

## RAST, Inmunoblot, Inmunocap e ISAC en alergia alimentaria

### RAST, Inmunoblot, Immunocap and ISAC in food allergy

Herberto J. Chong-Neto

Especialista en Alergia y Inmunología, Profesor Asociado de Pediatría, Universidad Federal de Paraná, Brasil.

**Recibido:** 01-08-2023

**Aceptado:** 29-10-2023

**Publicado:** 31-12-2023

#### Correspondencia

Herberto J. Chong Neto  
todoasma@gmail.com

**DOI:** 10.29262/ram.v70i4.1335

#### ORCID

Herberto J. Chong Neto

0000-0002-7960-3925

#### Resumen

Después del descubrimiento de la IgE, los avances tecnológicos han proporcionado nuevas herramientas de laboratorio para la cuantificación de anticuerpos IgE específicos de alérgenos en suero y en la superficie de basófilos-mastocitos. Las pruebas in vitro ofrecen numerosas ventajas: cuantificación precisa, falta de interferencia de fármacos, seguridad y almacenamiento a largo plazo de las muestras. Los inmunoensayos cuantitativos para anticuerpos IgE pueden ser un complemento de las pruebas cutáneas. El reactivo de alérgeno en fase sólida (alergosorbente) o líquida es el componente principal del ensayo que confiere especificidad a la prueba de anticuerpos IgE. Es el reactivo más complejo y altamente variable en los ensayos de anticuerpos IgE. La elección de utilizar recombinantes de diagnóstico en una única plataforma en lugar de múltiples se realiza caso por caso (considerando el historial previo y el perfil clínico) y de manera dependiente de los alérgenos. Aunque la mayor parte de las alergias alimentarias se limitan a una pequeña cantidad de posibles desencadenantes, estos alimentos son muy complejos al momento de evaluar su potencial alérgico. La posibilidad de fraccionar el alérgeno y entender algunos de sus componentes como potencialmente importantes para definir el riesgo de reacción clínica, reactividad cruzada o persistencia de la alergia, abrió una nueva era en el campo de la alergia, denominada alergia molecular. La identificación del componente alérgico responsable de las reacciones supone una herramienta importante para confirmar la información y gravedad de los síntomas, historia natural de la enfermedad, posibilidad de reactividad cruzada y clínica (marcadores de alergia).

**Palabras clave:** Alergia alimentaria; IgE; pruebas in vitro; pruebas in vivo; Alergia molecular; Componente alérgico; Reactividad cruzada.

#### Abstract

skin tests; Sensitization; IgE-mediated allergy; allergenic extract. After the discovery of IgE, technological advances have provided new laboratory tools for the quantification of allergen-specific IgE antibodies in serum and on the surface of basophils-mast cells. In vitro testing offers numerous advantages: accurate quantitation, lack of drug interference, safety, and long-term storage of samples. Quantitative immunoassays for IgE antibodies can be an adjunct to skin testing. The allergen reagent in solid phase (allergosorbent) or liquid is the main component of the assay that confers specificity to the IgE antibody test. It is the most complex and highly variable reagent in IgE antibody assays. The choice to use diagnostic recombinants on a single rather than multiple platforms is made on a case-by-case basis (considering prior history and clinical profile) and in an allergen-dependent manner. Although most food allergies are limited to a small number of possible triggers, these foods are very complex when evaluating their allergenic potential. The possibility of fractionating the allergen and understanding some of its components as potentially important to define the risk of clinical reaction, cross-reactivity, or persistence of allergy, opened a new era in the field of allergy, called molecular allergy. The identification of the allergenic component responsible for the reactions is an important tool to confirm the information and severity of the symptoms, natural history of the disease, possibility of cross-reactivity and clinical symptoms (allergy markers).

**Key words:** Food allergy; IgE; In vitro tests; In vivo tests; Molecular allergy; Allergenic component; Cross reactivity.

Después del descubrimiento de la IgE, los avances tecnológicos han proporcionado nuevas herramientas de laboratorio para la cuantificación de anticuerpos IgE específicos de alérgenos en suero y en la superficie de basófilos-mastocitos. Las pruebas *in vitro* ofrecen numerosas ventajas: cuantificación precisa, falta de interferencia de fármacos, seguridad y almacenamiento a largo plazo de las muestras.

Los inmunoensayos cuantitativos para anticuerpos IgE pueden ser un complemento de las pruebas cutáneas. En niños con alergia alimentaria y dermatitis atópica, los valores de corte para las concentraciones de anticuerpos IgE frente al huevo, la leche, el cacahuete y el pescado se han derivado para proporcionar valores predictivos positivos del 95% y negativos del 90%.

Los anticuerpos IgE específicos de alérgeno se miden en presencia de otros anticuerpos del mismo isotipo y anticuerpos de diferentes isotipos, pero específicos para el mismo alérgeno. Esto requiere el reconocimiento específico de los sitios de unión para alérgenos (Fab) y los epítomos específicos de isotipo (Fc) en el mismo ensayo. Por lo tanto, todos los diseños incluyen una fase sólida para la separación de anticuerpos IgE unidos y no unidos. Los materiales fuente de alérgenos utilizados en el ensayo deben estar bien caracterizados y los alérgenos críticos no deben perderse durante la producción de reactivos; esto proporciona datos precisos y reproducibles en la investigación clínica de alergias.

El reactivo de alérgeno en fase sólida (alergosorbente) o líquida es el componente principal del ensayo que confiere especificidad a la prueba de anticuerpos IgE. Es el reactivo más complejo y altamente variable en los ensayos de anticuerpos IgE, en parte debido a la heterogeneidad de la mayor parte de los extractos de alérgenos y las diferentes fórmulas químicas utilizadas para insolubilizar o marcar las proteínas alergénicas. En un intento por mejorar la capacidad de unión de anticuerpos del disco de papel, históricamente se utilizaron en la investigación diversos alergosorbentes a base de carbohidratos (además del sephadex y el papel), como la celulosa microcristalina y agarosa. Sin embargo, el avance más significativo en los ensayos clínicos fue el desarrollo de un polímero portador hidrófilo encapsulado al que se acoplaba covalentemente el alérgeno. Este polímero se configuró en forma de una pequeña taza y se denominó CAP. Su capacidad de unión

a proteínas alergénicas fue superior a la del disco de papel y más fácil de usar que la agarosa o las partículas de celulosa. Su uso en el sistema CAP de Pharmacia mejoró la capacidad general de unión de anticuerpos del alergosorbente, lo que condujo a una cinética de ensayo más rápida y sensibilidad mejorada.

En la actualidad existen cinco ensayos para detectar la IgE específica de alérgenos en suero humano. De acuerdo con los datos de la Encuesta de Competencia en Alergia Diagnóstica del Colegio de Patólogos Estadounidenses, se observó que el ensayo quimioluminiscente de Hitachi Chemical Diagnostics (formalmente MAST), el Hycor Hy-Tech EIA (formalmente Ventrex RAST) y el Thabest IgE son tecnologías de primera generación de uso poco frecuente que reportan resultados cualitativos (positivo-negativo) o semicuantitativos (clase-grado). El sistema CAP de Pharmacia y el Alastat de Diagnostic Products Corporation son ensayos de segunda generación que han logrado un alto grado de cuantificación, semiautomatización y buen rendimiento analítico. En los últimos años, ambos ensayos han hecho la transición a sistemas de tercera generación automatizados, autónomos y con pulsador, conocidos como sistemas Pharmacia UniCAP y Diagnostic Products Corporation Immulite, respectivamente. La calidad de las mediciones de anticuerpos IgE específicos de alérgenos notificadas por los laboratorios de diagnóstico clínico de alergia alimentaria no es uniformemente equivalente.<sup>1,2</sup>

Para examinar prospectivamente el grado de comparación entre los resultados de IgE específica de diferentes laboratorios, Szeinbach y sus colaboradores evaluaron seis laboratorios de diagnóstico que emplearon cinco métodos diferentes. Se enviaron alícuotas de 26 muestras de suero que contenían concentraciones variables de IgE específica para 17 aeroalérgenos comunes por triplicado a cada laboratorio durante 6 semanas. En total se analizaron 7813 pruebas. La concordancia entre diferentes ensayos en uso comercial con una excepción no fue buena. Esto fue particularmente cierto alrededor de la región de corte, donde la mayor parte de los ensayos demostraron una alta imprecisión. El sistema CAP de Pharmacia utilizado por dos laboratorios diferentes demostró resultados altamente comparables con buena precisión. Algunos ensayos fueron reproducibles pero no exactos. Otros no eran reproducibles ni precisos. Los

resultados de este estudio indicaron que no todos los laboratorios-ensayos comerciales para IgE específica brindan datos reproducibles y precisos. Se detectó un potencial significativo de diagnóstico erróneo para algunos resultados informados.<sup>3</sup>

Madera y su grupo de estudio investigaron la obtención de resultados similares de laboratorios certificados por la Ley de Mejora de Laboratorios Clínicos, que usaron tres sistemas comunes para la determinación de anticuerpos IgE con muestras de suero y anticuerpos quiméricos IgE de ratón-humano, con especificidad y cantidad conocidas. Sesenta muestras de cacahuete y 20 de soya se enviaron para la determinación de anticuerpos IgE en tres sistemas diferentes: ImmunoCAP, Immulite y Turbo radioalergosorbent test (RAST). También se incluyeron anticuerpos IgE quiméricos humanos-ratón específicos para el principal alérgeno de abedul Bet v 1 y para el alérgeno de ácaros del polvo Der p 2. La evaluación cualitativa utilizó un punto de corte de 0.35 kUA/L y demostró algunas diferencias en la capacidad para detectar la sensibilización de anticuerpos IgE, y el Turbo RAST resultó el más variable. Sin embargo, se encontraron diferencias considerables en la evaluación cuantitativa con Immulite sobrestimando y Turbo RAST subestimando sIgE en comparación con ImmunoCAP. Se observaron discrepancias similares con las muestras de anticuerpos IgE quiméricos de ratón-humano. Estos hallazgos tienen implicaciones clínicas potencialmente serias, pues cada sistema es ampliamente utilizado. Por lo tanto, es importante que los laboratorios informen qué sistema están utilizando. El hecho de que dos sistemas presenten sus resultados en las mismas unidades no significa que los resultados sean necesariamente correctos o intercambiables.<sup>4</sup>

Wang y su grupo determinaron si las concentraciones de IgE derivadas de diferentes ensayos fueron equivalentes a los medidos por ImmunoCAP, e incluyeron prospectivamente a 50 pacientes del consultorio de alergias pediátricas de Mount Sinai. Para cada muestra cegada se midieron las concentraciones de IgE específica para huevo, leche, cacahuete, gato, abedul y *Dermatophagoides farinae* en diferentes laboratorios, cada uno utilizó un sistema de ensayo diferente (Phadia ImmunoCAP, Agilent Turbo-MP y Siemens Immulite 2000). Los resultados se analizaron para determinar si las mediciones de IgE eran equivalentes. Las cifras

de IgE específica para alérgenos alimentarios se correlacionaron con datos clínicos y se determinaron umbrales que pronosticaron la probabilidad de enfermedad clínica en el 50 o 95% de los sujetos. Existieron grados variables de concordancia entre los tres ensayos. Immulite 2000 sobrestimó todas las concentraciones de IgE específicos en comparación con ImmunoCAP. Turbo-MP sobreestimado para huevo y subestimado para abedul y *D. farinae*. Se observaron diferencias para leche, cacahuete y gato, sin tendencia a la sobrestimación o subestimación. Además, diversos valores para alérgenos alimentarios discreparon alrededor del 50 y 95% de los valores predictivos positivos para la reactividad clínica. Las discrepancias en las concentraciones de IgE específica de tres ensayos diferentes pueden conducir potencialmente a un tratamiento alterado. Los valores predictivos de reactividad clínica asociados con concentraciones de IgE específica de alimentos determinados por ImmunoCAP no deben aplicarse a los resultados de otros ensayos.<sup>5</sup>

La confirmación diagnóstica de alergia a cierto alimento en particular requiere la exposición controlada a ese producto. El principal beneficio de una prueba de laboratorio en la investigación de alergias alimentarias es el intento de eximir al paciente de la prueba de provocación oral y sus riesgos inherentes.

En los últimos años, con el desarrollo continuo de las pruebas de diagnóstico moleculares, es posible realizar ensayos de plataforma simple utilizando alérgenos recombinantes o purificados (es decir, no solo con extractos de alérgenos), y de esta forma aumentar la sensibilidad, especificidad y precisión diagnóstica. La elección de utilizar recombinantes de diagnóstico en una única plataforma en lugar de múltiples se realiza caso por caso (considerando el historial previo y el perfil clínico) y de manera dependiente de los alérgenos (es decir, fuente de alérgenos y disponibilidad de recombinantes únicos).<sup>6,7</sup>

Aunque la mayor parte de las alergias alimentarias se limitan a una pequeña cantidad de posibles desencadenantes, estos alimentos son muy complejos al momento de evaluar su potencial alérgico. Cada alimento es un conjunto de proteínas que pueden estimular el sistema inmunitario de diferentes formas para producir IgE específicas y provocar reacciones graves. Incluso en algunos alimentos los carbohidra-

tos se han descrito como desencadenantes de reacciones alérgicas. Esta posibilidad de fraccionar el alérgeno y entender algunos de sus componentes como potencialmente importantes para definir el riesgo de reacción clínica, reactividad cruzada o persistencia de la alergia, abrió una nueva era en el campo de la alergia, denominada alergia molecular.<sup>6,7</sup>

Existen avances importantes con los principales alérgenos.<sup>8</sup> ISAC (Sistema Inmune de Alérgenos en Fase Sólida). La cantidad de alérgenos inmovilizados en este microensayo está creciendo y actualmente se encuentra disponible una versión con 112 alérgenos (ISAC112). La pequeña cantidad de material requerida para el proceso de identificación (de 0.1 a 1 ng) permite el uso de moléculas naturales altamente purificadas y recombinantes.

La evaluación de múltiples alergias alimentarias requiere un enfoque diferente a las situaciones en las que están involucrados uno o más alimentos. La multisensibilización alimentaria implica la presencia de alérgenos de estructura similar, que se encuentran en diferentes fuentes alérgicas, entre especies o dentro de ellas.

El uso de pruebas con extractos naturales (mezcla de proteínas) puede identificar anticuerpos sin reactividad clínica secundaria. La medición de IgE para componentes proteicos permite una mejor comprensión del repertorio de sensibilización individual y puede llevarse a cabo para uno solo, para algunos o múltiples componentes. La evaluación múltiple está indicada en pacientes polisensibilizados a alimentos derivados de plantas (frutas, trigo, soya, nueces, mani), pólenes o látex.<sup>9</sup>

En este contexto, el ISAC permite conocer el perfil del paciente polisensibilizado y el posible pronóstico de la gravedad de las reacciones, en función del componente reactivo (proteínas de almacenamiento, LTP, PR-10, profilinas, CCD). Sus resultados son comparables con ImmunoCAP (fluorescencia enzimática), a pesar de la menor sensibilidad (método semicuantitativo). Las

situaciones en las que intervienen alérgenos alimentarios y respiratorios representan la indicación precisa para la evaluación por parte del ISAC.<sup>7</sup>

La identificación del componente alérgico responsable de las reacciones supone una herramienta importante para confirmar la información y gravedad de los síntomas, historia natural de la enfermedad, posibilidad de reactividad cruzada y clínica (marcadores de alergia). Las prolaminas son las principales proteínas de almacenamiento de la mayor parte de las semillas de los cereales y, como tales, son importante fuente de proteína en la dieta humana y animal. Además, las prolaminas de trigo son los principales componentes del gluten, cuyas propiedades determinan la calidad de la harina de trigo utilizada en diversos procesos tecnológicos, incluida la panificación. Las albúminas 2S, un grupo de proteínas de almacenamiento presentes en vegetales, nueces, legumbres, semillas oleaginosas y cereales se asocian con síntomas clínicos importantes.<sup>10</sup>

Las profilinas son ejemplos de panalérgenos identificados en el polen de árboles, pastos y malezas, en alimentos derivados de plantas y en látex. Así, la sensibilización a la profilina es un factor de riesgo para reacciones alérgicas a múltiples fuentes de polen y alérgenos alimentarios.<sup>11</sup> Puesto que son sensibles a la desnaturalización por calor y la digestión gástrica, la sensibilización rara vez ocurre a través del conducto gastrointestinal. De hecho, el consumo de alimentos crudos en pacientes sensibilizados por la profilina provoca reacciones leves y restringidas a la cavidad oral.<sup>12</sup>

Las proteínas de transferencia de lípidos (LTP) son parte de la superfamilia de las prolaminas y se encuentran en la piel de las frutas, pero no en la pulpa, lo que puede explicar por qué algunas personas sensibilizadas con las LTP pueden tolerar más fácilmente las frutas después de haberlas pelado.<sup>13</sup> También se han identificado LTP en polen de árboles y malezas, alimentos derivados de plantas y látex, lo que justifica la posible reactividad entre especies. El potencial alérgico de las LTP está influenciado por varios factores: ubicación

y estabilidad frente a la desnaturalización proteolítica y térmica. Además, pueden actuar como auténticos alérgenos alimentarios, capaces de inducir síntomas severos, pues resisten el procesamiento de los alimentos y el ambiente agresivo del aparato gastrointestinal (alta resistencia al calor y proteólisis).<sup>14</sup> La sensibilización a las LTP se caracteriza por diferencias geográficas y es probable que múltiples vías de sensibilización se asocian con síntomas graves de alergia alimentaria.

## REFERENCIAS

1. Yunginger JW, Ashlstedt S, Ownby DR, et al. Quantitative IgE antibody assays in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 1077-84.
2. Hamilton RG, Adkinson NF. In vitro assays for the diagnosis of IgE-mediated disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 213-25.
3. Szeinbach SL, Barnes JH, et al. Precision and accuracy of commercial laboratories' ability to classify positive and/or negative allergen-specific IgE results. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001; 86: 373-81.
4. Wood RA, Segall N, et al. Accuracy of IgE antibody laboratory results. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007; 99: 34-41.
5. Wang J, Godbold J, et al. Correlation et al of serum allergy (IgE) tests performed by different assay systems. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 1219-24.
6. Chong Neto HJ, Rosário NA. Studying specific IgE: in vivo or in vitro. *Allergol Immunopathol* 2009; 37: 31-5.
7. Ansotegui IJ, Melioli G, et al. IgE Allergy diagnostics and other relevant tests in Allergy, a World Allergy Organization position paper. *World Allergy Organ J* 2020; 13: 100080.
8. Canonica GW, Ansotegui IJ, et al. A WAO - ARIA - GA<sup>2</sup>LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *World Allergy Organ J* 2013; 6 (1): 17.
9. Santos AF, Brough HA. Making the Most of In Vitro Tests to Diagnose Food Allergy. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2017; 5 (2): 237-248.
10. Moreno FJ, Clemente A. 2S Albumin Storage Proteins: What Makes them Food Allergens? *The Open Biochemistry Journal* 2008; 2: 16-28.
11. Asero R, Mistrello G, et al. Detection of clinical markers of sensitization to profilin in patients allergic to plant-derived foods. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 427-432.
12. Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 821-830.
13. Fernandez-Rivas M, Cuevas M. Peels of Rosaceae fruits have a higher allergenicity than pulps. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 1239-1247.
14. Zuidmeer L, van Ree R. Lipid transfer protein allergy: primary food allergy or pollen/food syndrome in some cases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7: 269-273.