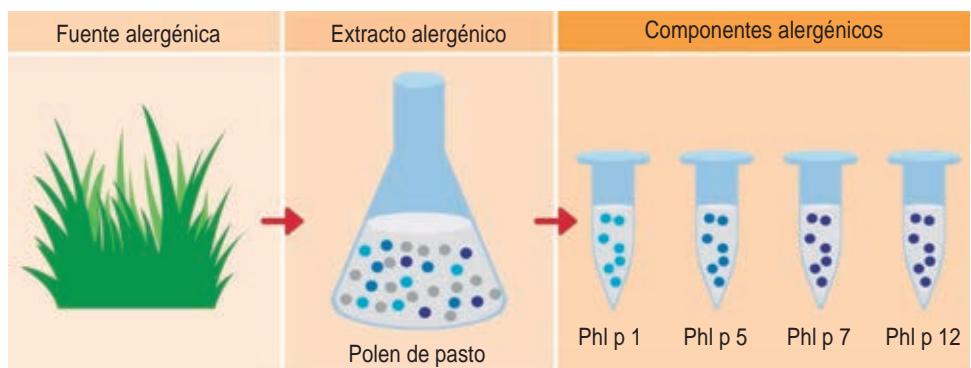
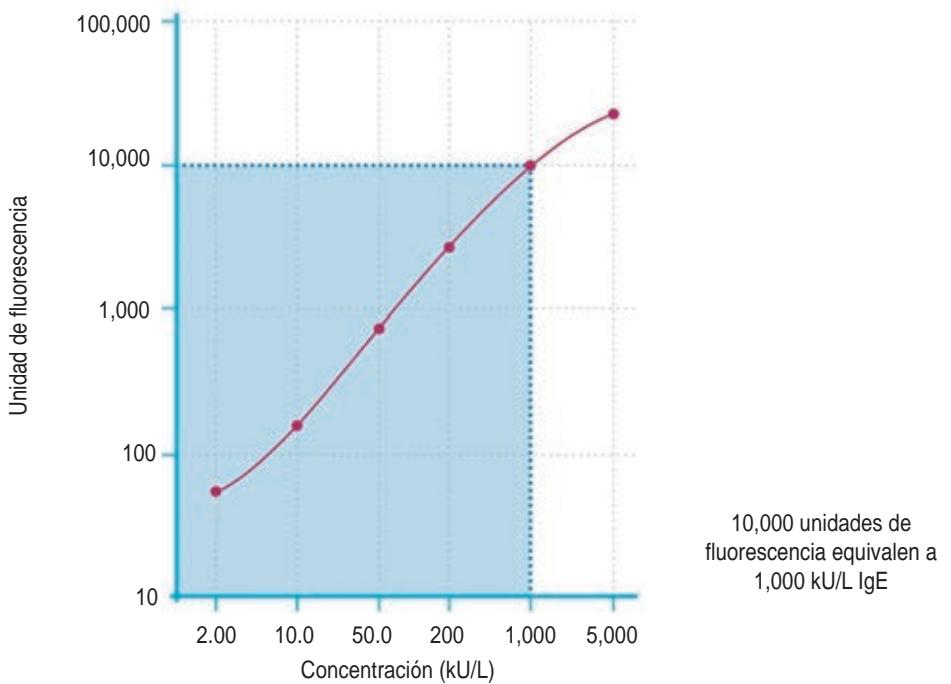


Figura 7: Alergenos utilizados en el diagnóstico por laboratorio. Se muestran las fuentes alergénicas de las que se obtienen los extractos alergénicos y de ellos la purificación de los componentes alergénicos, en esta figura se utilizó como ejemplo el pasto común (*Phleum pratense*) y algunos de sus alergenos (Phl p 1, Phl p 5, Phl p 7 y Phl p 12). La secuenciación de los extractos alergénicos y sus componentes permitió la clonación y expresión controlada de los últimos por biotecnología, denominándose antígenos recombinantes.

sencia de los contaminantes contenidos en las preparaciones de extractos alergénicos y garantiza la interacción de la IgE con epítopes específicos de relevancia clínica.

El uso de alergenos recombinantes ha permitido mejorar la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico y hoy día el uso de plataformas de detección múltiple hace posible discernir entre reacciones cruzadas contra distintos alergenos, de aquí la importancia de las combinaciones de alergenos recombinantes elegidas en la determinación, ya que permiten mayor precisión en la interpretación clínica.¹⁷

4. NOMENCLATURA DE LOS ALERGENOS

Como hemos mencionado con anterioridad los avances en la biología molecular, en la biotecnología, en los métodos de análisis del genoma y secuenciación proteica han

revolucionado el enfoque del diagnóstico de alergia los últimos 30 años. A partir de los años 80 se ha trabajado intensamente para reflejar la estructura alergénica en su nomenclatura, de tal manera que permita identificar desde el nombre similitudes o diferencias entre alergenos e inferir posibles reactividades cruzadas.

4.1. Limitantes en la nomenclatura de los alergenos

A pesar de que existen acuerdos en el establecimiento de la nomenclatura de los alergenos, también hay limitantes en su aplicación, ya que con el avance en la caracterización proteica han salido a la luz, tal es el caso de las siguientes estructuras alergénicas:

- 1. Alergenos diméricos unidos covalentemente.** Se trata de alergenos que se presentan como heterodímeros codificados por genes diferentes, un ejemplo son las secretoglobinas (SCGB), que poseen una alfa-hélice y una estructura dimérica o los alergenos mayores Fel d1 y Ory c3, que son heterodímeros unidos por tres puentes disulfuro. Fel d1 también puede formar tetrameros compuestos por dos heterodímeros, provenientes de genes independientes cada uno, por lo que el sistema de nomenclatura actual no permite identificar estas características estructurales asociadas directamente con su alergenidad. Además, Fel d1 es denominado Fel d1.0101 cuando se refiere al dímero compuesto por dos cadenas diferentes de dos genes separados, lo que resulta inconsistente. Recientemente se ha renombrado a las proteínas de Fel d1 como Fel d1.A.0101 para la cadena 1 y Fel d1.B.0101 para la cadena 2, estos cambios permiten dar un poco de luz sobre la importancia de la estructura y su impacto en la alergenidad.¹⁸⁻²⁰
- 2. Epítopes sacáridicas.** También conocidos como determinantes carbohidratos de reacción cruzada (CCDs). Son epítopes carbohidrato que contienen α -1,3-fucosa y/o β 1,2 xilosa expresados en glicoproteínas de plantas e insectos y que son responsables de la reacción cruzada por IgE entre las diferentes fuentes alergénicas. Aunque existe un consenso general en el que los anticuerpos contra las estructuras sacáridicas no son clínicamente relevantes, hoy en día se conoce que la Galactosa- α -1,3-galactosa (α -gal) y los Galacto-oligosacáridos (GOS) están asociados con alergia a alimentos y anafilaxis, el primero presente en la carne roja y el segundo en fórmulas lácteas.^{19,20}

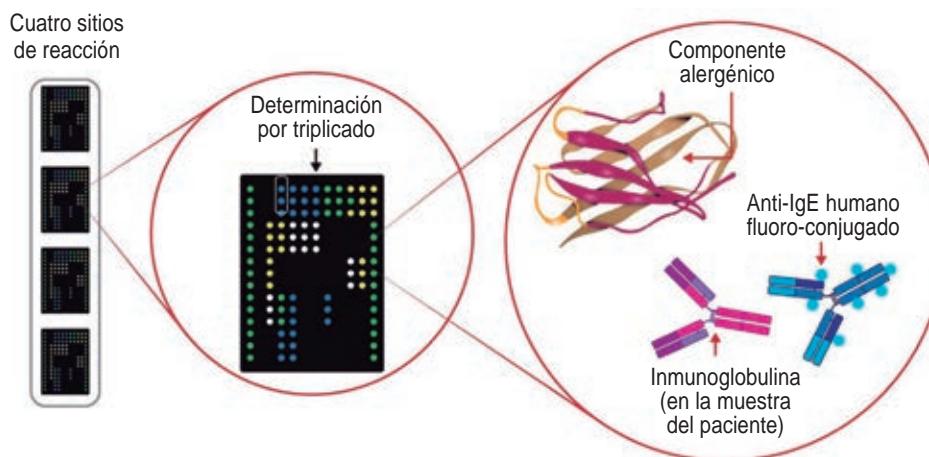


Figura 8: Immuno Solid-phase Allergen Chip (ISAC). ISAC es una plataforma de detección múltiple basada en la reacción Ag-Ab que se demuestra por fluorescencia. Las determinaciones se realizan en un chip y permiten la identificación múltiple de diversos alergenos.

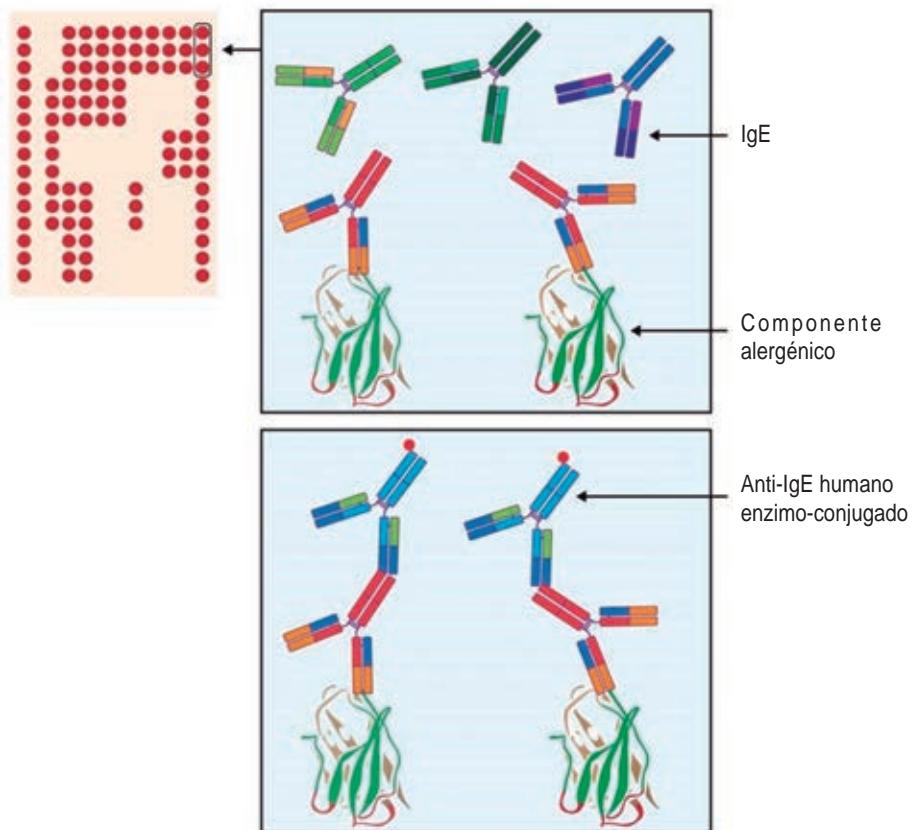


Figura 9:

Allergy Explorer (ALEX). ALEX es una plataforma de detección múltiple basada en la reacción Ag-Ab que se demuestra con un cambio en la coloración de la muestra inducida por la reacción enzima-sustrato (ELISA) posterior a la interacción de la IgE con su alergeno.

3. **Numeración de los alergenos.** Como hemos mencionado, la numeración en el nombre de los alergenos corresponde al orden en que fueron descubiertos y aunque se ha reconocido la importancia de la conservación de las secuencias y estructuras entre especies relacionadas (ver sección de nomenclatura en isoformas y variantes) y debido a la gran cantidad de publicaciones que actualmente existen que no consideraron estos puntos (ej. Fel d2 y Can f3), se ha determinado no cambiar la nomenclatura de esos alergenos para evitar mayores confusiones.¹⁸⁻²⁰
4. **Actualización en el registro de alergenos.** Por otra parte, también se ha reconocido que existe un sobreregistro de alergenos a partir de secuencias genómicas parciales, tal es el caso de la enolasa Sal s2 y la aldolasa Sal s3 de salmón, que fueron publicadas sin demostrar su reactividad alergénica real contra IgE, en este punto se ha sugerido que para futuros registros se debe tener evidencia de alergenidad con IgE obtenida de pacientes alérgicos o comparar la proteína recombinante versus la nativa para identificar si las isoformas y/o variantes descritas tienen la misma potencia alergénica.¹⁸⁻²⁰

El uso de estas plataformas en México se encuentra restringido por regulación de la autoridad sanitaria. Pero algunos laboratorios comerciales pueden procesarlas enviándolas a laboratorios de referencia en cumplimiento de la (NOM-007-SSA3-2011 para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos).

5. PLATAFORMAS COMERCIALES

Dentro de las plataformas comerciales para la detección de IgE específica se encuentran las denominadas “singleplex” o de plataforma sencilla y las plataformas “multiplex”, de plataforma múltiple o de microarreglos. Las **plataformas sencillas** permiten la **identificación de la especificidad de la IgE hacia un alergeno o componente alergénico por cada reacción de detección realizada**. Por otra parte, las **plataformas múltiples** permiten a

través de un único ensayo determinar la concentración de IgE específica para distintos alergenos de un panel determinado.²¹

Se destaca con una bandera las plataformas que se encuentran en nuestro país o cuyos resultados pueden ser subrogados a otros laboratorios internacionales autorizados en México.

5.1. Plataformas comerciales de análisis sencillo

Dentro de las plataformas comerciales mayormente extendidas para la determinación de IgE específica se encuentran:

1. **Phadia ImmunoCAP (ThermoFischer Scientific).** Fue la primera plataforma automatizada en utilizar como principio de funcionamiento el FEIA, demostrando alta concordancia con el RAST en sus resultados.²² Phadia permite utilizar componentes alergénicos nativos y recombinantes, los cuales se agrupan dentro de la línea ImmunoCAP como polen de pastos, de malezas, de árboles, microorganismos, proteínas de animales, ácaros, entre otros. El equipo Phadia 250 es uno de los más utilizados en los laboratorios clínicos y tiene una capacidad de procesamiento de 60 pruebas por hora.²³
2. **Hytec 288 (Hycor Biomedical).** Ésta es una plataforma de detección de IgE basada en ELISA. Aunque este equipo nunca se ha comercializado en nuestro país, vale la pena mencionarlo debido a que fue una de las primeras plataformas automatizadas en la detección de IgE. Su introducción en el mercado se debió a que demostró una excelente concordancia con el sistema Phadia, cumpliendo los requerimientos analíticos para su uso clínico.^{24,25}
3. **Immulite (Siemens).** Ésta es una plataforma de detección de IgE que tiene como fundamento la quimioluminiscencia.²⁶ Ofrece un panel de 26 componentes alergénicos recombinantes. Immulite 2000 es uno de los equipos más comercializados, con capacidad de procesar hasta 200 resultados por hora, con una sensibilidad de hasta 0.1 KU/L.²⁷

Es importante mencionar que existen otras plataformas para determinación sencilla basadas en quimioluminiscencia como el Advia Centaur (Siemens),²⁸ esta plataforma sí fue comercializada en México; sin embargo, su uso cada vez se ha ido restringiendo más debido a una sustitución paulatina por Immulite. Otro punto que ha contribuido a la sustitución de esta plataforma ha sido que algunos autores han reportado menor desempeño con baja concordancia entre resultados y menor sensibilidad y especificidad para Advia comparada con Immulite.^{29,30}

5.2. Comparativa entre plataformas de análisis sencillo

A la fecha existen numerosos estudios que comparan la determinación de s IgE entre las plataformas ImmunoCAP e Immulite; en todos los casos se ha reportado una buena



Figura 10: Eurolínea. Es una plataforma de detección múltiple basada en la reacción Ag-Ab que se demuestra por inmunoblot. Las determinaciones se realizan en una membrana de nitrocelulosa y los resultados son leídos con un escáner, lo que permite la identificación de múltiples alergenos.

correlación y concordancia entre resultados para los distintos alergenos.^{31,32} Como se mencionó con anterioridad, Hytec 288 pudo acceder al mercado como plataforma de detección única debido a la alta concordancia en la determinación de IgE con ImmunoCAP,^{24,25} esta concordancia hizo que se incluyera en las recomendaciones de la WAO como parte de los equipos de determinación de IgE de uso clínico confiable.³³

5.3. Plataformas comerciales de análisis múltiple

Actualmente las plataformas multiplex para identificación de IgE específica más conocidas son *Immuno Solid-phase Allergen Chip* (ISAC) y *Allergy Explorer* (ALEX).

En México no se cuenta con equipos para procesamiento y análisis con esta técnica; sin embargo, las muestras pueden ser enviadas a laboratorios de referencia.

En México se cuenta con equipos para procesamiento y análisis con esta técnica.

En México se cuenta con equipos para procesamiento y análisis con esta técnica.

- 1. ISAC.** Es fabricada por Phadia y comercializada por *Thermo Fischer Scientific*, fue la primera plataforma multiplex desarrollada y autorizada para la identificación de IgE.³⁴ Esta plataforma está basada en la metodología de FEIA en chip. El sistema ISAC utiliza unidades estandarizadas ISAC (ISU-E) en un rango de 0.3 a 100 ISU-E equivalentes a 0.3-100 kUa/L; clasifica la concentración de SlgE en cuatro grupos: indetectable < 0.3 ISU-E (< 0.3 kUa/L), bajo 0.3-0.9 ISU-E, moderado/alto 1-14.9 ISU-E (≥ 13 a < 153 kUa/L) y muy alto > 15 ISU-E (≥ 153 kUa/L) (*Figura 8*).^{34,35} Actualmente se encuentra vigente la versión ISAC-E112i, tiene capacidad de identificar de forma simultánea 112 componentes alergénicos de 46 distintas fuentes de alergenos a partir de 30 mcl de suero/plasma del paciente en un tiempo aproximado de cuatro horas.³⁵
- 2. ALEX.** Es una plataforma comercializada por *Macroarray Diagnostics*. Esta plataforma fue la primera metodología basada en ELISA para la determinación simultánea de un gran número de slgE hacia extractos alérgicos, componentes alergénicos y de IgE . Actualmente se encuentra disponible la versión 2.0 que analiza IgE de 120 extractos y 180 alergenos de forma simultánea con 1 mL de suero del paciente, además de la IgE total. Además, puede bloquear la determinación de IgE clínicamente irrelevantes dirigidos contra CCDs. La plataforma tiene formatos de procesamiento manuales y automatizados, con capacidad de analizar hasta 50 pacientes en un tiempo aproximado de cuatro horas.³⁶ ALEX contiene paneles prediseñados por grupo de síntomas o grupo de alergenos como polen de pastos, alergenos de caspa y epitelio de animales, ácaros y cucarachas, mohos y levaduras, entre otros. Los resultados de las determinaciones se presentan con un resumen gráfico, el nombre del alergeno, el componente o extracto alergeno específico, la función biológica y la concentración de la IgE descrita en kUa/L. El reporte final se acompaña de hallazgos de posible sensibilización cruzada y recomendaciones para la interpretación y acompañamiento médico para el médico tratante. De manera similar a la plataforma previa, ALEX utiliza una clasificación conforme a la concentración de IgE obtenida: Negativo o incierto (< 0.3 kUa/L), baja (0.3 a 1 kUa/L), moderada (1 a 5 kUa/L), alta (5 a 15 kUa/L) y muy alta (> 15 kUa/L)³⁶ (*Figura 9*).
- 3. Eurolíne (EUROIMMUN AG).** Es una plataforma comercializada por Perkin Elmer basada en la técnica de immunoblot.³⁷ Esta plataforma tiene como fase sólida membranas en forma de tiras con componentes alergénicos adsorbidos organizados por secciones prediseñadas: inhalatorio, alimenticio, entre otros. Eurolíne ofrece paneles alternativos por sensibilizaciones reportadas en países específicos o personalizadas y cuenta con la posibilidad metodológica de reducir los posibles falsos positivos a causa de reacciones cruzadas por residuos polisacáridicos³⁷ (*Figura 10*). Una plataforma similar, PROTIA Allergy-Q comercializada por Omnia Health, utiliza el inmunoblot para la detección de IgE . PROTIA detecta más de 60 alergenos por tira, ofreciendo un total de detección de 134 alergenos diferentes, que la

haría la plataforma más robusta con la tecnología por blot.³⁸ Ninguna de las dos plataformas mencionadas se encuentra disponible en México y PROTIA se encuentra sólo en países asiáticos, principalmente en Corea.

5.4. Comparativa entre plataformas de análisis múltiple

En cuanto a la sensibilidad y especificidad entre las plataformas ISAC y ALEX, los estudios disponibles han demostrado que ambas tecnologías son muy similares y con resultados concordantes ($\kappa = 0.795$) de hasta 94.3% tanto para resultados positivos como para negativos.³⁹ En esos estudios se muestra una mejor correlación de ciertos alergenos (LTP, profilina y PR-10) para ISAC, aunque ALEX puede eliminar mejor la señal cruzada a través de su sistema de bloqueo de CCDs. Lo anterior sugiere que ISAC tiene mejor desempeño para algunos alergenos, pero ALEX incluye mayor número de alergenos disponibles para expandir la detección molecular.³⁹ En el caso de Eurolíne, no existen a la fecha estudios comparativos con las plataformas ISAC y ALEX, la dificultad técnica en realizar estos estudios relacionada a su metodología y menor difusión comercial podría explicar la carencia de los mismos.

6. CARACTERÍSTICAS A CONSIDERAR AL ELEGIR UNA PLATAFORMA ÚNICA O MÚLTIPLE.

- Costo:** considerar el precio de la prueba que se pretenda solicitar, valorando si el costo unitario es mejor que el múltiple o viceversa.
- Identificación adecuada de los componentes alergénicos:** conforme a la historia clínica del paciente y con la finalidad de conocer adecuadamente el perfil de sensibilización del mismo.
- Tipo de paciente:** considerar edad, antecedentes de anafilaxia con resultados no concluyentes a las pruebas tradicionales complementarias, pacientes con resultados múltiples positivos a la prueba cutánea etcétera.

→ Importancia de la IgE total en las plataformas de análisis múltiple

En todos los casos de determinaciones de IgE específica se debe realizar la solicitud de IgE total; el índice $\frac{s\text{IgE}}{\text{IgE}}$ se ha considerado un biomarcador útil en el monitoreo clínico de la eficacia de la inmunoterapia con alergeno.^{40,41}

7. OTROS MÉTODOS DE DETECCIÓN MULTIPLEX DE IGE ESPECÍFICA

1. Allergen micro-Bead Array (ABA)

Es una técnica que utiliza la metodología de fluorescencia mediante la detección múltiple de microesferas por citometría de flujo (Cytometric Bead Arrays, CBA). La diferencia con las técnicas mencionadas previamente es que el alergeno se une covalentemente a microesferas que pueden ser identificadas en una solución. La determinación de la IgE se logra una vez que ha reaccionado con su alergeno en la solución y un segundo anticuerpo políclonal conjugado a un fluorocromo reconoce a la IgE específica o utiliza microesferas acopladas directamente al fluorocromo. En ambos casos la fluorescencia será identificada a través de la intensidad media de fluorescencia (MFI), que en presencia de un valor conocido calcula la concentración de IgE. Esta técnica también se utiliza para reconocer anticuerpos de otros isotipos que tengan la capacidad de reaccionar con el alergeno. A la fecha no hay plataformas comerciales que usen la metodología descrita, sólo algunos kits de microesferas que pueden acoplarse con los alergenos (extractos o recombinantes), por lo que su uso actual se encuentra limitado a investigación.³³

CONCLUSIONES

Al tomar la decisión médica de utilizar el diagnóstico molecular en enfermedades alérgicas se deben considerar las siguientes variables: sensibilidad y especificidad de la técnica; el tipo de alergeno utilizado en la misma (alergenos nativos versus alergenos recombinantes); y por último, la plataforma (análisis sencillo o análisis múltiple). Es importante recordar que la sensibilidad y especificidad de la técnica varían conforme a la metodología utilizada y que ésta puede verse modificada cuando las determinaciones se realizan de forma manual, ya que al ser operador-dependiente puede generar errores en el proceso. Esta variable se elimina en las determinaciones automatizadas tanto de plataformas únicas o múltiples que permitieron el desarrollo del diagnóstico molecular.

También debe considerarse el tipo de alergenos utilizados en la plataforma, ya que deben ser alergenos en los que se haya demostrado su relevancia clínica; y en el mismo sentido, saber si la tecnología que se pretende utilizar es capaz de identificar los CCDs para eliminar la posibilidad de reacciones cruzadas por determinantes sacáridicos compartidos. En el caso de la elección de la plataforma análisis sencillo o análisis múltiple deberá ser consecuencia de un análisis profundo de las características clínicas del paciente, del número de determinaciones que se requieran y por supuesto, de la accesibilidad económica de las mismas.

Conocer cada una de las ventajas y limitaciones de las diferentes técnicas y plataformas utilizadas en el diagnóstico molecular de alergia es primordial para acceder a la medicina de precisión a la que nos acercan estas tecnologías. En este contexto, el diagnóstico molecular de alergia disminuye los errores diagnósticos e impacta en el tratamiento al utilizar los resultados de las determinaciones de IgE específica como biomarcadores de elección en inmunoterapia desensibilizante o en recomendaciones médicas específicas como dietas de restricción, entre otras.

Por último, a pesar de la amplia información que pueden ofrecer las determinaciones celulares, sus costos, infraestructura, personal altamente especializado, la falta de automatización en algunas partes del proceso, y sobre todo la falta de evidencia en su aplicabilidad clínica, no pueden considerarse por el momento como parte del diagnóstico rutinario de alergia. Tal vez en los próximos años tengamos la suerte de ser testigos de una etapa más en el desarrollo del diagnóstico molecular de alergia y podamos hacer uso de estas tecnologías en nuestra práctica cotidiana.

REFERENCIAS

1. Valenta R, Karaulov A, Niederberger V, Gattinger P, van Hage M, Flicker S, et al. Molecular aspects of allergens and allergy. *Adv Immunol.* 2018;138:195-256. doi: 10.1016/bs.ai.2018.03.002.
2. Fuhrmann V, Huang HJ, Akarsu A, Shilovskiy I, Elisuytina O, Khaftov M, et al. From allergen molecules to molecular immunotherapy of nut allergy: a hard nut to crack. *Front Immunol.* 2021;12:742732. doi: 10.3389/fimmu.2021.742732.
3. Platts-Mills TAE. Dr. Kimishige Ishizaka: 1926-2018: the discovery of IgE and the revolution in the study of allergic disease. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2019;122(1):2-7. doi: 10.1016/j.anai.2018.09.464.
4. Seagoatt V, Anderson SG. The second international reference preparation for human serum immunoglobulin E and the first British standard for human serum immunoglobulin E. *J Biol Stand.* 1981;9(4):431-437.
5. Salazar A, Velázquez-Soto H, Ayala-Balboa J, Jiménez-Martínez MC, Salazar A, et al. Allergen-based diagnostic: novel and old methodologies with new approaches. *Allergen.* 2017;77. Available in: <https://www.intechopen.com/chapters/55713>
6. Seyed Mojtaba Moosavi and Sussan Ghassabian (February 9th 2018). Linearity of calibration curves for analytical methods: a review of criteria for assessment of method reliability, Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches, Mark T. Stauffer, IntechOpen, doi: 10.5772/intechopen.72932. Available in: <https://www.intechopen.com/chapters/58596>
7. Wittig HG, Blaiss MS. How helpful is the radioallergosorbent test in the diagnosis of allergic disease? *South Med J.* 1982;75(7):820-823. doi: 10.1097/00007611-198207000-00014.
8. Barocci F, DE Amici M, Marseglia GL. Molecular evolution in food allergy diagnosis. *Minerva Pediatr.* 2016;68(5):374-381.

9. Bayne NK, Mathews KP. Determination of total IgE by ELISA in tubes and plates compared with PRIST. *Clin Biochem*. 1982;15(3):167-169.
10. Malet Casajuana A, Merola Martínez E, Amat Par P, Bescós Orós M, Lluch Pérez M, et al. Estudio de la especificidad y sensibilidad de la determinación de la IgE mediante quimioluminiscencia (CLA allergy test) [Sensitivity and specificity of the determination of IgE using chemiluminescence (CLA allergy test)]. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1992;20(1):17-19.
11. Strachan R, Wood J, Hirschmann R. Synthesis and properties of 4-Methyl -2-oxo-1,2-benzopyran-7-yl β -D-galactoside Galactoside of 4-methylumbelliferon. *Journal of Organic Chemistry*. 1962;27:1074-1075.
12. Taketa K, Ichikawa E, Hanada T. A tetrazolium method for staining peroxidase labels in blotting assays. *J Immunol Methods*. 1986;95(1):71-77. doi: 10.1016/0022-1759(86)90319-4.
13. Dewair M, Baur X, Ziegler K. Use of immunoblot technique for detection of human IgE and IgG antibodies to individual silk proteins. *J Allergy Clin Immunol*. 1985;76(4):537-542. doi: 10.1016/0091-6749(85)90772-9.
14. Santosa A, Andiappan AK, Rotschke O, Wong HC, Chang A, Bigiardi-Qi M, et al. Evaluation of the applicability of the Immuno-solid-phase allergen chip (ISAC) assay in atopic patients in Singapore. *Clin Transl Allergy*. 2015;5:9. doi: 10.1186/s13601-015-0053-z.
15. Smoldovskaya O, Feyzhanova G, Arefieva A, Voloshin S, Ivashkina O, Reznikov Y, et al. Allergen extracts and recombinant proteins: comparison of efficiency of in vitro allergy diagnostics using multiplex assay on a biological microchip. Allergy, asthma, and clinical immunology: *official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*. 2016;12:9. Available in: <https://doi.org/10.1186/s13223-016-0117-1>
16. Lockey RF. The importance of knowing how allergen extracts are manufactured. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2017;118:2-3.
17. Valenta R, Karaulov A, Niederberger V, Göttinger P, van Hage M, Flicker S, et al. Molecular aspects of allergens and allergy. *Adv Immunol*. 2018;138:195-256. doi: 10.1016/bs.ai.2018.03.002.
18. Pomés A, Davies JM, Gadermaier G, Hilger C, Holzhauser T, Lidholm J, et al. WHO/IUIS allergen nomenclature: providing a common language. *Mol Immunol*. 2018;100:3-13. doi: 10.1016/j.molimm.2018.03.003.
19. Chan SK, Pomés A, Hilger C, Davies JM, Mueller G, Kuehn A, et al. Keeping allergen names clear and defined. *Front Immunol*. 2019;10:2600. doi: 10.3389/fimmu.2019.02600.
20. WHO/IUIS. (s. f.). WHO/IUIS Allergen Nomenclature Home Page. [Recuperado 8 de noviembre de 2021] Available in: <http://www.allergen.org/index.php>
21. Ahlgrim C, Gutermuth J, Onell A, Borres MP, Schaffner I, Darsow U, Pfäb F, et al. Comparison of molecular multiplex and singleplex analysis of IgE to grass pollen allergens in untreated german grass pollen-allergic patients. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2015;25(3):190-195.
22. Kelso JM, Sodhi N, Gosselin VA, Yunginger JW. Diagnostic performance characteristics of the standard Phadebas RAST, modified RAST, and pharmacia CAP system versus skin testing. *Ann Allergy*. 1991;67(5):511-514.
23. ThermoFisher Scientific. (n.d.). Allergy and Autoimmune Disease Diagnostics. [Retrieved October 29, 2021]. Available in: <https://www.thermofisher.com/phadia/wo/en/our-solutions.html>
24. Kontis KJ, Chen A, Wang J, Nayak N, Li TM. Performance of a fully automated in vitro allergy testing system. *Allergologia et immunopathologia*. 1997;25(2):63-66.
25. Nolte H, DuBuske LM. Performance characteristics of a new automated enzyme immunoassay for the measurement of allergen-specific IgE: summary of the probability outcomes comparing results of allergen skin testing to results obtained with the HYTEC system and CAP system. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1997;79(1):27-34.
26. Li TM, Chuang T, Tse S, Hovanec-Burns D, El Shami AS. Development and validation of a third generation allergen-specific IgE assay on the continuous random access IMMULITE® 2000 analyzer. *Ann of Clin Lab Sci*. 2004;34(1):67-74.
27. Siemens. (n.d.). IMMULITE 2000 XPI Immunoassay System. Siemens-healthineers. Retrieved October 29, 2021. Available in: <https://www.siemens-healthineers.com/cl/immunoassay/systems/immulite-2000-xpi-immunoassay-system>
28. Petersen AB, Gudmann P, Milvang-Gronager P, Morkeberg R, Bogstrand S, Linneberg A, et al. Performance evaluation of a specific IgE assay developed for the ADVIA centaur immunoassay system. *Clin Biochem*. 2004;37(10):882-892. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2004.06.010.
29. Sturm GJ, Jin C, Kranelzbinder B, Hemmer W, Sturm EM, Griesbacher A, et al. Inconsistent results of diagnostic tools hamper the differentiation between bee and vespid venom allergy. *PLoS One*. 2011;6(6):e20842. doi: 10.1371/journal.pone.0020842.
30. Ricci G, Capelli M, Miniero R, Menna G, Zannarini L, Dillon P, et al. A comparison of different allergometric tests, skin prick test, Pharmacia UniCAP® and ADVIA Centaur®, for diagnosis of allergic diseases in children. *Allergy*. 2003;58(1):38-45.
31. Park KH, Lee J, Sim DW, Lee SC. Comparison of singleplex specific IgE detection immunoassays: immunocap phadia 250 and immulite 2000 3gAllergy. *Ann Lab Med*. 2018;38(1):23-31. doi: 10.3343/alm.2018.38.1.23.
32. Yang J, Lee H, Choi AR, Park KH, Ryu JH, Oh EJ. Comparison of allergen-specific IgE levels between Immulite 2000 and ImmunoCAP systems against six inhalant allergens and ten food allergens. *Scand J Clin Lab Invest*. 2018;78(7-8):606-612. doi: 10.1080/00365513.2018.1528506.

33. Ansotegui IJ, Melioli G, Canonica GW, Caraballo L, Villa E, Ebisawa M, et al. Erratum to “IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper” [World Allergy Organ J 13/2 (2020) 100080]. *World Allergy Organ J.* 2021;14(7):100557. doi: 10.1016/j.waojou.2021.100557. Erratum for: *World Allergy Organ J.* 2020;13(2):100080.
34. King EM, Vailles LD, Tsay A, Satinover SM, Chapman MD. Simultaneous detection of total and allergen-specific IgE by using purified allergens in a fluorescent multiplex array. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(5):1126-1131. doi: 10.1016/j.jaci.2007.06.043.
35. ThermoFisher Scientific. (n.d.-b). ImmunoCAP™ ISAC™ Test. [Retrieved October 29, 2021]. Available in: <https://www.thermofisher.com/phadia/wo/en/our-solutions/immunocap-allergy-solutions/specific-ige-multiplex.html>
36. Macroarray Diagnostics: MADx. (n.d.). ALEX. [Retrieved October 29, 2021], Available in: <https://www.macroarraydx.com/products/alex>
37. Perkin Elmer. (n.d.). Immunoblot. EUROIMMUN AG. [Retrieved October 29, 2021], Available in: <https://www.euroimmun.com/products/techniques/immunoblot/>
38. Omnia Health. (s. f.). Proteometech Inc. | Medical Manufacturer Directory. [Retrieved November 9, 2021]. Available in: <https://www.omnia-health.com/exhibitor/proteometech-inc>
39. Scala E, Caprini E, Abeni D, Meneguzzi G, Buzzulini F, Cecchi L, Villalta D, Asero R. A qualitative and quantitative comparison of IgE antibody profiles with two multiplex platforms for component-resolved diagnostics in allergic patients. *Clin Exp Allergy.* 2021;51(12):1603-1612. doi: 10.1111/cea.14016.
40. Shamji MH, Kappen JH, Akdis M, Jensen-Jarolim E, Knol EF, Kleine-Tebbe J, et al. Biomarkers for monitoring clinical efficacy of allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis and allergic asthma: an EAACI position paper. *Allergy.* 2017;72(8):1156-1173. doi: 10.1111/all.13138.
41. Shamji MH, Kappen JH, Akdis M, Jensen-Jarolim E, Knol EF, Kleine-Tebbe J, Bohle B, et al. Biomarkers for monitoring clinical efficacy of allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis and allergic asthma: an EAACI position paper. *Allergy.* 2017;72(8):1156-1173. doi: 10.1111/all.13138.