

Técnicas *in vitro*

Antonio Peláez Hernández, Rubén Félix Toledo

Como en cualquier otro proceso de naturaleza alérgica mediada por un mecanismo inmunológico de hipersensibilidad inmediata, los test diagnósticos *in vitro* de mayor utilidad son los basados en la determinación de la inmunoglobulina E, y en segundo lugar, aquellos que se basan en las consecuencias de la interacción entre el alérgeno y la IgE específica fijada a la superficie de las células sanguíneas sensibilizadas, como son el test de degranulación de basófilos y el test de liberación de histamina.

1. IGE

El descubrimiento en 1967 de la IgE presentó un enorme avance para el conocimiento y diagnóstico de las enfermedades alérgicas. A pesar del tiempo transcurrido su diagnóstico *in vitro* se apoya fundamentalmente en la cuantificación de esta inmunoglobulina.

1.1. IGE SÉRICA TOTAL

Su determinación es llevada a cabo por diversos métodos de inmunoanálisis y aunque en un principio se utilizaron casi exclusivamente las técnicas isotópicas de RIA, hoy en día la mayoría de los laboratorios utiliza el enzimoimmunoanálisis ya que en la práctica son igual de eficaces con la ventaja de no precisar isótopos. La mayoría de los métodos se basan en el Paper Radioinmuno-sorbent Test (PRIST). En la actualidad se emplean en la mayoría de los laboratorios métodos automatizados como el UniCAP

de Pharmacia Diagnostics, sobre todo en Europa y el AlaSTAT e Immulite de Diagnostic Products Corporation (DPC) en EEUU.

En los sujetos normales la IgE se incrementa desde el nacimiento hasta la adolescencia decayendo luego lentamente hasta estabilizarse en la década de los 20 a los 30 años. En nuestro medio se consideran cifras elevadas de IgE las que superan las 100-150 KU/l en los adultos.

El interés de la cuantificación de los niveles de IgE sérica total en la rinitis alérgica es escaso. Se calcula que del 20% al 30% de pacientes, como mínimo, presentan cifras dentro del rango de la normalidad¹. En un estudio de Stevens² únicamente el 49% de pacientes afectados de rinitis alérgica presentaban niveles elevados de IgE total, que también se encontraba elevada en el 28% de aquellos que sufrían rinitis no alérgica. En general las cifras suelen ser superiores en aquellos pacientes que asocian asma a su rinitis. La posibilidad de hallar valores altos aumenta con la proximidad del contacto antigénico.

En conclusión la determinación de los niveles de IgE total tiene muy poca especificidad y es de escasa utilidad por lo que no debe emplearse rutinariamente en el estudio de las rinitis alérgicas.

1.2. IGE SÉRICA ESPECÍFICA

El primer método empleado para su determinación fue el Radio-Alergo-Sorbent Test (RAST) del laboratorio Pharmacia, pero en estos momentos existen otros muchos, aunque en nuestro medio quizás el más uti-

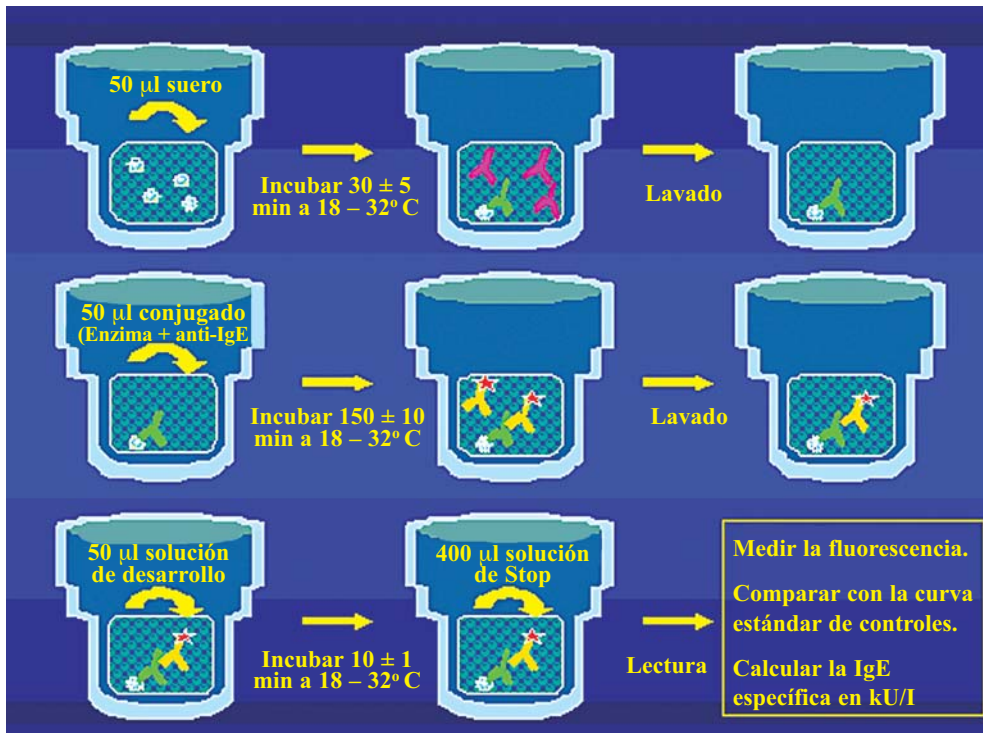


Figura 1. Técnica de UniCAP-System de Pharmacia. Proceso explicado en el texto.



Figura 2. Detalle de la Técnica de UniCAP-System de Pharmacia.

lizado es el UniCAP, una modificación del RAST que le aventaja en sensibilidad manteniendo una adecuada especificidad. Como en el caso de la IgE total, suele utilizarse más ampliamente la variante enzimática, en detrimento de la isotópica.

La técnica UniCAP-System de Pharmacia es un Fluoroenzimo-inmunoensayo (figuras 1 y 2) en el que la fase sólida consiste en un polímero hidrofílico de superficie tridimensional, poroso y elástico de celulosa encapsulado en un soporte de plástico. Este carrier está activado con bromuro de cianógeno y permite una capacidad de fijación tres veces superior al antiguo método RAST de celulosa y unas condiciones óptimas de reacción, incluyendo corto espacio de difusión, de tal manera que el punto de equilibrio puede alcanzarse en tan sólo 20 minutos. El alérgeno siempre está en condiciones de exceso, pegado a la celulosa. Para proceder con la técnica necesitamos los reactivos, el suero o plasma del paciente, un software para la elaboración de los ensayos y un equipo de procesamiento automático. Tras el diseño del estudio, se procede a introducir 50 µl de suero en el pocillo del UniCAP y se deja incubar unos 30 minutos a

TABLA I. Evaluación como clases de IgE Específica

Clase	IgEkU/l	Nivel de Ac
0	< 0,35	Ausente o no detectable
1	$0,35 \leq x < 0,7$	Bajo
2	$0,7 \leq x < 3,5$	Moderado
3	$3,5 \leq x < 17,5$	Alto
4	$17,5 \leq x < 50$	Muy alto
5	$50 \leq x < 100$	Muy alto
6	≥ 100	Muy alto

temperatura de entre 18 y 32° C, para que los anticuerpos IgE específicos se unan al antígeno. A continuación se produce un lavado para eliminar el resto de anticuerpos que no se han fijado. En el siguiente paso se añaden 50 µl de solución de conjugado (anticuerpos anti-IgE obtenidos de conejo unidos a la enzima beta-galactosidasa) y se deja incubar 150 minutos para que se unan a la IgE específica, tras lo que se produce otro lavado para eliminar el exceso de anti-IgE. Seguidamente se añaden 50 µl de la solución de desarrollo (4-metil-lumbelliferil-beta-galactósido) y se incuba durante 10 minutos. En este momento se produce una reacción enzimática que produce fluorescencia. A los 10 minutos se añade la solución de stop (carbonato sódico) para que se paralice la reacción. Por último queda medir la fluorescencia, que debe realizarse inmediatamente tras la reacción, aunque permanece estable para la lectura durante 24 horas. El resultado de cada problema debe extrapolarse a partir de la curva patrón de referencia (estándares de IgE calibrados por medio del 2º Preparado de Referencia Internacional (PRI) 75/502 para inmunoglobulina IgE de suero humano de la OMS) (figura 3). El resultado se expresa en KU/l. Valores < 0,35 kU/l representa niveles ausentes o indetectables de anticuerpo-alergeno específicos, y se evalúan como clases de IgE específica (tabla I).

Otros métodos automatizados para la cuantificación de IgE específica, que se suelen utilizar mayoritariamente en EEUU son las técnicas AlaSTAT e Immulite de Diagnostic Products Corporation (DPC). En estas técnicas tiene lugar una primera reacción en fase líquida. Se acoplan los alérgenos espe-

cíficos a una estructura polimérica de carbohidratos mediante uniones químicas, haciendo accesibles todos los epítomos a las IgE del suero del paciente, lo que permite la unión eficaz a estas moléculas de IgE e incrementa la especificidad del análisis. Posteriormente se une la cadena de carbohidratos al pocillo de la microplaca (AlaSTAT) (figura 4) o a una bola de poliestireno (Immulite) (figura 5). Se añade el conjugado (Anti-IgE) con una enzima, que se une a la IgE específica, se lava y se añade el sustrato, que inicia una reacción colorimétrica que se medirá con un espectrofotómetro (AlaSTAT) o una reacción quimioluminescente, cuya emisión de luz es detectada por un tubo fotomultiplicador (Immulite). El rango de detección del AlaSTAT es de 0.35 a 100 kU/L, igual que el UniCAP, mientras que el de Immulite es de 0.1 a 100 kU/L³.

La determinación de la IgE específica es de una mayor utilidad que la de la IgE total. Correlaciona bien con el resultado de los test cutáneos, si se utilizan extractos alérgicos estandarizados⁴. En general la sensibilidad del UniCAP es inferior a la de las pruebas cutáneas, similar a la del RAST⁴ y superior a la del AlaSTAT⁵. La especificidad es similar a la del RAST⁴ y a la del AlaSTAT⁵ y mayor a la de las pruebas cutáneas^{4,5}. Estudios que comparan UniCAP con Immun-

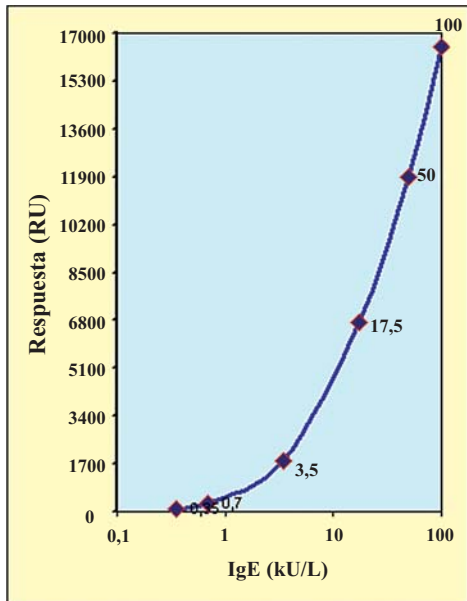


Figura 3. Curva patrón de los materiales de referencia (estándares de IgE calibrados por medio del 2º Preparado de Referencia Internacional (PRI) 75/502 para inmunoglobulina IgE de suero humano de la OMS).

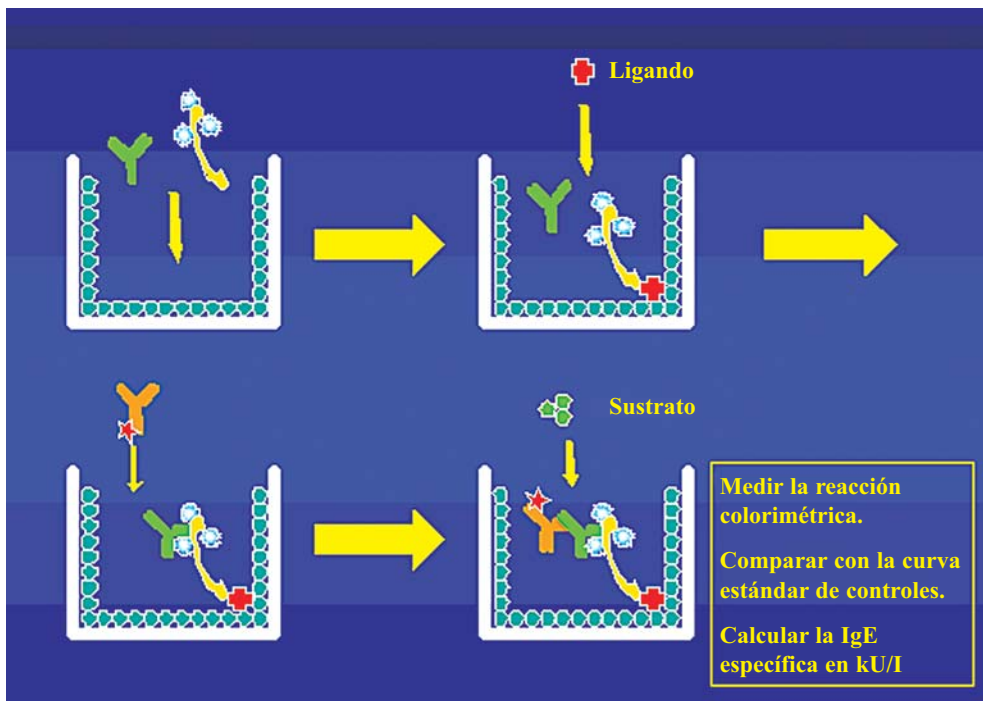


Figura 4. Técnica de AlaSTAT de Diagnostic Products Corporation (DPC). *Proceso explicado en el texto.*

lite concluyen que este último no ofrece grandes ventajas sobre el UniCAP.

En conclusión, la determinación de la IgE sérica específica es un método complementario de las pruebas cutáneas a las que no puede sustituir. Su cuantificación no es necesaria, cuando el diagnóstico es claro en base a la anamnesis y el resultado de los test cutáneos. Tiene utilidad sin embargo, cuando no es posible realizar las pruebas cutáneas (necesidad de ingesta de medicación que interfiere con ellas) o su interpretación es difícil (dermopatías severas). Puede ser también de utilidad, en pacientes multisensibilizados, a la hora de determinar la importancia relativa de cada uno de los alérgenos con vistas al establecimiento de la inmunoterapia.

1.3. IGE ESPECÍFICA NASAL

Con fines fundamentalmente de investigación, se han llevado a cabo determinaciones de los niveles de IgE específica en las secreciones nasales, habiéndose encontrado una buena correlación entre los test cutáneos, los niveles de IgE sérica específica y el RAST en las secreciones nasales. Parece

claro que la mucosa nasal es capaz de sintetizar IgE específica^{7,8}, y desde el punto de vista teórico es posible que un paciente con sintomatología alérgica de inicio reciente, presente test cutáneos negativos e IgE sérica en niveles normales, pero cifras de IgE en secreción nasal elevadas.

De todos modos en la práctica y en el momento actual, la determinación de los niveles de IgE específica en secreción nasal no se utiliza rutinariamente con fines diagnósticos dado su coste y laboriosidad técnica.

2. DEGRANULACIÓN DE BASÓFILOS

Este método diagnóstico fue introducido en 1962 por Shelley⁹ y se basa en la pérdida de las granulaciones, de característico color rojo-violáceo, de los basófilos tras su incubación con el correspondiente alérgeno específico.

Su correlación con los niveles de IgE sérica específica y las pruebas cutáneas es muy buena para ácaros¹⁰, pólenes¹¹ y otros alérgenos siempre que su calidad sea óptima¹⁰.

A pesar de todo y dada su complejidad técnica no puede ser considerado un test de

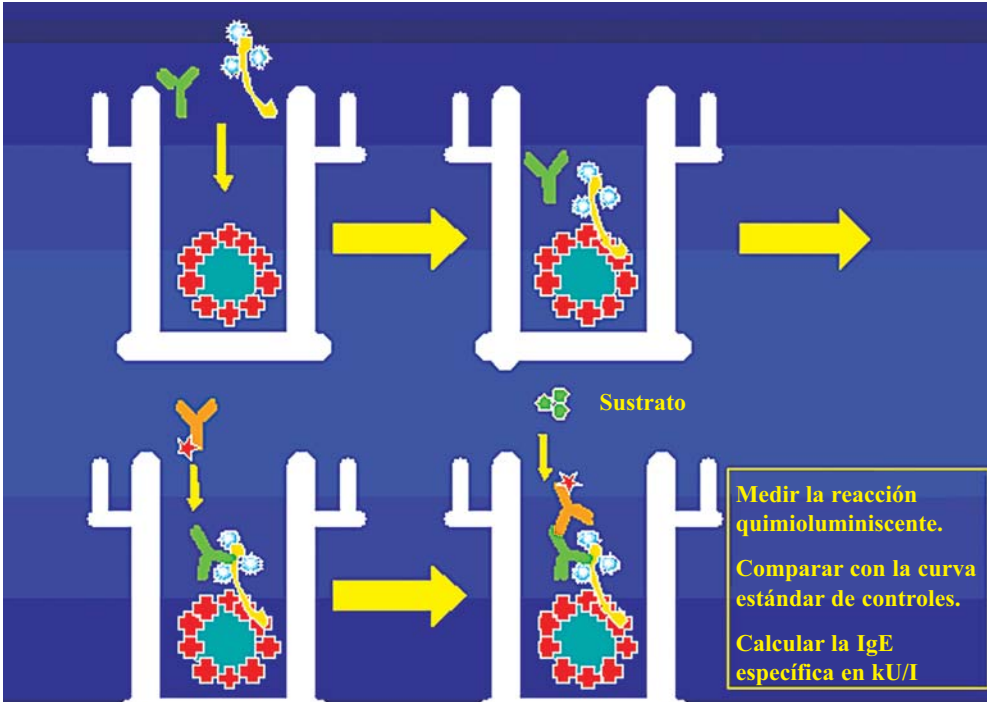


Figura 5. Técnica de Immulite de Diagnostic Products Corporation (DPC). Proceso explicado en el texto.

rutina, sino únicamente útil con fines de investigación.

3. TEST DE LIBERACIÓN DE HISTAMINA

Cuando se incuban basófilos de pacientes alérgicos, con el alérgeno específico al que están sensibilizados, se produce una degranulación y por tanto liberación de mediadores, entre ellos la histamina, que puede ser medida por métodos fluorimétricos o de radioinmunoanálisis.

La sensibilidad de la prueba es similar a la de las pruebas cutáneas^{12,13} y superior a la del RAST¹⁴, pero adolece del mismo problema que la degranulación de basófilos, su gran complejidad técnica que la hacen poco útil en la práctica clínica, quedando reservada casi exclusivamente a fines de investigación.

4. MEDIADORES SECRETADOS DURANTE LAS REACCIONES ALÉRGICAS

El desarrollo de inmunoensayos muy específicos y sensibles ha hecho posible la determinación de diversos mediadores libe-

rados durante la reacción alérgica: PGD₂, CysLT, quininas y ECP, que pueden ser medidos en sangre, orina y secreciones nasales. Estos mediadores pueden cuantificarse inicialmente o tras la estimulación con el alérgeno¹⁵. Constituyen un instrumento de investigación importante pero no se aplica al diagnóstico sistemático de la alergia.

5. CITOLOGÍA

Existen diversas técnicas para la obtención de muestras para el estudio de las células nasales, pero generalmente se lleva a cabo mediante el estudio de las secreciones nasales o el lavado nasal, tal como se describe en otro capítulo de este libro. La valoración de estas muestras debe ser llevada a cabo por personal experimentado. Su interés clínico es generalmente escaso por lo que no es utilizada como técnica de rutina en el diagnóstico de las rinitis alérgicas¹⁶. Sin embargo puede ser útil para distinguir las rinopatías inflamatorias de las no inflamatorias, distinguir entre rinitis alérgica, no alérgica e infecciosa, distinguir entre rinitis víricas y bacterianas y seguir la respuesta al tratamiento¹⁷.

6. DETERMINACIÓN DE EOSINOFÍLIA

El resultado del recuento de eosinófilos sanguíneos es de poca utilidad para el diagnóstico de las rinitis alérgicas, puesto que estadísticamente, no existen diferencias significativas en comparación con el grupo control de sujetos no alérgicos. Cuando la rinitis se asocia al asma, si se aprecian cifras significativamente elevadas con respecto al grupo control, aunque casi siempre en porcentajes comprendidos entre el 10% y el 20% del total de linfocitos circulantes. Ocasionalmente, cuando el paciente se encuentra en una fase de severa agudización clínica, pueden detectarse eosinofilia elevadas en pacientes efectos de rinitis alérgicas, incluso en aquellos que no padecen asma.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. CONTRERAS FJ, MARTÍN F, OJEDA JA. *Diagnóstico de rinitis alérgica*. En: Grupo Jarpio, ed. Patología Alérgica. Rinitis alérgica. Madrid: Ediciones CEA, 1991; 29-35.
2. STEVENS WJ, VERMIERE PA. *Serum IgE determination in patients suffering from asthma, rhinitis, cough and various combinations of these disorders*. Prog Respir Re 1980; 14: 51.
3. 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 Clin Lab Sci 2004; 34(1): 67-74.
4. EWAN PW, COOTE D. *Evaluation of a capsulated hydrophilic carrier polymer (the ImmunoCAP) for measurement of specific IgE antibodies*. Allergy 1990; 45(1): 22-29.
5. VAN HOUTE AJ, BARTELS PC. *Comparative evaluation of the Pharmacia CAP system and the DPC AlaSTAT system for in vitro detection of allergen-specific IgE with the skin prick test*. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1992; 30(2): 101-105.
6. COSTONGS GM, JANSON PC, HERMANS WJ, VAN OERS RJ, LEERKES B. *Evaluation of performance characteristics of automated measurement systems for allergy testing*. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1995; 33(5): 295-305.
7. YUNGINGER JW, GLEICH GJ. *Seasonal changes in serum and nasal IgE concentrations*. J Allergy Clin Immunol 1973; 51: 174.
8. SMALL P, BARRETT D. *Measurement of antigen-specific IgE in nasal secretions of patients with perennial rhinitis*. Ann Allergy 1985; 55: 68.
9. SHELLEY WB. *New serological test for allergy in man*. Nature 1962; 195: 1181-1183.
10. LEYNADIER F, LUCE H, DRY J. *La dégranulation des basophiles humains: Technique et intérêt clinique*. Le Pharmacien Biologiste 1980; 14: 221-226.
11. DRY J, LEYNADIER F, LUCE H. *Corrélation entre test de dégranulation des basophiles humains et test cutané au cours de la pollinose (95 sujets)*. Sem Hôp Paris 1980; 56: 719-722.
12. SIRINGANIAN RP, BRODSKY MJ. *Automated histamine analysis for in vitro allergy testing I. A method utilizing allergen-induced histamine release from sole blood*. J Allergy Clin Immunol 1976; 57: 525-540.
13. SIRINGANIAN RP. *Automated histamine analysis for in vitro allergy testing II. Correlation of skin test results with in vitro whole blood histamine release in 82 patients*. J Allergy Clin Immunol 1977; 9: 214-222.
14. HYDIK IB, MA WA. *Basophil histamine release. Assays and interpretation*. Clin Rev Allergy 1988; 6: 141-162.
15. WANG D, CLEMENT P, SMITZ J, DE-WAELE M, DERDE MP. *Correlation between complaints, inflammatory cells and mediator concentrations in nasal secretions after nasal allergen challenge and during natural allergen exposure*. Int Arch Allergy Immunol 1995; 106: 278-285.
16. CROBACH M, HERMANS J, KAPTEIN A, RIDDERI PHOFF J, MULDER J. *Nasal smear eosinophilia for the diagnosis of allergic rhinitis and eosinophilic non-allergic rhinitis*. Scand J Prim Health Care 1996; 14: 116-121.
17. MELTZER E, ORGEL H, JALOWASKI A. *Nasal cytology*. En: Nacleiro R, Durham S, Mygind N, ed. Rhinitis: mechanisms and management. Nueva York: Marcel Dekker, 1999; 175-202.