



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



***UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA***

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA  
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

# **ENSAYO IN VITRO PARA LA DETECCIÓN MULTIPLEXADA DE ALERGIAS ALIMENTARIAS**

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Curso académico: 2017-2018

Valencia, julio 2018

**Autora:** Natalia Casañ Raga

**Tutor:** Luis Antonio Tortajada Genaro

**Cotutor:** Sergi Morais Ezquerro

**Director experimental:** Salvador Mas García



# ENSAYO *IN VITRO* PARA LA DETECCIÓN MULTIPLEXADA DE ALERGIAS ALIMENTARIAS

Valencia, julio 2018

## RESUMEN

Los alérgenos alimentarios pueden provocar reacciones adversas de hipersensibilidad de tipo I. Este proceso presenta una elevada prevalencia que puede afectar a la población sensibilizada vía contacto, ingestión o inhalación del alérgeno. En la actualidad, esta enfermedad afecta al 2% de los adultos y el 6% de los niños, lo que representa un impacto significativo en la calidad de vida y en los costes sanitarios asociados (Iglesias, 2018). Paralelamente, el sector alimentario ha realizado importantes inversiones, esfuerzos y mejoras para implementar programas de control de alérgenos. Desde un enfoque holístico de la alergia alimentaria, es necesario integrar en este control la evaluación del impacto de los alimentos en la salud de los consumidores.

La creciente demanda de información de salud sobre los problemas alérgicos genera la necesidad de disponer de mejores métodos de detección no invasivos y sensibles que proporcionen resultados fiables de manera rápida y sencilla (Worm et al., 2018). En este trabajo fin de grado se contribuye al desarrollo de un ensayo multiplexado que permite la determinación simultánea de inmunoglobulinas E e inmunoglobulina G específica en suero sanguíneo para doce alérgenos alimentarios.

La aproximación consiste en un biosensado óptico basado en inmunoensayos no competitivos. La inmovilización de los alérgenos en formato de micromatriz se realiza sobre la superficie de un disco compacto mediante un dispensador de bajo volumen y sin contacto. Tras la incubación de la muestra y el revelado de la inmunointeracción, se procede a la lectura de los resultados mediante un lector de discos digitales ópticos en modo reflexión. El procesado de las imágenes capturadas proporciona señales específicas para cada una de las moléculas diana, que pueden ser correlacionadas con su concentración. El ensayo en formato micromatriz tiene buenas prestaciones analíticas, siendo el límite de detección 0,31 UI/mL y de cuantificación 0,41 UI/mL, en el caso de las IgE y de 0,04 y 0,23 ng/ $\mu$ L para el inmunoensayo de IgG, respectivamente. El sistema se ha evaluado mediante el análisis de 37 muestras de suero sanguíneo de pacientes alérgicos y 9 individuos control.

**PALABRAS CLAVE:** alergia alimentaria; inmunoglobulina E; inmunoglobulina G; biosensor; micromatriz.

**Autora:** Natalia Casañ Raga

**Tutor:** Luis Antonio Tortajada Genaro

**Cotutor:** Sergi Morais Ezquerro

**Director experimental:** Salvador Mas García

# **ASSAIG *IN VITRO* PER A LA DETECCIÓ MULTIPLEXADA D'AL·LÈRGIES ALIMENTÀRIES**

València, juliol 2018

## **RESUM**

Els al·lèrgens alimentaris poden provocar reaccions adverses de hipersensibilitat de tipus I. Aquest procés presenta una elevada prevalença que pot afectar a la població sensibilitzada via contacte, ingestió o inhalació de l'al·lergen. En l'actualitat, aquesta enfermetat afecta al 2% dels adults i al 6% dels xiquets, el que representa un impacte significatiu en la qualitat de vida i en els costos sanitaris associats (Iglesias, 2018). Paral·lelament, el sector alimentari ha realitzat importants inversions, esforços i millores per implementar programes de control d'al·lèrgens. Des d'un enfocament holístic de l'al·lèrgia alimentària, cal integrar en aquest control l'avaluació de l'impacte dels aliments en la salut dels consumidors.

La creixent demanda d'informació de salut sobre els problemes al·lèrgics genera la necessitat de disposar de millors mètodes de detecció no invasius i sensibles que proporcionin resultats fiables de manera ràpida i senzilla (Worm et al., 2018). A aquest treball final de grau es contribueix al desenvolupament d'un assaig multiplexat que permet la determinació simultània en sèrum sanguini d'immunoglobulines E i immunoglobulina G específica per a dotze aliments al·lèrgics.

L'aproximació consisteix en un biosensat òptic basat en immunoassaigs no competitiu. La immobilització dels al·lèrgens en format de micromatriu es realitza sobre la superfície d'un disc compacte mitjançant un dispensador de baix volum i sense contacte. Després de la incubació de la mostra i el revelat, es procedeix a la lectura dels resultats mitjançant un lector de discos digitals òptics en mode reflexió. El processat de les imatges capturades proporciona senyals específiques per a cada un de les molècules diana, que poden ser correlacionades amb la seua concentració. L'assaig en format micromatriu té bones prestacions analítiques, sent el límit de detecció 0,31 UI/mL i de quantificació 0,41 UI/mL, en el cas de les IgE i de 0,04 i 0,23 ng/mL per el immunoassaig d'IgG. El sistema s'ha avaluat mitjançant l'anàlisi de 37 mostres de sèrum sanguini de pacients al·lèrgics i 9 individus control.

**PARAULES CLAU:** al·lèrgia alimentària; immunoglobulina E; immunoglobulina G; biosensor; micromatriu.

**Autora:** Natalia Casañ Raga

**Tutor:** Luis Antonio Tortajada Genaro

**Cotutor:** Sergi Morais Ezquerro

**Director experimental:** Salvador Mas García

# IN VITRO ASSAY FOR MULTIPLEXED DETECTION OF FOOD ALLERGIES

Valencia, July 2018

## ABSTRACT

Food allergens can cause adverse reactions of type I hypersensitivity. This process has a high prevalence that can induce a reaction in the person by contact, ingestion or inhalation. Currently, it affects 2% of adults and 6% of children, which represents a significant impact on life quality and associated health costs (Iglesias, 2018). In parallel, the food industry has made significant investments, efforts and improvements to implement allergen control programs. From a holistic approach to food allergy, it is necessary to integrate in this control the evaluation of the food impact on the health of consumers.

The growing demand for health information about allergic problems generates the need for better non-invasive and sensitive detection methods that provide reliable results quickly and easily (Worm et al., 2018). The objective of this study is to contribute to the development of a multiplexed method that enables simultaneous detection of specific immunoglobulin E and G for twelve food allergens.

The approach consists of an optical biosensing based on non-competitive immunoassays. The immobilization of the probes in microarray format is carried out on the surface of a compact disc by means of a low volume, non-contact arrayer. After the incubation of the sample and the development, the results are read through a digital optical disc reader in reflection mode. The processing of the captured images provides specific signals for each of the target molecules, which can be correlated to its concentration. The assay in microarray format has good analytical performance, with a detection limit of 0.31 IU/mL and a quantification of 0.41 IU/mL, in the case of IgE and 0.04 and 0.23 ng/ $\mu$ L for the IgG immunoassay. The system has been evaluated by analyzing 37 blood serum samples from allergic patients and 9 control individuals.

**KEY WORDS:** food allergy; immunoglobulin E; immunoglobulin G; biosensor; microarray.

**Author:** Natalia Casañ Raga

**Tutor:** Luis Antonio Tortajada Genaro

**Co-tutor:** Sergi Morais Ezquerro

**Experimental director:** Salvador Mas García

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que de una forma u otra me han ayuda en la realización de este trabajo fin de grado.

En primer lugar, a Luis A. Tortajada, tutor del trabajo, por su implicación, profesionalidad y confianza en mí desde el primer momento. Eres una persona a la que admiro. Y a Sergi Morais, cotutor del trabajo, por su dedicación y preocupación durante todo este período.

En segundo lugar, a Salva, director experimental. Sinceramente, no sé qué hubiese hecho sin tu infinita paciencia ante mis infinitas cosas que preguntarte. Has sido, sin duda, un pilar fundamental.

Por último, a mi familia y amigos. Por estar ahora y siempre.

Gracias.

# Índice

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Alérgenos .....	1
1.2. Alergia alimentaria.....	3
1.3. Métodos de detección.....	8
1.4. Métodos de detección alternativos .....	11
2. OBJETIVOS .....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
3.1. Reactivos .....	15
3.2. Purificación de Omalizumab .....	16
3.3. Muestras .....	16
3.4. Protocolo general.....	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1. Estudio de condiciones del inmunoensayo para la determinación de IgE.....	19
4.2. Cuantificación IgE específicas de los pacientes.....	24
4.3. Estudio de condiciones del inmunoensayo para la determinación de IgG .....	28
4.4. Cuantificación IgG específicas de los pacientes .....	31
4.5. Interpretación de los resultados.....	32
5. CONCLUSIONES .....	34
6. BIBLIOGRAFÍA.....	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Clasificación de la hipersensibilidad alimentaria. Fuente: Armentia y Vivas, 2018.

**Figura 2.** Estructura básica de un anticuerpo.

**Figura 3.** Fases de la respuesta alérgica inmediata. Fase de sensibilización (a) y de reacción (b).

**Figura 4.** Algoritmo para el diagnóstico de alergia alimentaria. SIgE, inmunoglobulina E específica; SPT, prueba de punción cutánea; OFC, prueba de provocación oral. Fuente: Worm et al., 2018.

**Figura 5.** Técnica de punción cutánea (a) y técnica de intradermorreacción (b). Fuente: Redondo, 2018.

**Figura 6.** ImmunoCAP. Fuente: BIOAGILYTIX, 2018.

**Figura 7.** Biochip ImmunoCAP ISAC. Fuente: PHADIA, 2012.

**Figura 8.** Tecnología disco compacto. Lectura de los resultados mediante un lector de discos digitales óptico. 1, DVD; 2, micromatriz; 3, cabezal de lectura del detector de discos; 4, fotodiodo detector. Fuente: Morais et al., 2008.

**Figura 9.** Columna de purificación con proteína G. Fuente: GE HEALTHCARE.

**Figura 10.** Sistema de impresión Biodot (a) y representación esquemática de las micromatrices en la superficie del DVD (b).

**Figura 11.** Prototipo de lector de discos digitales ópticos (Lab-Player).

**Figura 12.** Descripción gráfica del inmunoensayo no competitivo para la cuantificación de IgE total (a) e IgE específica (b).

**Figura 13.** Intensidades obtenidas para una concentración 100 UI/mL de IgE a diferentes concentraciones de impresión del anticuerpo de captura Omalizumab: 10, 20 y 40 ng/ $\mu$ L y diferentes diluciones de anticuerpo de revelado: 1/200-1/1600. Réplicas: 3.

**Figura 14.** Señal registrada en función de la concentración de IgE a una concentración de anticuerpo de captura de 20 ng/ $\mu$ L y diluciones de anticuerpo de revelado (pAb-HRP): 1/200, 1/400, 1/800 y 1/1600 (a). Réplicas: 3.

**Figura 15.** Señales registradas para diferentes concentraciones de IgE en tres matrices distintas: suero control, suero control diluido 1/2 y PBST. Réplicas: 3.

**Figura 16.** Efecto en la señal de la concentración de alérgeno (extracto proteico de leche de vaca) inmovilizado en la superficie del disco incubándolo con el suero de un paciente alérgico a leche de vaca. Réplicas: 3

**Figura 17.** Perfil de reconocimiento de pacientes alérgicos a leche (L), cebada (C) y gamba (G) y de pacientes multialérgicos generados a partir de estos en diferentes proporciones. Réplicas: 4.

**Figura 18.** Intensidad de las señales obtenidas al analizar pacientes multialérgicos mezclados en diferentes proporciones. Mezcla de paciente alérgico a la leche (L) y paciente alérgico a la cebada (C) (a), mezcla de paciente alérgico a la leche y paciente alérgico a la gamba (G) (b) y mezcla paciente alérgico a la cebada y paciente alérgico a la gamba (c). Réplicas: 4.

**Figura 19.** Representación esquemática de la distribución de los componentes alérgicos (extractos proteicos y proteínas purificadas) y anticuerpos en formato micromatriz.

**Figura 20.** Diagrama de dispersión en el que se muestra la correlación de Pearson entre los valores obtenidos mediante ImmunoCAP e inmunodisco. Réplicas: 3.

**Figura 21.** Diagrama de puntos representando los valores de intensidad de la señal para cada una de las sensibilizaciones de los distintos pacientes, agrupadas en función de los resultados del método de referencia ImmunoCAP. En el eje X se indican los pacientes diagnosticados como negativos (0) y positivos (1) a una determinada fuente alérgica. La barra horizontal indica el umbral de diagnóstico equivalente a 0,35 UI/mL. Réplicas: 3.

**Figura 22.** Imágenes obtenidas de 6 micromatrices de 14 reactivos donde se muestran los perfiles de reconocimiento de un individuo no atópico (a) y de pacientes con alergia a: LTP de melocotón (b), a LTP de melocotón y profilina (c), a harina de trigo y cebada (d), a lenguado y nuez (e) y a cebada, profilina y ovoalbúmina (f). Réplicas: 3.

**Figura 23.** Descripción del ensayo no competitivo para la cuantificación de IgG totales (a) e IgG específicas (b) revelando con TMB y la cuantificación de IgG totales (c) e IgG específicas (d) revelando con plata.

**Figura 24.** Intensidad de señal para el revelado enzimático (a) y metalográfico (b) en función de la concentración de impresión del anticuerpo de captura (GAH) y la dilución de anticuerpo primario (MAH o Gold  $\alpha$ -IgG) para una concentración de IgG de 1 ng/ $\mu$ L. Réplicas: 3.

**Figura 25.** Comparación de los sistemas de amplificación de la señal: revelado enzimático y metalográfico.

**Figura 26.** Representación de las concentraciones de IgG (ng/ $\mu$ L) específica obtenidas a partir de muestras de suero sanguíneo de pacientes alérgicos, agrupados según los alérgenos alimentarios recogidos en la normativa de la UE.

**Figura 27.** Clasificación de los 37 pacientes por su relación IgE e IgG.

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Clasificación de los diferentes tipos de hipersensibilidades según Gell y Coombs.  
Fuente: Kindt et al., 2007.

**Tabla 2.** Clasificación de RAST (del inglés, *radioallergosorbent test*) que diferencia 6 clases (0-6) en función del nivel de IgE específicas. Fuente: Almeida, 2016.

**Tabla 3.** Condiciones del inmunoensayo para la optimización de los distintos anticuerpos usados en los métodos enzimático y metalográfico para la determinación de IgG.

**Tabla 4.** Umbral de IgG específicas para los distintos alérgenos alimentarios basados en el promedio de sueros de pacientes no alérgicos.

### 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la alergia alimentaria se ha convertido en un importante problema clínico y social. Se trata de una patología que desencadena síntomas molestos y disminuye la calidad de vida de quienes la padecen, tanto por el cuidado de su salud como por su vida familiar, social y/o escolar, además de suponer un elevado coste individual y sanitario (Iglesias, 2018).

La alergia alimentaria se define como una hipersensibilidad alérgeno-específica mediada por el sistema inmune, que ocurre de forma sistemática al exponerse a un alérgeno dado (Sicherer, 2011) y que ocasiona enfermedad (Halken y Muraro, 2014).

#### 1.1. Alérgenos

El término alérgeno se refiere, de manera específica, a los antígenos no parasitarios capaces de promover las reacciones alérgicas inmediatas en los individuos alérgicos tras una segunda exposición (Kindt et al., 2007). Los alérgenos alimentarios, que generalmente son proteínas, pero a veces moléculas de bajo peso molecular, denominados haptenos, pueden ser reconocidos por las células inmunitarias induciendo una reacción de hipersensibilidad (Burks et al., 2012).

##### 1.1.1. Alimentos susceptibles de provocar alergia

Cualquier alimento puede desencadenar una respuesta alérgica y se ha constatado clínicamente que más de 170 alimentos causan reacciones mediadas por IgE, pero es una minoría de alimentos los que causan la mayoría de las reacciones alérgicas, como, por ejemplo: nueces, huevo, leche, pescado, crustáceos, trigo y soja (Burks et al., 2012).

Los alérgenos alimentarios se pueden dividir en dos grupos, en función de si los alimentos son de origen animal o vegetal. En cuanto a la alergia a alimentos de origen animal, el huevo de gallina es el más común, afectando entre al 0,5 y 2,7% de la población general, alcanzando en España el 44% (< 5 años) y 10% (adultos) de consultas por sospecha. Generalmente, es provocada por proteínas de la clara, como la ovoalbúmina y el ovomucoide.

El pescado es también una fuente alérgica importante, sobre todo en zonas de elevado consumo, como es el caso de España, donde representa la causa del 30% de los diagnósticos de alergia a alimentos en niños y del 12-14% en adultos, siendo las parvalbúminas los alérgenos mayoritarios. El marisco, por su parte, afecta entre el 2,8-8% de la población, siendo la tropomiosina la mayor responsable en crustáceos y moluscos. Sin embargo, la alergia a las proteínas de la carne es poco frecuente.

La alergia a la leche de vaca es la más frecuente en los lactantes y afecta al 1% de la población (Iglesias, 2018). Las proteínas más involucradas son: la caseína, la lactoglobulina y la lactoalbúmina. No hay que confundir la alergia a leche con la intolerancia a la lactosa, dado que esta última se produce por la incapacidad de digerir este azúcar, produciendo otro tipo de síntomas, como la diarrea (Acero, 2014).

En cuanto a la alergia a los alimentos de origen vegetal, las frutas junto a los frutos secos son los que más reacciones alérgicas producen en los adultos. Las frutas presentan una prevalencia del 30% y, los alérgenos, en su mayoría, pertenecen al grupo de proteínas de defensa vegetal de las plantas y a las profilinas y, en los frutos secos, la mayoría son pertenecientes a la familia de proteínas de almacenamiento de semillas, vicilinas, leguminas y albúminas 2S.

Entre las legumbres, la soja y el cacahuete son comunes en países de origen anglosajón, mientras que en los países asiáticos o con dieta mediterránea, los casos de alergia se dan mayoritariamente a lenteja, garbanzo, judía o guisante (Iglesias, 2018). Los cereales, además de su importancia en la enfermedad celíaca, también pueden producir alergia, pero, es menos frecuente comparada con otros vegetales (Acero, 2014).

La alergia a los alimentos en adultos puede representar una alergia persistente desde la infancia o puede aparecer *de novo*. Hay pocos datos sobre la alergia alimentaria desde la edad adulta, pero la evidencia empírica sugiere que la alergia alimentaria que comienza en la edad adulta a menudo persiste. Por el contrario, las alergias alimentarias que comienzan en la infancia a menudo se superan (Burks et al., 2012). En general, las alergias alimentarias infantiles a la leche, el huevo, el trigo y la soja suelen resolverse durante la infancia, mientras que las alergias al cacahuete, nueces, pescado y mariscos son persistentes (Sicherer y Sampson, 2014). Por lo que, al ser una situación clínica dinámica, el resultado obtenido en las pruebas alérgicas se debe interpretar en el momento evolutivo de la patología (Ibáñez-Sandin, 1999).

### **1.1.2. Reactividad cruzada**

Las reacciones alérgicas pueden presentar fenómenos de reactividad cruzada, a pesar de ser la selectividad una de las principales características de los anticuerpos. Se entiende por reactividad cruzada al reconocimiento de distintos antígenos por un mismo anticuerpo IgE. Este reconocimiento es debido a que diferentes alérgenos presentan epítomos de IgE idénticos o muy similares.

La mayoría de los alérgenos que presentan reactividad cruzada entre sí, presentan similitudes estructurales (por ejemplo, existe reactividad cruzada entre leches de diferentes especies), pero se ha demostrado que entre alérgenos de especies que no tienen relación taxonómica también puede darse. Se conocen casos de reactividad cruzada entre aerolérgenos y alimentos, como es el síndrome polen-alimentos vegetales, látex-frutas o ácaros crustáceos (Blanco, 2001).

### 1.1.3. Control y seguridad alimentaria

Las personas alérgicas pueden reaccionar negativamente incluso en cantidades traza, por lo que una de las estrategias es evitar totalmente el consumo de aquellos alimentos susceptibles a desencadenar reacciones alérgicas (Hefle y Taylor, 2004). La existencia de una legislación europea, dirigida a proteger la salud de los consumidores y garantizar su derecho a la información, hace que la industria alimentaria desempeñe un papel fundamental en la protección del consumidor (Van Hengel, 2007). En concreto, en 2011 se publicó el Reglamento (UE) nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre la información alimentaria facilitada al consumidor, donde, en el anexo II, se especifica un listado de 14 productos susceptibles de producir reacciones alérgicas e intolerancias que deben ser declarados en la etiqueta.

Los fabricantes deben verificar y asegurar la ausencia o presencia de los alérgenos recogidos en el reglamento en sus productos para un correcto etiquetado (Acero, 2014). Garantizar la ausencia de alérgenos es una tarea difícil para empresas que utilizan la misma maquinaria en la elaboración de productos alimenticios o que los almacenan en el mismo sitio (Van Hengel, 2007). Dedicar una línea o agrupar alimentos alergénicos, así como limpiezas efectivas entre producciones, son algunas de las estrategias que se siguen.

A parte de los programas de control de alérgenos que tienen los fabricantes en sus plantas, es esencial que los proveedores de materias primas proporcionen información completa sobre estas. Por ello, muchas empresas han instituido programas de auditoría de alérgenos para sus proveedores (Hefle y Taylor, 2004). Por tanto, una buena gestión de la alergia alimentaria involucra a todos los eslabones del sector alimentario.

## 1.2. Alergia alimentaria

### 1.2.1. Prevalencia

La prevalencia de la enfermedad es difícil de determinar dado que varía acorde a distintos factores entre los que se encuentran: población de estudio, metodología, variación geográfica, edad o tipo de dieta (Sicherer y Sampson, 2014). La alergia alimentaria predomina en niños, sobre todo en lactantes ya que presentan las barreras anatómicas y funcionales en desarrollo, afectando a un 6% de niños menores de 3 años de edad y a un 2% de los adultos. A pesar de que la prevalencia está sobreestimada en la población general, puesto que solo confirman mediante pruebas de provocación un tercio de los casos, se observa una tendencia ascendente (Iglesias, 2018).

Se desconoce el porqué del cambio en la respuesta inmunitaria tras la ingesta de ciertos alimentos que desencadena en una reacción alérgica, pero sí que se conocen una serie de factores de riesgo que pueden influir en la aparición de la alergia alimentaria, entre los que se incluye: sexo (masculino en niños, femenino en adultos), raza (asiática o negra), genética (asociación familiar,

HLA, genes específicos), atopia (dermatitis atópica), insuficiencia de vitamina D, grasa en la dieta (consumo reducido de ácidos grasos poliinsaturados omega-3), consumo reducido de antioxidantes, obesidad (al ser estado inflamatorio), mayor higiene y el momento y la ruta de exposición de los alimentos (Sicherer y Sampson, 2014). La aparición de la alergia alimentaria es, por tanto, el resultado de una interacción compleja de factores genéticos, inmunológicos y ambientales, suponiendo un reto la identificación de estrategias efectivas para prevenirla (Sicherer, 2014).

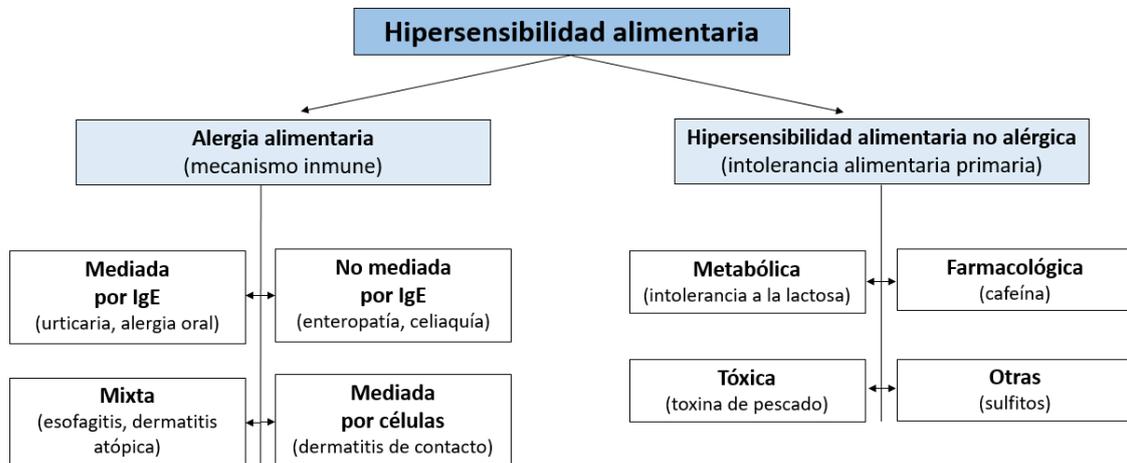
### 1.2.2. Tipos de hipersensibilidad

Atendiendo a la clasificación de Gell y Coombs, se distinguen cuatro tipos de reacción de hipersensibilidad. Tres de ellas (tipo I, II, III) son inmediatas, es decir, la sintomatología aparece a los pocos minutos u horas de la exposición y se tratan de una reacción inmunitaria humoral y, un cuarto tipo de hipersensibilidad, también denominada tardía que está medida por células. En la tabla 1, se muestra el mecanismo y las manifestaciones de los diferentes tipos de hipersensibilidad.

**Tabla 1.** Clasificación de los diferentes tipos de hipersensibilidades según Gell y Coombs.  
Fuente: Kindt et al., 2007.

		Mediador	Mecanismo de reacción	Manifestaciones típicas
<b>HIPERSENSIBILIDAD</b>	<b>Tipo I</b>	IgE	El antígeno se une a la IgE fija en la superficie de mastocitos y basófilos, provocando la liberación de mediadores vasoactivos.	Anafilaxis sistémica y reacciones localizada como fiebre del heno, asma, ronchas, alergias alimentarias y eccema.
	<b>Tipo II</b>	IgG o IgM	El anticuerpo dirigido contra antígenos de superficie celular media la destrucción celular por activación del complemento.	Reacciones por transfusión de sangre, eritroblastosis fetal y anemia hemolítica autoinmunitaria
	<b>Tipo III</b>	Inmunocomplejos	Los complejos Ag-Ab que se depositan en diversos tejidos inducen activación del complemento y reacción inflamatoria subsecuente mediada por infiltración masiva de neutrófilos.	Reacción localizada de Arthus y reacciones generalizadas como enfermedad del suero, vasculitis necrosante, glomerulonefritis, artritis reumatoide y lupus eritematoso diseminado
	<b>Tipo IV</b>	Células	Las células T <sub>H1</sub> sensibilizadas liberan citocinas que activan macrófagos o células T citotóxicas que median la lesión celular directa. Las células T <sub>H2</sub> y los linfocitos T citotóxicos median reacciones similares.	Dermatitis por contacto, reacciones tuberculares y rechazo de injerto.

La intervención del mecanismo inmune es lo que diferencia la alergia alimentaria del resto de hipersensibilidades alimentarias no alérgicas (intolerancia, respuesta farmacológica, tóxica, etc.). En la Figura 1, se observa la clasificación de las hipersensibilidades alimentarias, siendo la mediada por IgE (hipersensibilidad tipo I) la más frecuente de la patología alérgica.

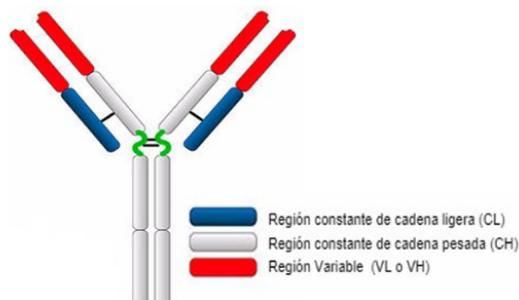


**Figura 1.** Clasificación de la hipersensibilidad alimentaria. Fuente: Armentia y Vivas, 2018.

Aunque pueden afectar a cualquier órgano, las de tipo inmediato (mediada por IgE) lo hacen normalmente a la piel y al aparato respiratorio, mientras que en las reacciones alérgicas tardías (no mediadas por la IgE o de mecanismo mixto) los síntomas suelen ser gastrointestinales (Ibáñez-Sandin, 1999).

### 1.2.3. Biomarcadores hipersensibilidad tipo I

Los anticuerpos son glucoproteínas que están constituidas por dos unidades estructurales básicas, cada una de ellas con dos grandes cadenas pesadas y dos cadenas ligeras de menor tamaño unidas por enlaces disulfuro (Figura 2). Hay cinco clases de anticuerpos humorales producidos por el organismo, de los cuales la inmunoglobulina E (IgE) y la inmunoglobulina G (IgG) tienen relación con la alergia alimentaria.



**Figura 2.** Estructura básica de un anticuerpo

Por un lado, la IgE media la reacción de hipersensibilidad inmediata reconociendo específicamente al alérgeno, por lo que se considera un biomarcador de alergia. Se trata de una glucoproteína de aproximadamente 190 kDa cuya concentración sérica promedio es de 100 ng/mL, viéndose elevado este valor en los individuos alérgicos. En el diagnóstico se suele emplear como punto de corte un valor de IgE específica de 0,35 UI/mL (Redondo, 2018). Los pacientes, en función de la cantidad de IgE específica, se pueden agrupar según la clasificación de RAST en 6 clases. Siendo 0 ausencia y 6 el nivel más elevado de alergia (Tabla 2).

**Tabla 2.** Clasificación de RAST (del inglés, radioalergosorbent test) que diferencia 6 clases (0-6) en función del nivel de IgE específicas. Fuente: Almeida, 2016.

Clase	UI/mL	Nivel de IgE específica
0	< 0,35	Ausencia o indetectable
1	0,35-0,69	Bajo
2	0,7-3,49	Moderado
3	3,5-17,49	Alto
4	17,5-49	Muy alto
5	50-99	Muy alto
6	≥ 100	Muy alto

Por otro lado, la IgG es la clase de inmunoglobulina más abundante en el suero, alcanzando los 15 mg/mL y con un peso molecular de 150 kDa. Existen 4 variantes o subclases de IgG y la determinación de la producción de IgG<sub>4</sub> antígeno-específica, puede considerarse un marcador de respuesta inmunológica protectora, especialmente en la inmunoterapia (Gould y Beavil, 1998).

#### 1.2.4. Mecanismo de acción de la hipersensibilidad tipo I

La base inmunológica de las enfermedades alérgicas o hipersensibilidad tipo I, se manifiesta en dos fases: etapa de sensibilización y etapa de reacción.

##### i. Etapa de sensibilización

Tras la exposición a un alérgeno, las células presentadoras de antígenos (APC) activan las células T<sub>H2</sub>, las cuales, producen interleucinas: IL-4, IL-5 e IL-13. Las IL-4 e IL-13 inducen el cambio de clase a la cadena pesada  $\epsilon$  de las inmunoglobulinas en las células B, diferenciándolas hacia células plasmáticas secretoras de IgE específicos.

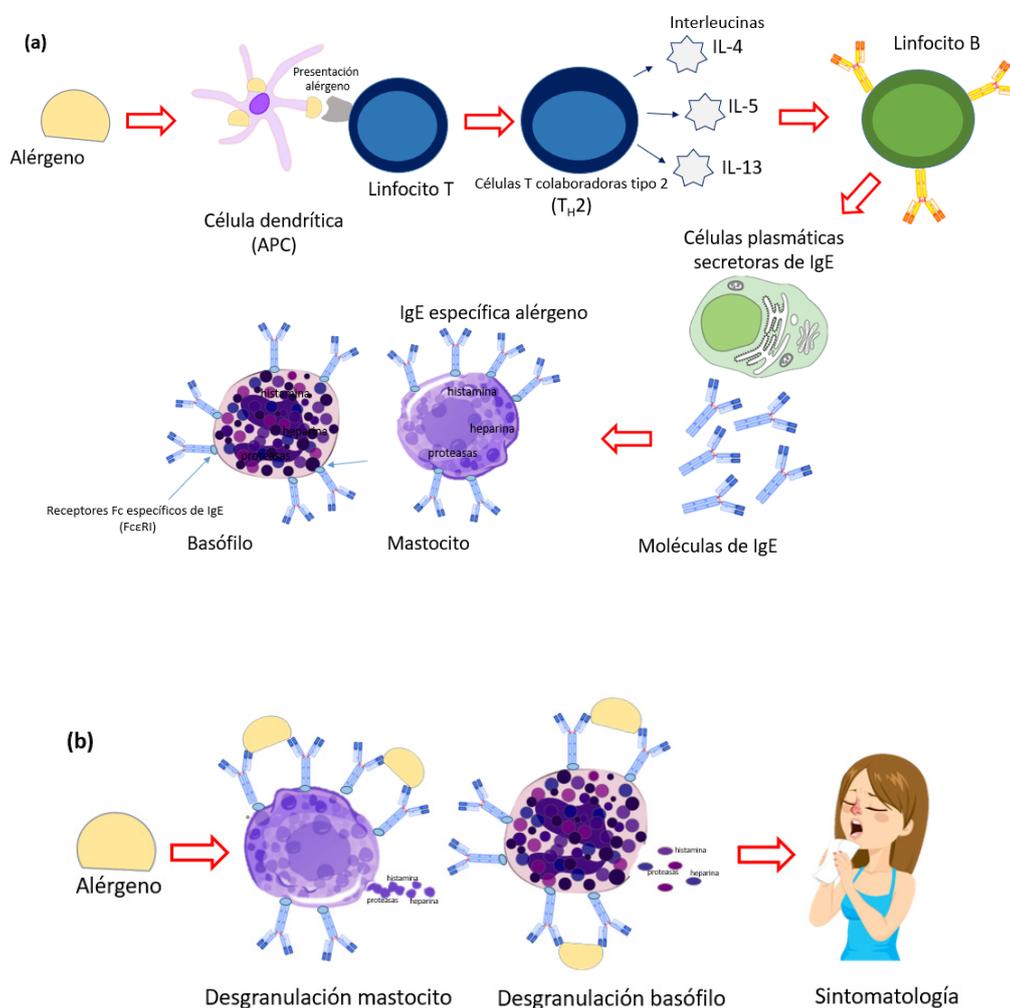
Las moléculas de IgE secretadas se fijan a los receptores Fc de alta afinidad específicos de IgE (Fc $\epsilon$ RI) de la superficie de los mastocitos tisulares y los basófilos sanguíneos, lo que conduce a la sensibilización del paciente (Figura 3a).

Esta exposición inicial no causa una reacción alérgica, sin embargo, el contacto posterior con el mismo alérgeno puede permitir que los anticuerpos IgE creados previamente lo reconozcan.

## ii. Etapa de reacción

Al exponerse de nuevo al alérgeno, éste puede unirse y entrecruzarse a la parte fija de dos moléculas de IgE contiguas, lo que desencadena la desgranulación de mastocitos y basófilos, es decir, la liberación de mediadores con actividad farmacológica (aminas vasoactivas como la histamina). Los mediadores producen contracción del músculo liso, aumento de la permeabilidad vascular y vasodilatación y estos efectos pueden ser generales o localizados según la magnitud de la liberación de mediadores (Figura 3b).

La sintomatología puede ser muy variada, desde urticaria, prurito, dermatitis atópica, hinchazón de la garganta o los tejidos faciales, vómitos, diarrea, sibilancias asmáticas, dificultad para respirar e hipotensión hasta reacciones potencialmente mortales, anafilaxia (Kindt et al., 2007).

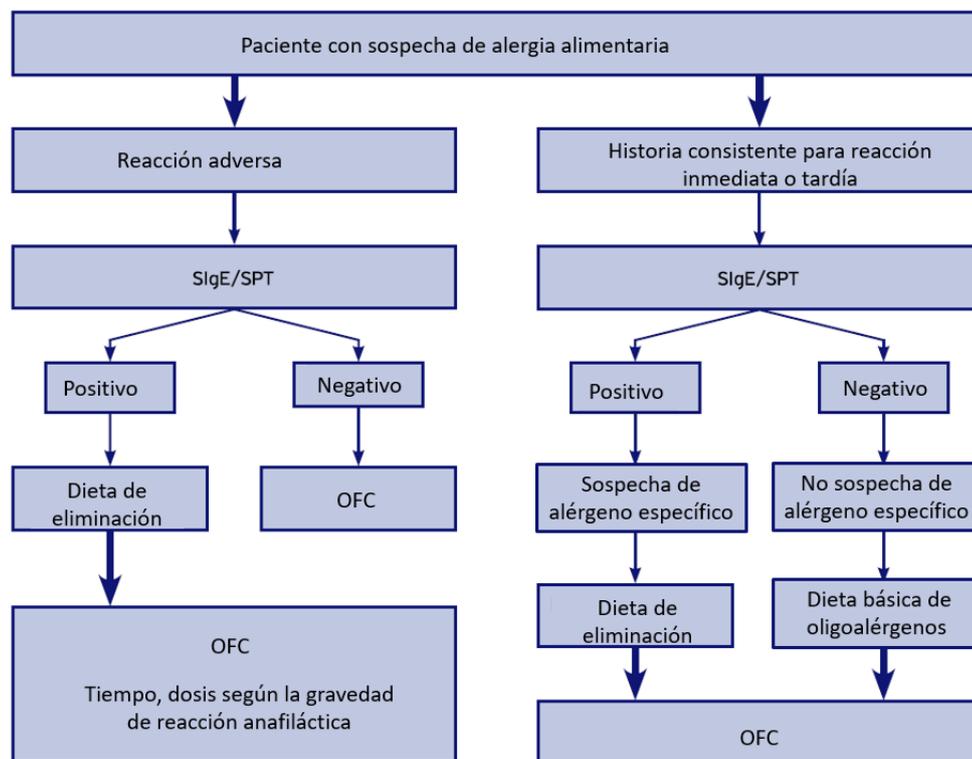


**Figura 3.** Fases de la respuesta alérgica inmediata. Fase de sensibilización (a) y de reacción (b).

### 1.3. Métodos de detección

Actualmente, el diagnóstico de la alergia alimentaria se basa en el historial clínico completo del paciente y en los resultados de los ensayos *in vitro* e *in vivo* de IgE frente a alérgenos específicos en tejido o en suero, respectivamente (López, 2005).

La historia clínica se centra en detalles que pueden ayudar a orientar el enfoque de las pruebas, como podría ser la vía de entrada del alérgeno (ingesta, contacto o inhalación), el tiempo entre el contacto y la aparición de los síntomas o el estado del alimento (crudo, cocido, con o sin piel) (Iglesias, 2018). Pero las pruebas complementarias, bien sobre el paciente o bien sobre el suero, son las que confirmarán la alergia alimentaria (Sicherer y Sampson, 2010). La Figura 4, presenta el conjunto de operaciones que se siguen en caso de sospecha de una alergia alimentaria (Worm et al., 2018).



**Figura 4.** Algoritmo para el diagnóstico de alergia alimentaria. SIgE, inmunoglobulina E específica; SPT, prueba de punción cutánea; OFC, prueba de provocación oral. Fuente: Worm et al., 2018.

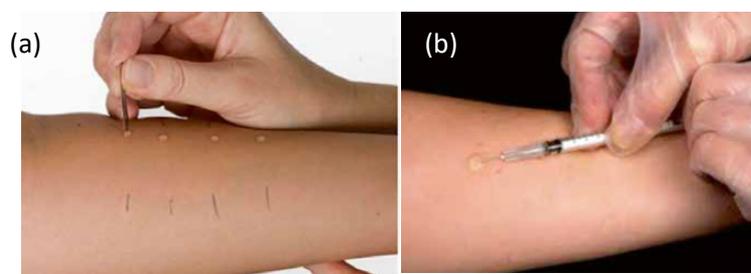
#### 1.3.1. Métodos *in vivo*

Las pruebas *in vivo* son pruebas cutáneas realizadas sobre el propio paciente (*prick test* y prueba de intradermorreacción) en caso de ser una alergia mediada por IgE. Mide la actividad biológica de la IgE, es decir, la activación de los mastocitos en la piel (Ibáñez-Sandin, 1999). Consisten en poner el extracto alérgico o los alérgenos purificados en contacto con las células cutáneas para

promover la liberación de mediadores inflamatorios y, en consecuencia, la aparición de una pápula con eritema en caso de existir IgE específica al alérgeno testado. En estas pruebas, siempre se utilizan dos controles internos: control negativo, con el diluyente de los alérgenos y, control positivo, con histamina (Arruda, 2004).

La prueba de punción cutánea, *prick test*, llevada a cabo por personal cualificado, es la más utilizada por ser rápida, barata y sencilla (Iglesias, 2018), pero no exenta de riesgos. Consiste en disponer gotas separadas del extracto en la epidermis y punzar con una lanceta estandarizada de forma perpendicular al plano (Figura 5a). La reacción se valora midiendo, si aparece, el diámetro de la pápula tras 15 minutos (Armentia y Vivas, 2018).

En la prueba de intradermorreacción, la aplicación se realiza directamente en la dermis con una aguja hipodérmica fina y con la jeringa paralela a la superficie (López, 2005), como se observa en la Figura 5b.



**Figura 5.** Técnica de punción cutánea (a) y técnica de intradermorreacción (b).  
Fuente: Redondo, 2018.

Existe un método alternativo complementario, llamado *prick-by-prick*. En éste, los extractos alérgicos utilizados son brutos o frescos. Se ejecuta en el caso de que durante el proceso de elaboración del extracto, como sería el caso de frutas o vegetales, se produzca la inactivación de proteínas potencialmente alérgicas, lo que implicaría falsos negativos en las pruebas cutáneas convencionales (Redondo, 2018).

Finalmente, las pruebas de provocación oral controlada consisten en administrar dosis crecientes por vía oral del alimento del que se sospecha. En esta prueba no se determina el mecanismo inmune involucrado, pero sí se demuestra si el alimento testado es la causa de la reacción adversa. Esta prueba debe realizarse en pacientes asintomáticos y no es conveniente para aquellos con historia clínica de reacción alérgica grave, por el posible riesgo de anafilaxia (Arruda, 2004). Se suele realizar como diagnóstico definitivo de alergia clínica (Ibáñez-Sandín, 1999).

### 1.3.2. Métodos *in vitro*

Las pruebas *in vitro* son realizadas en un laboratorio y tienen el objetivo de cuantificar la IgE específica, el número de basófilos o los mediadores durante una reacción aguda.

### 1.3.2.1. Test de activación de basófilos y mediadores

El test de activación de basófilos (BAT) en la alergia alimentaria es una nueva línea de investigación donde, mediante citometría de flujo y con sangre fresca, se cuantifica la proteína CD63 que se expresa en la superficie de los basófilos activados (Redondo, 2018). Esta técnica se basa en el hecho de que los basófilos sensibilizados con IgE en su superficie se activan en presencia del alérgeno y expresan una alta densidad de marcadores. Los basófilos se identifican por anticuerpos anti-IgE y se activan por marcadores como CD63 o CD203c (Mayorga et al., 2010).

La determinación de mediadores (histamina/triptasa) se realiza mediante la determinación de la triptasa sérica dado que, la histamina tiene la vida muy corta y el resto de mediadores no son exclusivos de los mastocitos. La extracción sérica en esta prueba se realiza entre 1 y 3 horas tras la reacción, momento en el que alcanza su pico (Moreno, 2016).

### 1.3.2.2. Determinación de anticuerpos IgE específicos del alérgeno

La presencia del biomarcador IgE en suero se utiliza para diagnosticar si un paciente está sensibilizado al reaccionar de forma específica con un alérgeno (López, 2005). Para cuantificar el resultado, se utiliza una curva dosis-respuesta y se define la respuesta del anticuerpo (IgE específico) en unidades internacionales por litro, donde 1 UI es equivalente a 2,4 ng de IgE (Ibáñez-Sandin, 1999). Concentraciones crecientes de niveles de IgE específicos de alimentos se correlacionan con una probabilidad mayor de una reacción clínica, aunque, generalmente, no se correlacionan muy bien con la gravedad de la reacción (Sicherer y Sampson, 2010).

Existen varios métodos de determinación de IgE específica sérica (radioisotópicas, inmunoenzimáticas, colorimétricas, fluorométricas y quimioluminiscentes), como son ELISA (del inglés, *enzyme-linked immunosorbent assay*), FAST (del inglés, *fluorescent-allergosorbent test*), RAST (del inglés, *radioallergosorbent test*) o su variante RAST-CAP. Todos ellos se basan en la inmovilización del alérgeno a un soporte en fase líquida o sólida. De forma que, si el suero del paciente contiene IgE específica del alérgeno, ésta lo reconocerá, quedando unida al soporte y se podrá determinar. Lo que varía entre estos sistemas principalmente, es la forma de reacción que permite revelar el resultado, siendo el ELISA un método ligado a una reacción enzimática, o el RAST un método radioactivo (Arruda, 2004). El rango de cuantificación de IgE oscila entre 0,1 y 100 kUI/L, pudiéndose detectar valores superiores llevando a cabo diluciones de la muestra analizada (Redondo, 2018).

Las pruebas de laboratorio ImmunoCAP, desarrolladas por Thermo Fisher Scientific, son las que lideran el mercado (Figura 6). En el test, se utiliza una fase sólida tridimensional con una gran capacidad de anclar moléculas antigénicas. El alérgeno se une covalentemente a la matriz del

ImmunoCAP y la IgE del suero del paciente se une específicamente a éstos. Para la detección, se utilizan anticuerpos marcados con enzima que desarrollan fluorescencia al reaccionar con otro agente. A mayor fluorescencia, mayor cantidad de IgE específica en la muestra (Quirós, 2003).



**Figura 6.** ImmunoCAP. Fuente: BIOAGILYTIX, 2018.

### 1.4. Métodos de detección alternativos

La creciente demanda de información de salud sobre los problemas alérgicos genera la necesidad de disponer de mejores métodos de detección no invasivos, que sean sensibles y proporcionen resultados fiables de manera rápida y sencilla (Worm et al., 2018).

Las determinaciones *in vitro* de anticuerpos IgE específicos ofrece ventajas sobre las pruebas cutáneas, como son que el consumidor no se expone al riesgo de desencadenar reacciones adversas, que los resultados no se ven afectados por el tratamiento farmacológico o la dermatitis extensa y que, las muestras serológicas pueden almacenarse durante largos períodos para próximas investigaciones o confirmaciones (Mayorga et al., 2010). Estos motivos han convertido a los ensayos *in vitro* en un mecanismo esencial en los algoritmos diagnósticos equivalente a las pruebas *in vivo* (López, 2005).

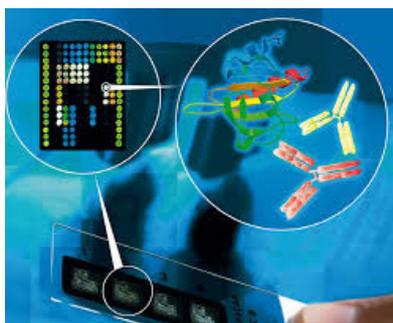
La posibilidad de determinar miles de eventos de unión diferentes en una misma reacción de una manera paralela se adapta perfectamente a las necesidades de identificar el/los alérgenos responsables de la reacción alérgica (Templin et al., 2002). En los últimos años, se han desarrollado métodos innovadores dirigidos al diagnóstico *in vitro* de la alergia alimentaria.

#### 1.4.1. Biosensado en formato micromatriz

Los ensayos de micromatrices planas son el principal representante de las técnicas de análisis multiplexadas (Morais et al., 2009). La técnica de microarray es una alternativa a los métodos existentes que permite analizar simultáneamente una gran cantidad de parámetros en un solo experimento. Se trata de un ensayo multiplexado que, en el caso de la alergia alimentaria, mide la IgE específica frente a diferentes alérgenos en un paso único, otorgando rapidez al ensayo.

Las micromatrices se basan en inmovilizar, sobre un soporte sólido, los alérgenos en forma de micropuntos en filas y columnas para exponer los sueros que contienen las moléculas de unión correspondientes (IgE específicas). Tras las correspondientes reacciones, son varios los sistemas de lectura que se pueden usar para detectar la formación de complejos dentro de cada micropunto. Entre ellos, están los sistemas de lectura basados en quimioluminiscencia, fluorescencia, espectrometría de masas, radioactividad o electroquímica (Templin et al., 2002).

En la actualidad, Thermo Fisher Scientific comercializa un sistema denominado ImmunoCAP ISAC, que utiliza el formato de micromatriz para el diagnóstico de la alergia, basada en la tecnología de biochip (Figura 7). Se fundamenta en inmovilizar covalentemente los componentes de los alérgenos en una lámina cubierta de polímero. Los anticuerpos IgE de la muestra del paciente se unen a los componentes de los alérgenos inmovilizados y son detectados por un anticuerpo anti-IgE marcado con fluorescencia, midiéndose la intensidad emitida, posteriormente, con un escáner. El procedimiento de la prueba es de menos de 4 horas (PHADIA, 2012). Sin embargo, se trata de una tecnología de elevado coste, por lo que únicamente grandes hospitales pueden acceder a ella. Por tanto, es necesario el desarrollo de una alternativa más asequible para la mayoría de los consumidores que, además, reduzca el tiempo de obtención de resultados.



**Figura 7.** Biochip ImmunoCAP ISAC. Fuente: PHADIA, 2012.

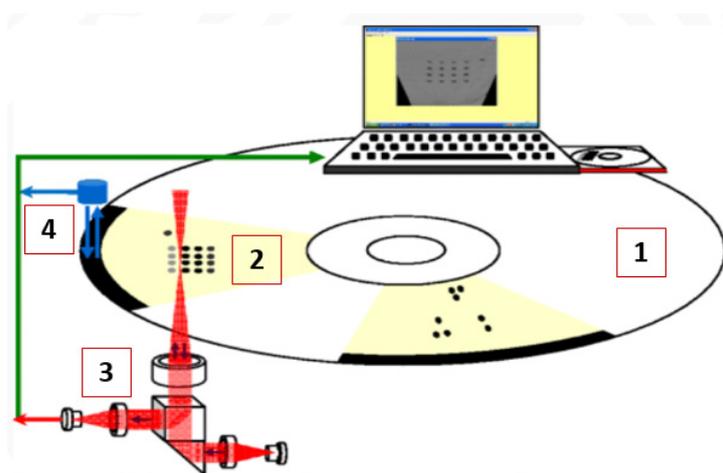
### 1.4.2. Tecnología en disco compacto

El biosensado en disco compacto es una estrategia de bioanálisis de bajo coste que utiliza como plataforma de análisis un disco compacto (CD, DVD o Blu-ray comercial) y como sistema detector un lector de discos. La metodología analítica emplea un formato de micromatriz de puntos (array), donde el gasto de reactivos y el tiempo del ensayo se reducen.

Todos estos soportes, en cualquiera de sus formatos, han demostrado su eficacia para la inmovilización covalente o por adsorción pasiva de biomoléculas que constituyen la base de un ensayo bioanalítico. El disco compacto regrabable (DVD) consta de dos capas de material protector de policarbonato de 0,6 mm de grosor separadas por una película metálica de aluminio de un grosor del orden de 100 Å. Esta estructura le otorga características hidrofóbicas, gran resistencia al impacto y estabilidad a altas temperaturas (Morais et al., 2007). Además, dada su superficie de 94 cm<sup>2</sup>, se pueden inmovilizar un gran número de sondas, lo que permite realizar

numerosas repeticiones simultáneas en una muestra, así como, desarrollar un gran número de ensayos simultáneos gracias al multiplexado (Tortajada-Genaro et al., 2012).

El lector de discos compactos tipo DVD utiliza un láser rojo que emite luz monocromática a una longitud de onda de 650 nm (Hernández, 2013). El principio de lectura se basa en registrar la intensidad de luz reflejada por la capa metálica cuando el láser incide sobre ella. La luz láser emitida por el cabezal de lectura del grabador puede verse reflejada, dispersada o absorbida al incidir sobre el precipitado generado como consecuencia de una inmunorreacción. En este caso, la intensidad de luz reflejada se verá modificada y, la señal que es detectada por el fotodiodo estará atenuada (Figura 8). La señal reflejada se relaciona directamente con la concentración de analito causante de la alteración de las propiedades ópticas del disco (Morais et al., 2007), (Morais et al., 2008).



**Figura 8.** Tecnología disco compacto. Lectura de los resultados mediante un lector de discos digitales óptico. 1, DVD; 2, micromatriz; 3, cabezal de lectura del detector de discos; 4, fotodiodo detector. Fuente: Morais et al., 2008.

Se utiliza como soporte un disco estándar cuyo coste es de 0,15 € por unidad y, como detector, un lector de discos convencional que puede adquirirse por 50-300€. Así pues, el costo de esta tecnología se reduce a pocos euros en comparación con las decenas de miles de euros que cuesta otro tipo de técnicas que utilizan, por ejemplo, fluorímetros, cámaras CCD o microscopios (Morais et al., 2016). Por lo tanto, se trata de un enfoque innovador y prometedor con buenas prestaciones analíticas, que emplea bajo volumen de muestra, un consumo reducido de reactivos auxiliares, es rápido y portátil. Por ello, el grupo de investigación del Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) de la Universitat Politècnica de València ha adaptado esta tecnología a diferentes inmunoensayos como la determinación de residuos de atrazina, biomarcadores (Morais 2008) o la detección de ADN de alérgenos alimentarios (Tortajada-Genaro et al., 2012), entre otros. Su evidente potencial justifica el apoyo para continuar con su desarrollo para el diagnóstico de alergias.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fin de grado es contribuir en el desarrollo de un método *in vitro* que permita la detección simultánea de indicadores/biomarcadores de la alergia con altas prestaciones analíticas como alternativa a los sistemas que se utilizan en la actualidad. La aproximación consiste en un biosensado óptico basado en un inmunoensayo no competitivo, utilizando la tecnología de disco compacto: disco como plataforma analítica y lector de discos como detector.

Para la consecución de este objetivo general, se establecen los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Poner a punto un ensayo en formato de micromatriz en disco compacto para la determinación de IgG e IgE asociadas a alergias alimentarias en suero sanguíneo de pacientes alérgicos y controles.
- ✓ Establecer las prestaciones analíticas del ensayo.
- ✓ Estudiar la correlación de la concentración de IgG e IgE con los síntomas de la alergia alimentaria.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Reactivos

Las disoluciones tampón utilizadas fueron tampón fosfato salino (PBS), (0,8% (p/v) NaCl, 0,02% (p/v) KCl, 0,02% (p/v)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,3% (p/v)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,5; PBS con 0,05% (p/v) del tensoactivo Tween-20 (PBST) y tampón carbonato/bicarbonato de sodio 50mM (1,06% (p/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,84% (p/v)  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9,6).

El panel de 12 alérgenos alimentarios utilizados, recogidos en la normativa de la UE y suministrados por ALK-Abelló (Madrid, España) fueron: harina de trigo (1:20 P/V), cebada (1,25 mg/mL), kiwi (0,35 mg/mL), lenguado (3,3 mg/mL), gamba (1,5 mg/mL), LTP melocotón (0,1 mg/mL), profilina (0,075 mg/mL), ovoalbúmina (5 mg/mL), leche de vaca (1,6 mg/mL), nuez (0,5 mg/mL), cacahuete (2 mg/mL) y pistacho (4,5 mg/mL). Todos ellos se utilizaron a una concentración final de 40 ng/ $\mu\text{L}$  en tampón carbonato.

En la determinación de IgE se utilizó Omalizumab como anticuerpo de captura, un anticuerpo monoclonal anti-IgE humana del medicamento Xolair, a 20 ng/ $\mu\text{L}$  en tampón PBS. Como control positivo se utilizó IgE humana y, como control negativo, albúmina de suero humano (HSA), ambos de Abcam (Cambridge, Reino Unido) y a una concentración de 10 ng/ $\mu\text{L}$  en tampón PBS. Para la realización de las curvas de calibrado, se utilizaron diluciones del estándar internacional procedente de suero humano de IgE de la WHO (del inglés: *World Health Organization*), estándar 11/234, del Instituto Nacional de Estándares y Control Biológicos (NIBSC) (Neuss, Alemania). El anticuerpo primario para el reconocimiento de la IgE humana fue el anticuerpo policlonal anti-IgE humana (pAb) marcado con peroxidasa de rábano (HRP) cedido por Dr. Fooke (pAb-HRP) a una dilución de uso de 1/800 (1,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en tampón PBST. Como sustrato cromogénico para el revelado de los resultados se utilizó 3,3',5,5'- Tetrametilbencidina (TMB) sin diluir de SDT-Reagents (Baesweiler, Alemania).

En la determinación de IgG, como captura de IgG total se utilizó el anticuerpo de cabra anti-IgG humana (GAH) a 20 ng/ $\mu\text{L}$ , como control positivo se utilizó IgG humana a 25 ng/ $\mu\text{L}$  y, como control negativo HSA a 10 ng/ $\mu\text{L}$ , todos ellos con tampón PBS y de Abcam. Para el revelado con plata, suministrada por Sigma-Aldrich, se utilizó para el reconocimiento de la IgG humana el anticuerpo policlonal de cabra anti- IgG humana marcado con oro de 1,4 nm (GAH-Gold) a una dilución 1/50 (0,8 mg/mL) en PBST. Para el revelado con TMB, se utilizó como anticuerpo primario para el reconocimiento de la IgG humana un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG humana (MAH) a una dilución 1/1000 (0,5 mg/mL) y, como anticuerpo secundario un anticuerpo de cabra anti-ratón preabsorbido marcado con la enzima peroxidasa de rábano (GAM-HRP) de Abcam.

### 3.2. Purificación de Omalizumab

El Omalizumab es el compuesto activo del medicamento Xolair. Se trata de un anticuerpo monoclonal humanizado IgG dirigido frente a la fracción constante de la IgE humana, el cual se inmovilizó para la cuantificación de IgE total. Para eliminar los componentes del medicamento distintos del anticuerpo, éste se purificó utilizando una columna con proteína G anclada que une específicamente IgG (Figura 9) de GE Healthcare. Para ello, se filtró el medicamento Xolair a través de un poro de 0,45  $\mu\text{m}$  para asegurar la ausencia de partículas. Se equilibró la columna con PBS previamente al paso de la muestra. Tras inyectar la muestra, se lavó la columna con PBS para recoger la fracción no retenida y, a continuación, se eluyó el anticuerpo con tampón Glicina 0,1 M, pH 2,5, recogiéndolo en tubos que contenían Tris 1 M, pH 9 para preservar la actividad de la IgG.



**Figura 9.** Columna de purificación con proteína G. Fuente: GE HEALTHCARE.

Finalmente, se midió la absorbancia a 280 nm con el espectrofotómetro para obtener la concentración de Omalizumab purificado y, aquellas fracciones con mayor concentración se juntaron y se les cambió el tampón a PBS.

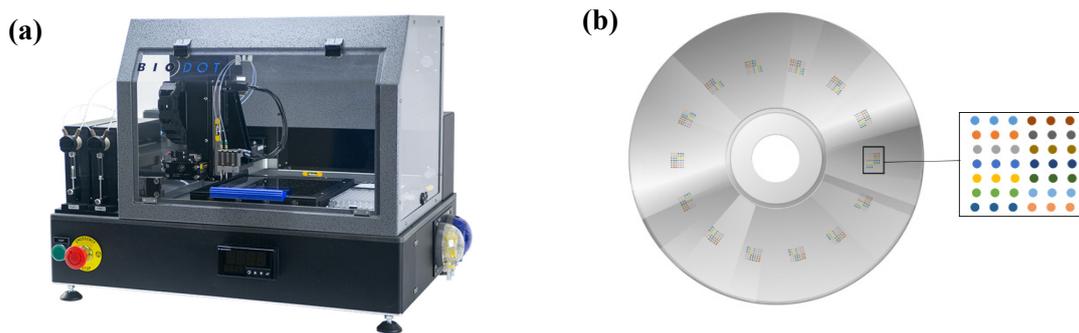
### 3.3. Muestras

El Servicio de Alergia del Hospital Universitario La Fe (Valencia) seleccionó un total de 37 sueros con alergias alimentarias confirmadas por la prueba de laboratorio ImmunoCAP y un total de 9 sueros de pacientes no atópicos. A partir de este conjunto de muestras, se realizó el análisis con la tecnología de disco compacto acondicionando los sueros con 0,5% de Tween-20.

### 3.4. Protocolo general

#### 3.4.1. Inmovilización de alérgenos para la cuantificación de IgE e IgG

Los reactivos de impresión se dispensaron sobre el DVD de CD Rohling-up (Saarbrücken, Alemania) en formato de micromatriz (6 filas  $\times$  7 columnas, 3 réplicas/reactivo, 14 arrays) mediante un dispensador de bajo volumen (50 nL) y sin contacto (AD-1500, Biodot, Irvine, CA) a 25  $^{\circ}\text{C}$  y a una humedad relativa del 80% (Figura 10). Se dejó incubar el disco durante 12 horas a 4  $^{\circ}\text{C}$  para su inmovilización en la superficie del disco por un proceso de adsorción.



**Figura 10.** Sistema de impresión Biodot (a) y representación esquemática de las micromatrices en la superficie del DVD (b).

#### 3.4.2. Inmunoensayo no competitivo para la cuantificación de IgE

Transcurridas las 12 horas de incubación, se lavó el disco con PBST seguido de agua destilada y se secó mediante centrifugación. Se acondicionaron los sueros de los pacientes añadiendo un 0,5% de Tween-20 y se prepararon las diluciones para la curva de calibrado, con el estándar de la WHO, a las siguientes concentraciones: 0,04, 0,8, 20 y 100 UI/mL en suero de conejo acondicionado.

A continuación, se dispensó cada suero y dilución de la curva de calibrado en una micromatriz del disco y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C). Tras lavar el disco con PBST y agua destilada y secarlo mediante centrifugación, se dispensó el anticuerpo policlonal anti-IgE marcado con HRP (pAb-HRP) y se dejó incubar durante 15 minutos. Una vez lavado y secado el disco para eliminar la anti-IgE marcada no unida, se reveló el resultado añadiendo el sustrato cromogénico TMB sobre la superficie del disco. Transcurridos 7 minutos, se genera un precipitado azul con diferente intensidad en los puntos de la micromatriz en función de los complejos anticuerpo-antígeno formados. Finalmente, se lava el disco con agua y se seca.

#### 3.4.3. Inmunoensayo no competitivo para la cuantificación de IgG

Transcurridas las 12 horas de incubación, se lavó el disco con PBST seguido de agua destilada y se secó mediante centrifugación. Se diluyeron los sueros de los pacientes 1/50 en PBST y se prepararon las diluciones para la curva de calibrado a partir de IgG procedente de suero humano a concentraciones de: 0,01, 0,1, 10 ng/ $\mu$ L en PBST. Se dispensaron todas las diluciones preparadas en las diferentes micromatrices y pasados 30 minutos a temperatura ambiente, se lavó el disco con PBST y agua destilada y se secó mediante centrifugación.

Para el revelado enzimático, se dispensó el anticuerpo de ratón anti-IgG humana (MAH) y se dejó incubar durante 15 minutos. Tras el lavado con PBST y agua y secado del disco, se dejó incubando

durante 15 minutos el anticuerpo de cabra anti-ratón marcado (GAM-HRP). Una vez lavado con PBST y agua y secado, se reveló el resultado añadiendo el sustrato cromogénico TMB durante 3 minutos. Se paralizó la reacción con un lavado con agua destilada, seguido de un secado.

Para el revelado metalográfico, se dispensó el anticuerpo anti-IgE humana marcado con oro y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras un nuevo lavado y secado del disco para eliminar la anti-IgG marcada no unida, se reveló el resultado añadiendo plata, generándose un precipitado negro. Transcurridos 5 minutos, se detuvo la reacción mediante un lavado con agua destilada seguido de un secado.

#### 3.4.4. Lectura y análisis de los resultados

La lectura de los resultados se realizó obteniendo las imágenes correspondientes a cada micromatriz con ayuda de un lector de discos digitales ópticos (Lab-Player) en modo reflexión (Figura 11). El procesado de las imágenes capturadas proporcionó señales específicas que se relacionaron con su concentración para cada uno de los alérgenos. Éstas, se midieron con un software desarrollado por el equipo de investigación que permitió tratar y analizar los datos obtenidos (Dobosz, 2015). Se obtuvo la media y la desviación de las réplicas analizadas y los datos se trataron utilizando los programas MedCalc 14.8.1, SigmaPlot 11 y Statgraphics XVII. Para la cuantificación, las señales se interpolaron en la curva de calibrado.

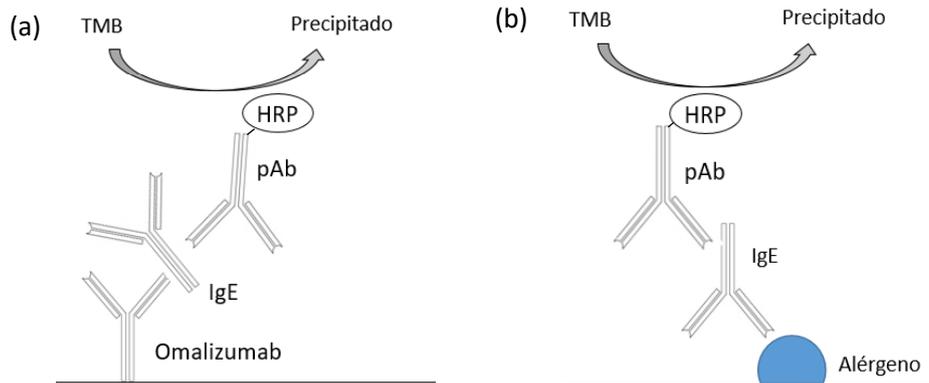


**Figura 11.** Prototipo de lector de discos digitales ópticos (Lab-Player).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Estudio de condiciones del inmunoensayo para la determinación de IgE

La cuantificación de la IgE total y específica de los pacientes estudiados, consideradas el biomarcador de la hipersensibilidad tipo I, consistió, tal y como se muestra en la Figura 12, en un inmunoensayo tipo sándwich y directo, respectivamente. Para ello, previamente, se optimizaron las condiciones del ensayo



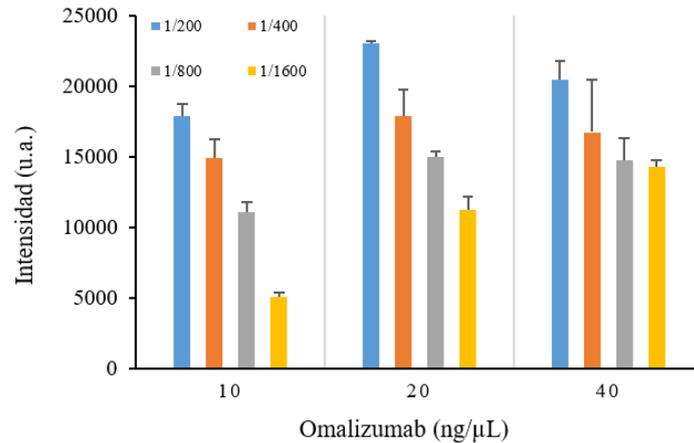
**Figura 12.** Descripción gráfica del inmunoensayo no competitivo para la cuantificación de IgE total (a) e IgE específica (b).

#### 4.1.1. Determinación de IgE total: anticuerpo de captura y anticuerpo de revelado

Con el objetivo de optimizar las condiciones del inmunoensayo, se titularon los anticuerpos implicados: el anticuerpo de captura Omalizumab y el anticuerpo anti-IgE humana marcado con HRP (pAb-HRP) de revelado. Para ello, se inmovilizaron tres concentraciones de Omalizumab a 10, 20 y 40 ng/ $\mu$ L en PBS en formato micromatriz. Posteriormente, se adicionaron las distintas diluciones de IgE preparadas con el patrón de la WHO a 0, 0,8, 4, 20, 100 UI/mL en suero control en la micromatriz correspondiente. Finalmente, se incubó el anticuerpo de revelado a diferentes diluciones (1/200, 1/400, 1/800 y 1/1600). En resumen, los experimentos se realizaron siguiendo un diseño factorial de tres variables ( $3 \times 5 \times 4$ , 3 réplicas/ensayo), es decir, 60 ensayos triplicados.

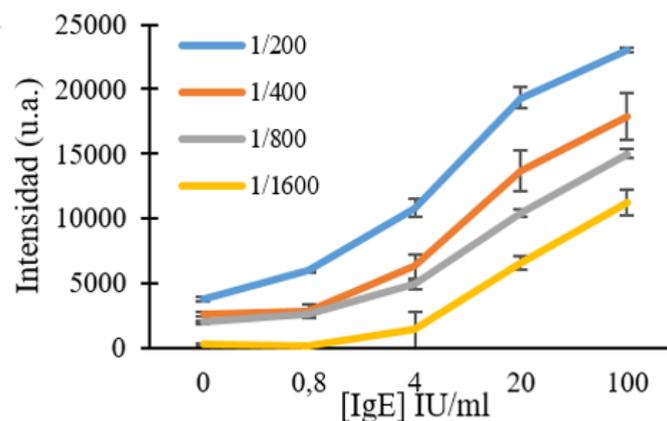
El análisis de la varianza multifactorial para un nivel de confianza del 95% mostró que todas las variables: concentración de anticuerpo de captura ( $p = 0$ ), de IgE ( $p = 0$ ) y de anticuerpo de revelado ( $p = 0$ ) eran críticas en el estudio puesto que  $p < 0,05$ .

La Figura 13 muestra que para una concentración constante de anticuerpo de revelado (100 ng/ $\mu$ L), las señales obtenidas son mayores al aumentar la concentración de Omalizumab de 10 a 20 ng/ $\mu$ L. Sin embargo, se observa como disminuye la señal al aumentar la concentración de 20 a 40 ng/ $\mu$ L indicando que el sistema se encontraba saturado respecto al anticuerpo de captura.



**Figura 13.** Intensidades obtenidas para una concentración 100 UI/mL de IgE a diferentes concentraciones de impresión del anticuerpo de captura Omalizumab: 10, 20 y 40 ng/μL y diferentes diluciones de anticuerpo de revelado: 1/200-1/1600. Réplicas: 3

El efecto de las diluciones del anticuerpo de revelado (pAb-HRP) se representa en la Figura 14, observándose que las señales obtenidas disminuyen conforme su concentración es inferior, siendo excesivamente baja para la dilución 1/1600. Aunque es en a una dilución de 1/200 donde se observa la señal más intensa, ésta presenta un fondo muy elevado. Es por ello, que se realizó un Test-T de muestras pareadas para las diluciones de anticuerpo de revelado 1/400 y 1/800 con un nivel de confianza del 95%. Dado que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las diluciones ( $p=0,175$ ), se seleccionó la dilución de anticuerpo de revelado de menor cantidad (1/800) por una reducción del coste del ensayo.

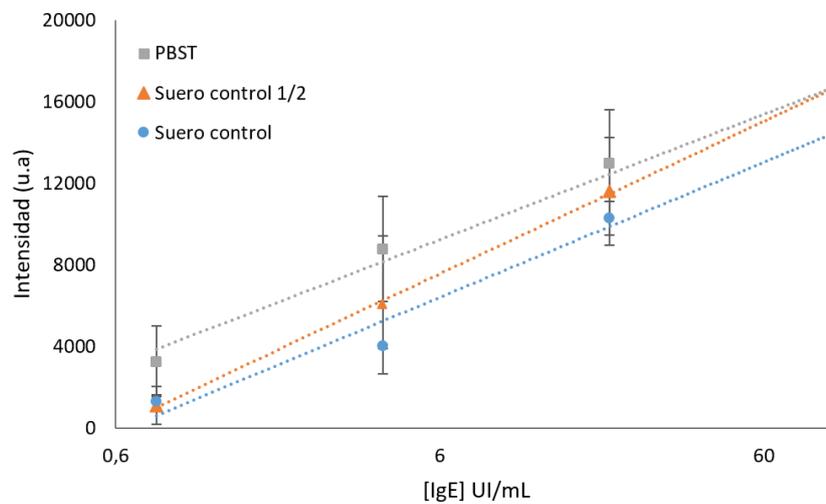


**Figura 14.** Señal registrada en función de la concentración de IgE a una concentración de anticuerpo de captura de 20 ng/μL y diluciones de anticuerpo de revelado (pAb-HRP): 1/200, 1/400, 1/800 y 1/1600 (a). Réplicas: 3.

#### 4.1.2. Determinación de IgE totales: efecto matriz

Los diversos componentes del suero pueden dar lugar a alteraciones de los resultados, es decir, puede existir efecto matriz. Para comprobar si existía dicho efecto, se prepararon diluciones del analito (0, 0,8, 4, 20, 100 UI/mL) en matrices diferentes: tampón salino (PBST), suero sin diluir y diluido 1/2 en PBST.

En la Figura 15 se observa que, al aumentar la cantidad de suero en el medio, la señal disminuye. El análisis de varianza multifactorial confirmó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las variables de la matriz ( $p = 0,0165$ ) y entre las concentraciones de IgE ( $p = 0$ ). Por tanto, al sí existir efecto matriz, la determinación de IgE siguiendo este método exigió realizar todas las calibraciones en suero sanguíneo control (libre de IgE).



**Figura 15.** Señales registradas para diferentes concentraciones de IgE en tres matrices distintas: suero control, suero control diluido 1/2 y PBST. Réplicas: 3

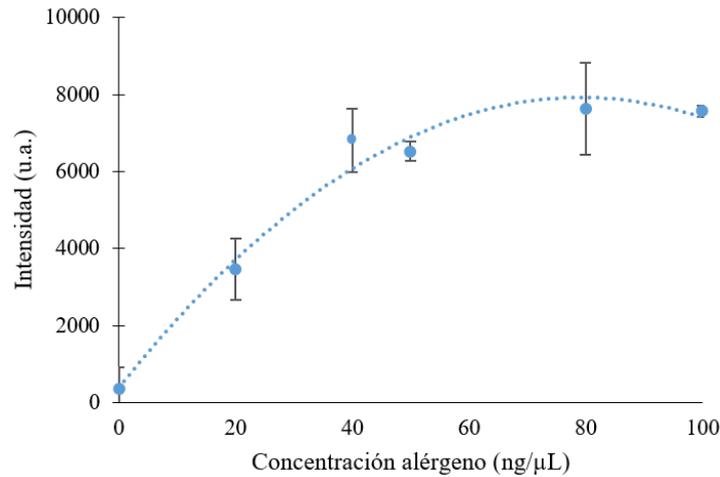
#### 4.1.3. Determinación de IgE específicas: cantidad de alérgeno

Tal y como se muestra en la Figura 12, en la determinación de IgE específica de los pacientes, es el propio alérgeno el que se inmoviliza sobre la superficie del disco vía adsorción (interacciones electroestáticas y enlaces débiles). Los ensayos preliminares mostraron que la concentración de alérgeno inmovilizado es crítica para las prestaciones analíticas del método. Como sistema modelo, se eligió la determinación de la IgE específica asociada a la alergia de leche de vaca (*Bos taurus*) y como molécula a inmovilizar en el disco un extracto proteico de leche de vaca.

Se inmovilizaron diferentes concentraciones de este alérgeno: 20, 40, 50, 80 y 100 ng/ $\mu$ L en tampón carbonato 0,1M, pH = 9,6. Se dispensó suero de un paciente con concentración conocida de IgE específica y, a continuación, se dispensó el anticuerpo de revelado a una dilución 1/800.

En la Figura 16, se observa que la señal registrada aumentaba hasta una concentración de 40 ng/ $\mu$ L y se mantenía prácticamente constante al superar esta concentración. Esta tendencia indica que se ha alcanzado la saturación respecto a la capacidad de adsorción de la superficie analítica.

Es decir, se ha alcanzado el máximo rendimiento de inmovilización. Por todo ello, se seleccionó como concentración general para inmovilización de los extractos alérgicos 40 ng/μL.



**Figura 16.** Efecto en la señal de la concentración de alérgeno (extracto proteico de leche de vaca) inmovilizado en la superficie del disco incubándolo con el suero de un paciente alérgico a leche de vaca. Réplicas: 3.

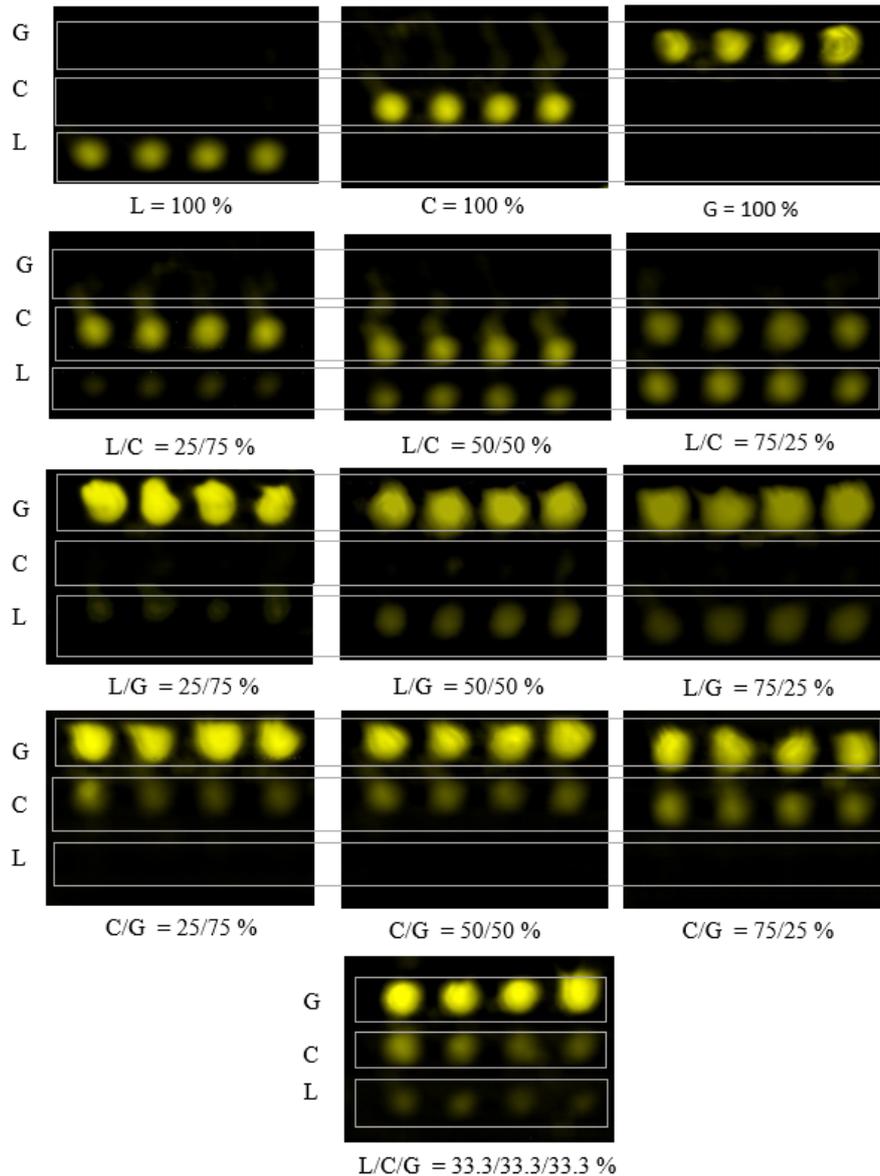
#### 4.1.4. Determinación IgE específica: selectividad ensayo

Una vez mostrado que el método funcionaba para un alérgeno, los siguientes experimentos se centraron en evaluar su capacidad de detección simultánea. Este tipo de ensayo es aplicable para pacientes multialérgicos y/o para ensayos de alta capacidad de trabajo (muchas muestras simultáneamente). No obstante, los ensayos multianálisis pueden presentar el problema de la reactividad cruzada. Para estudiar la selectividad del ensayo, se generaron condiciones donde un paciente fuese multialérgico mezclando diferentes sueros.

En concreto, se realizó un ensayo triplex para la determinación de IgE específicas a alergias de leche de vaca, gamba (*Aristeus antennatus*) y cebada (*Hordeum vulgare*). Para ello, se inmovilizaron extractos proteicos de estos alérgenos en formato de micromatriz a una concentración de 40 ng/μL en tampón carbonato.

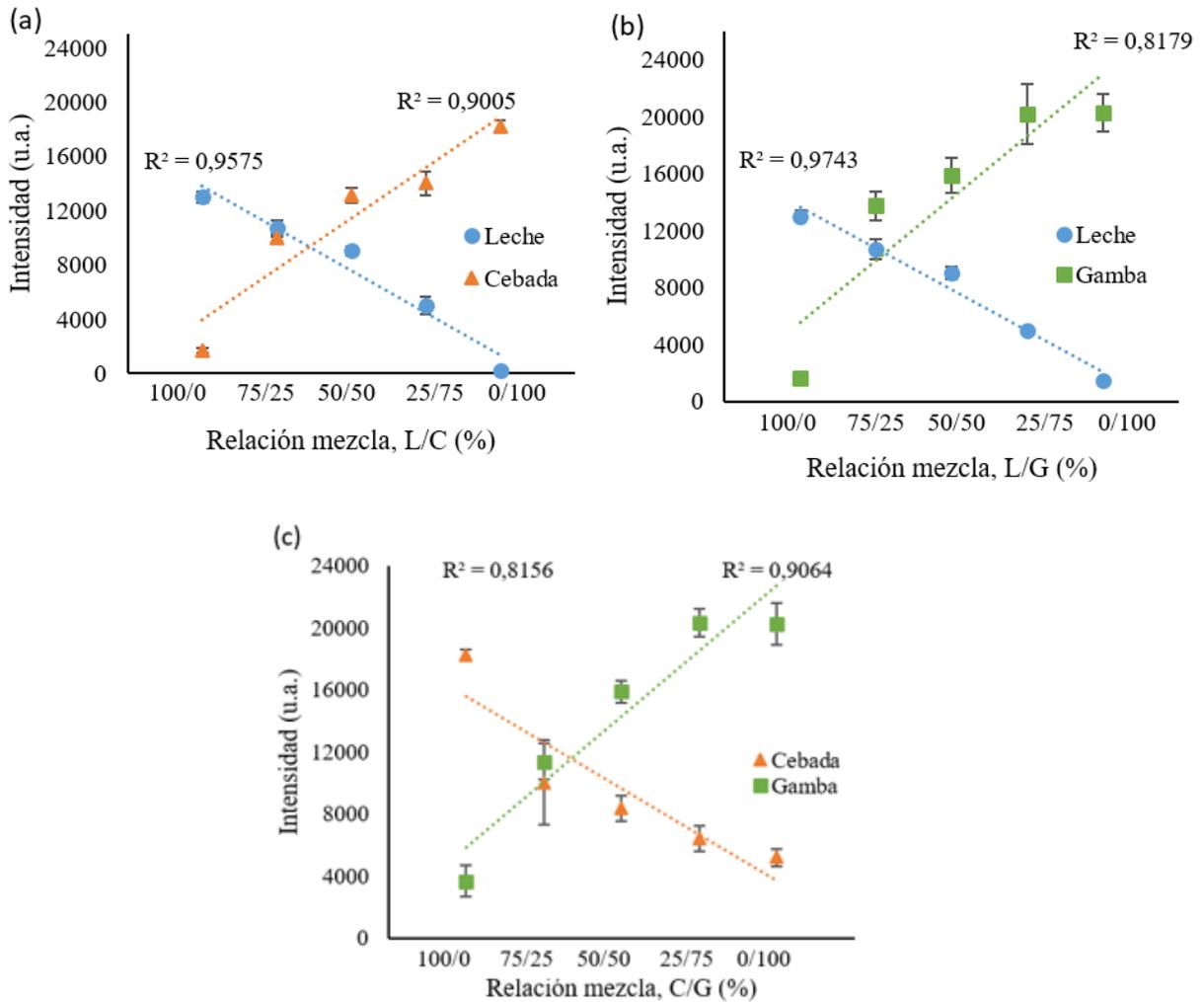
Se incubaron tres sueros de pacientes con un historial de reactividad ante estos alérgenos, así como mezclas binarias, con una relación porcentual de: 100/0, 75/25, 50/50 y 25/75 (v/v) además de una mezcla ternaria.

A nivel cualitativo, se estudiaron los perfiles de reconocimiento, observando qué puntos de la micromatriz presentaban respuesta y cuáles no originaban una señal diferenciable del fondo. Se puede observar en la Figura 17 que el ensayo multiplexado funciona correctamente. En las muestras puras (suero de un único paciente) las distintas IgE específicas reconocen únicamente a su correspondiente alérgeno inmovilizado. Cuando se incuban mezclas binarias y ternarias aparecen puntos en las filas que corresponden a estos alérgenos, discriminándose de forma selectiva el reconocimiento, independientemente de la composición de la mezcla.



**Figura 17.** Perfil de reconocimiento de pacientes alérgicos a leche (L), cebada (C) y gamba (G) y de pacientes multialérgicos generados a partir de estos en diferentes proporciones. Réplicas: 4.

A nivel cuantitativo, como se muestra en la Figura 18, a medida que la proporción de paciente alérgico a cierto alérgeno disminuye, también lo hace la señal que proporciona el punto de la micromatriz donde se ha inmovilizado su alérgeno. Las respuestas se ajustaron a un modelo lineal, variando la bondad del ajuste entre  $R^2= 0,82$  y  $R^2= 0,96$ .



**Figura 18.** Intensidad de las señales obtenidas al analizar pacientes multialérgicos mezclados en diferentes proporciones. Mezcla de paciente alérgico a la leche (L) y paciente alérgico a la cebada (C) (a), mezcla de paciente alérgico a la leche y paciente alérgico a la gamba (G) (b) y mezcla paciente alérgico a la cebada y paciente alérgico a la gamba (c). Réplicas: 4.

## 4.2. Cuantificación IgE específicas de los pacientes

### 4.2.1. Evaluación del ensayo multiplexado

El método desarrollado para la detección específica de IgE frente a tres fuentes alergénicas se amplió a un panel de 12 siguiendo la misma estrategia de inmovilización de extractos proteicos o proteínas purificadas en formato de micromatriz seguido de una incubación con la muestra de suero e inmunorevelado. Además de la determinación de las IgE específicas, se inmovilizó el anticuerpo Omalizumab para la determinación de IgE total y un control positivo. El inmunoreconocimiento se realizó sobre la superficie del disco DVD en formato micromatriz siguiendo la representación esquemática de la Figura 19.



**Figura 19.** Representación esquemática de la distribución de los componentes alérgicos (extractos proteicos y proteínas purificadas) y anticuerpos en formato micromatriz.

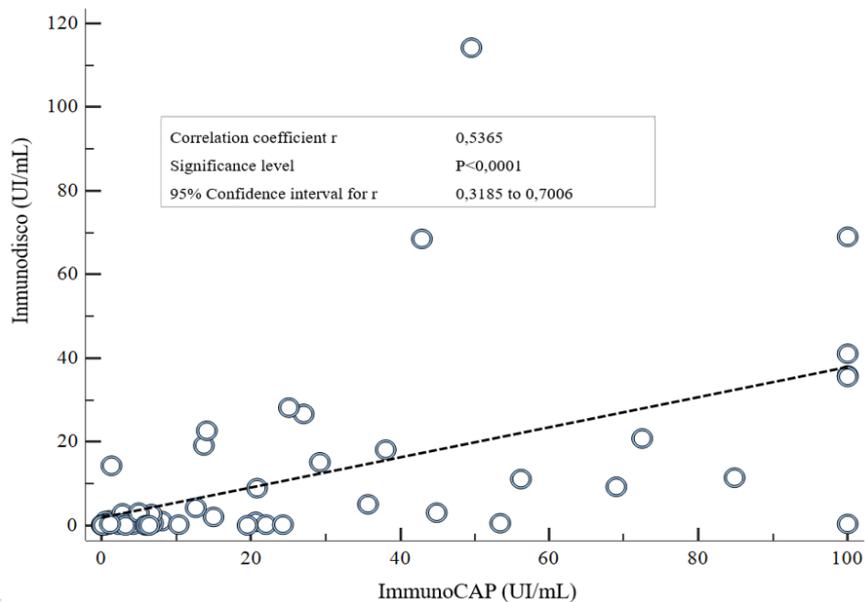
Una vez confirmadas las condiciones del ensayo, se incubaron las diferentes diluciones de IgE total procedente del estándar de la WHO a 0,8, 4, 20, 100 UI/mL en suero control. A partir de las señales registradas, se calculó el límite de detección, definido como la concentración de analito obtenida a partir de la medida del blanco más 3 veces su desviación estándar:  $LD = \bar{x} + 3 \cdot SD$ , así como su límite de cuantificación, definido como la concentración de analito obtenida a partir de la medida del blanco más 10 veces su desviación estándar:  $LC = \bar{x} + 10 \cdot SD$ . Los valores obtenidos a partir del promedio de 15 réplicas fueron  $0,31 \pm 0,04$  UI/mL y  $0,41 \pm 0,11$  UI/mL, respectivamente. Estos parámetros fueron satisfactorios comparados con las técnicas actuales para la determinación de este biomarcador sanguíneo. La reproducibilidad del método en el mismo día y entre días distintos, calculadas como desviación estándar relativa  $\%RSD = (s/\bar{x}) \cdot 100$  obtenida a partir de 4 réplicas se encontró entre 2-7% y 10-25%, respectivamente. Estos valores son similares a los obtenidos en otros ensayos basados en la tecnología de disco compacto (Badran et al., 2017). En conclusión, el método desarrollado presenta las prestaciones analíticas adecuadas para su aplicación en la determinación de IgE total en muestras de suero para el diagnóstico de pacientes alérgicos a alimentos.

Dado que no existen patrones comerciales de IgE específica, la estimación de los límites de detección y cuantificación no pudo realizarse. Respecto a la reproducibilidad del método, los valores de RSD obtenida a partir de 4 réplicas se encontraron entre 3-5% para los ensayos en el mismo día y entre 3-7% para los ensayos entre distintos días.

#### 4.2.2. Aplicación a muestras de pacientes alérgicos a alimentos

La aplicabilidad del método se evaluó cuantificando la IgE específica presente en 37 sueros de pacientes alérgicos y 9 pacientes no atópicos, de acuerdo a la metodología descrita en los apartados anteriores. Los resultados de los pacientes obtenidos del inmunodisco se compararon con los proporcionados por ImmunoCAP (método de referencia en los centros hospitalarios).

En una primera aproximación, se cuantificaron los contenidos de IgE específica utilizando la curva de calibrado obtenida a partir del patrón de IgE total de la WHO. La Figura 20 muestra un gráfico de dispersión comparando los valores de ImmunoCAP con los del inmunodisco, obteniendo un valor del coeficiente de Pearson de 0,54. Este valor pone de manifiesto que existe una baja relación lineal entre las concentraciones de IgE específica medida con el método de referencia y las obtenidos por inmunodisco. De acuerdo a estos resultados, se concluyó que la utilización de esta curva para la cuantificación de IgE específica no mostró una buena precisión cuando se compararon los valores obtenidos con los del método ImmunoCAP.

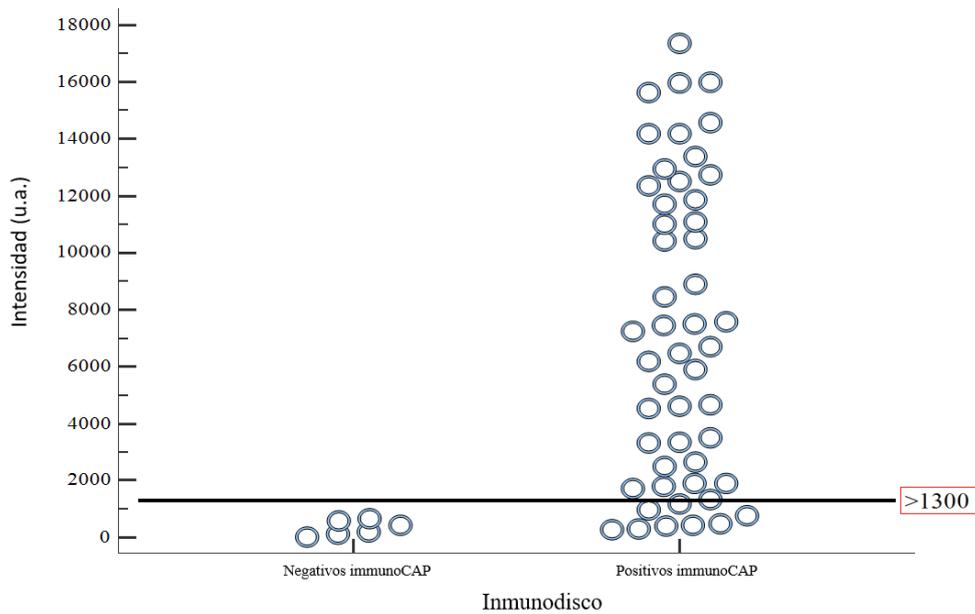


**Figura 20.** Diagrama de dispersión en el que se muestra la correlación de Pearson entre los valores obtenidos mediante ImmunoCAP e inmunodisco. Réplicas: 3.

Con el fin de identificar las capacidades del método se procesaron los datos de las intensidades de los puntos de la micromatriz directamente. Se agrupando las señales del inmunodisco teniendo en cuenta la clasificación de paciente positivo y negativo según el ensayo *in vitro* de ImmunoCAP (Figura 21). Teniendo en cuenta un umbral de 0,35 UI/mL (umbral con valor clínico en alergias) que equivale a una intensidad de 1300 u.a., se calculó la sensibilidad y especificidad clínica. La sensibilidad clínica indica el porcentaje de pacientes alérgicos diagnosticados correctamente, mientras que la especificidad clínica indica el porcentaje de pacientes no alérgicos diagnosticados correctamente. Dichos valores se calcularon de acuerdo a las siguientes ecuaciones, siendo del 84% y del 100%, respectivamente.

$$\text{Sensibilidad (\%)} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}} \cdot 100$$

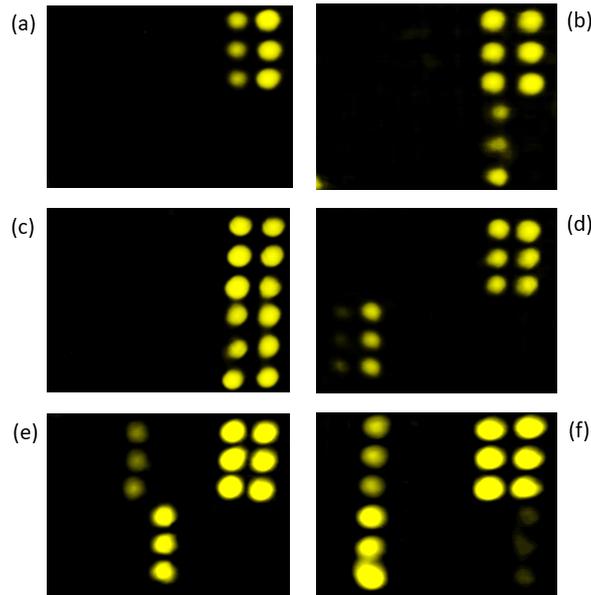
$$\text{Especificidad (\%)} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}} \cdot 100$$



**Figura 21.** Diagrama de puntos representando los valores de intensidad de la señal para cada una de las sensibilizaciones de los distintos pacientes, agrupadas en función de los resultados del método de referencia ImmunoCAP. En el eje X se indican los pacientes diagnosticados como negativos (0) y positivos (1) a una determinada fuente alérgica. La barra horizontal indica el umbral de diagnóstico equivalente a 0,35 UI/mL. Réplicas: 3.

Los resultados mostraron que, a pesar de la baja correlación observada entre los valores de concentración de ImmunoCAP e inmunodisco, se obtuvo una sensibilidad y especificidad clínica elevadas. En consecuencia, el método no puede utilizarse con fines cuantitativos, pero presenta excelentes prestaciones a nivel semicuantitativo.

Los siguientes experimentos se centraron en evaluar la capacidad de identificación de los alimentos frente a los cuales un determinado paciente se encuentra sensibilizado. Para ello, se analizaron los perfiles de reconocimiento alérgeno-IgE específica. En la Figura 22, se recogen algunos ejemplos de las imágenes de las micromatrices capturadas. Teniendo en cuenta el esquema de inmovilización de los alérgenos mostrado en la Figura 19, un paciente se diagnosticó como alérgico en función de la intensidad media obtenida para los correspondientes puntos de la micromatriz. Una respuesta estadísticamente comparable a la señal de los controles negativos se interpretó como que el paciente no se encuentra sensibilizado, mientras que una respuesta diferenciable indicó la presencia de IgE específica en el suero sanguíneo y, por tanto, un paciente alérgico a dicho alimento. En todos los casos mostrados, los resultados fueron coincidentes con la técnica ImmunoCAP. Además, se identificaron algunas sensibilizaciones no diagnosticadas por este método. Por ejemplo, un paciente únicamente clasificado como alérgico a la nuez (Figura 22e), fue identificado como alérgico al lenguado con el método desarrollado.



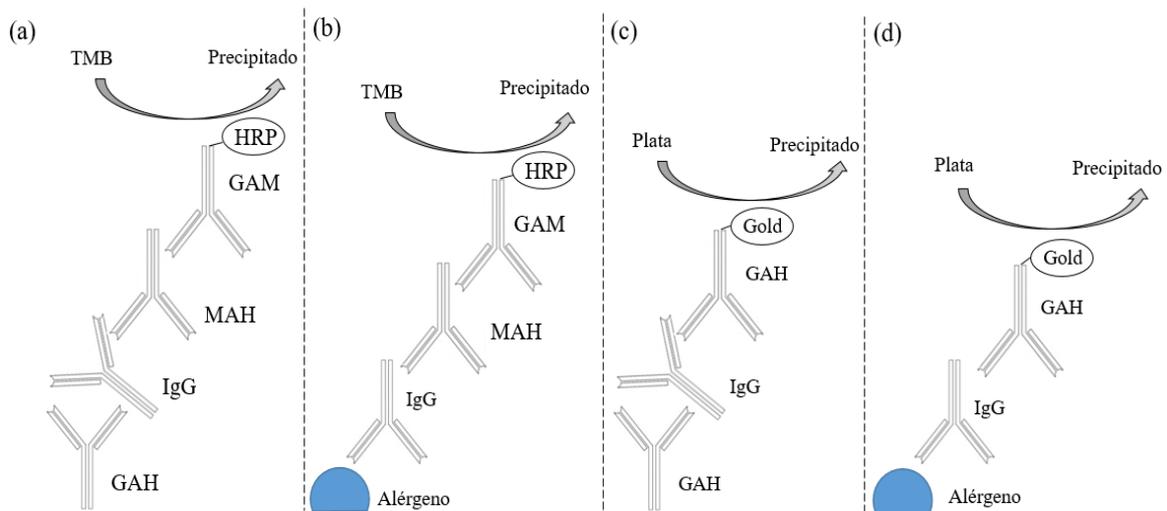
**Figura 22.** Imágenes obtenidas de 6 micromatrices de 14 reactivos donde se muestran los perfiles de reconocimiento de un individuo no atópico (a) y de pacientes con alergia a: LTP de melocotón (b), a LTP de melocotón y profilina (c), a harina de trigo y cebada (d), a lenguado y nuez (e) y a cebada, profilina y ovoalbúmina (f). Réplicas: 3.

En resumen, este método mejora las técnicas actuales para el diagnóstico de alergias alimentarias por varias razones. Primero, por el bajo volumen de suero que requiere (30  $\mu$ L). Segundo, por el bajo coste del ensayo (menos de un euro por muestra analizada). Tercero, por la rapidez en la obtención de resultados (2 horas). Y, por último, por la capacidad de multiplexado. Esta ventaja permite no solo conocer si un individuo es alérgico a un determinado alimento, sino confirmar o descartar hipersensibilidad a otros alimentos diferentes de forma simultánea.

#### 4.3. Estudio de condiciones del inmunoensayo para la determinación de IgG

Una vez puesta a punto la tecnología de disco compacto para la determinación del biomarcador IgE y dada la versatilidad del ensayo, se estudió la determinación de la IgG con el objetivo de comprobar su posible papel protector en la alergia alimentaria.

El método se basa en la capacidad de reconocimiento alérgeno-IgG en formato de micromatriz de proteínas. Por ello, se utilizó el mismo formato de array proteico descrito anteriormente (Figura 19), sustituyendo el anticuerpo de captura de IgG total y el control positivo. En concreto, se inmovilizó el anticuerpo de cabra anti-humano (GAH) para la captura de IgG y, como control positivo se utilizó IgG humana purificada. Además, dado que el analito era diferente, los anticuerpos de reconocimiento también variaron y se plantearon dos sistemas de amplificación de señal: enzimático, descrito anteriormente y, metalográfico. La Figura 23 muestra el esquema del inmunoensayo competitivo para la determinación de las IgG, específicas y totales, para ambos sistemas de revelado.



**Figura 23.** Descripción del ensayo no competitivo para la cuantificación de IgG totales (a) e IgG específicas (b) revelando con TMB y la cuantificación de IgG totales (c) e IgG específicas (d) revelando con plata.

Estas dos técnicas se diferencian en la elección de la molécula que actuará como marcador del anticuerpo de revelado y, por ende, del sustrato cromogénico usado para éste. Ambas generan de forma rápida precipitados estables que absorben en el espectro visible (láser lector:  $\lambda=650$  nm). El revelado enzimático se realizó marcando el anticuerpo con peroxidasa de rábano (HRP), utilizada comúnmente por su elevada sensibilidad al reaccionar con el sustrato TMB. Por otro lado, el revelado metalográfico se realizó marcando con oro, un compuesto inorgánico que cataliza la reducción de  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$  en presencia del agente reductor hidroquinona, la cual se encuentra presente en uno de los dos reactivos que componen este sistema de revelado.

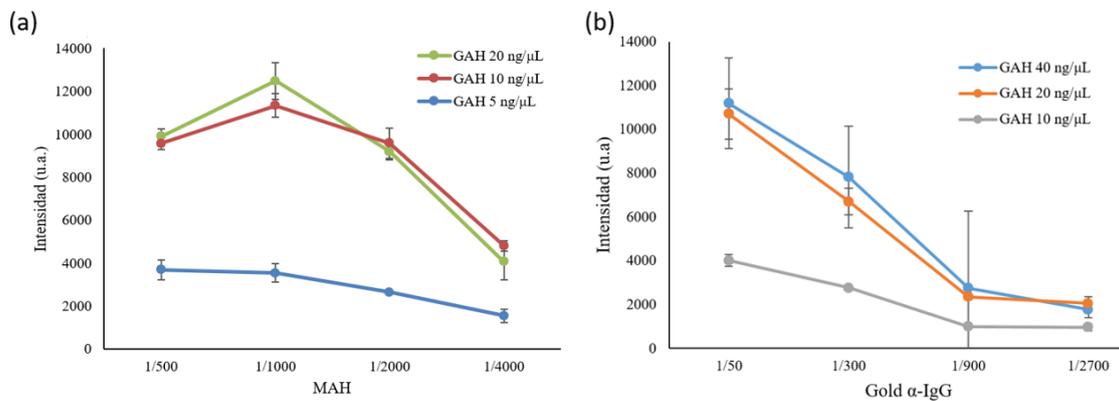
#### 4.3.1. Determinación IgG totales: anticuerpo de captura y anticuerpo primario y revelado

Las condiciones del inmunoensayo mediante el revelado con TMB se optimizaron titulando el anticuerpo de captura (GAH), el anticuerpo primario (MAH) y manteniendo constante la dilución 1/200 del anticuerpo de revelado (GAM-HRP). Mientras que, para la optimización mediante el revelado con plata, se tituló el anticuerpo de captura (GAH) y el anticuerpo primario de revelado policlonal marcado con oro (Gold  $\alpha$ -IgG) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Condiciones del inmunoensayo para la optimización de los distintos anticuerpos usados en los métodos enzimático y metalográfico para la determinación de IgG.

Anticuerpo	Enzimático (HRP/TMB)		Metalográfico (Au/Ag)	
	Estudiado	Seleccionado	Estudiado	Seleccionado
Captura (ng/ $\mu$ L)	5 - 20	20	10-40	20
Primario	1/500 - 1/4000	1/1000	1/50-1/2700	1/50

En la Figura 24 se muestran las intensidades netas obtenidas para el revelado enzimático y metalográfico. Se observa que la señal es muy baja cuando la impresión del anticuerpo de captura (GAH) es 5 ng/μL (Figura 24a) y 10 ng/μL (Figura 24b). Los resultados se evaluaron mediante un análisis de la varianza multifactorial para un nivel de confianza del 95% para ambos revelados. Con TMB, los resultados mostraron que no existían diferencias estadísticamente significativas entre la impresión del anticuerpo de captura a 10 y a 20 ng/μL ( $p = 0,7932$ ), mientras que las diferentes diluciones de anticuerpo primario (MAH) sí presentaban un efecto estadísticamente significativo sobre la señal ( $p = 0$ ). Para el revelado con plata, tampoco se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre la impresión del anticuerpo de captura a 20 y a 40 ng/μL ( $p = 0,584$ ), mientras que las diferentes diluciones de anticuerpo primario (Gold α-IgG) sí presentaban un efecto estadísticamente significativo sobre la señal ( $p = 0,0001$ ).

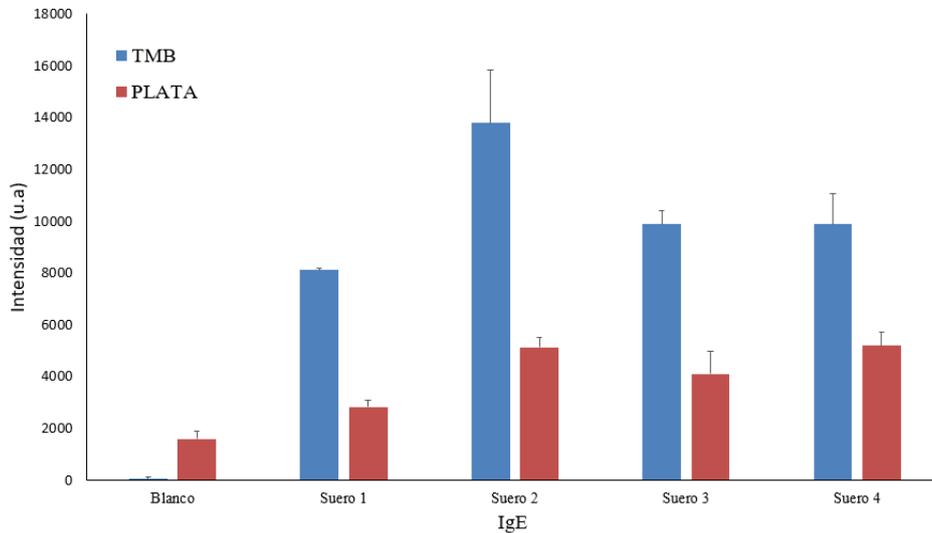


**Figura 24.** Intensidad de señal para el revelado enzimático (a) y metalográfico (b) en función de la concentración de impresión del anticuerpo de captura (GAH) y la dilución de anticuerpo primario (MAH o Gold α-IgG) para una concentración de IgG de 1 ng/μL. Réplicas: 3.

#### 4.3.2. Determinación de IgG específica: comparación de la señal entre revelado enzimático y metalográfico

Los sistemas de revelado optimizados para IgG total, se probaron para IgG específica incubando 5 sueros de pacientes alérgicos diluyéndolos 1/50 con el fin de comparar su capacidad de amplificación de señal. En la Figura 26 se muestran las señales obtenidas para cada uno de los sueros, así como del blanco (incubación con PBST). Las señales de los pacientes son sustancialmente más intensas que el blanco, lo que indica que el sistema funciona correctamente y es capaz de distinguir entre muestras con IgG y muestras sin IgG.

El análisis de la varianza multifactorial para un nivel de confianza del 95% junto con los resultados observados, indicaron que tanto la forma de revelado ( $p = 0$ ) como la concentración de IgG (diferente en cada paciente) ( $p = 0$ ) son críticas en el estudio. Dadas las diferencias de señal entre ambos sistemas de revelado (Figura 25), se seleccionó el revelado enzimático para determinar la IgG de todos los pacientes del estudio dada su mayor sensibilidad.



**Figura 25.** Comparación de los sistemas de amplificación de la señal: revelado enzimático y metalográfico.

#### 4.4. Cuantificación IgG específicas de los pacientes

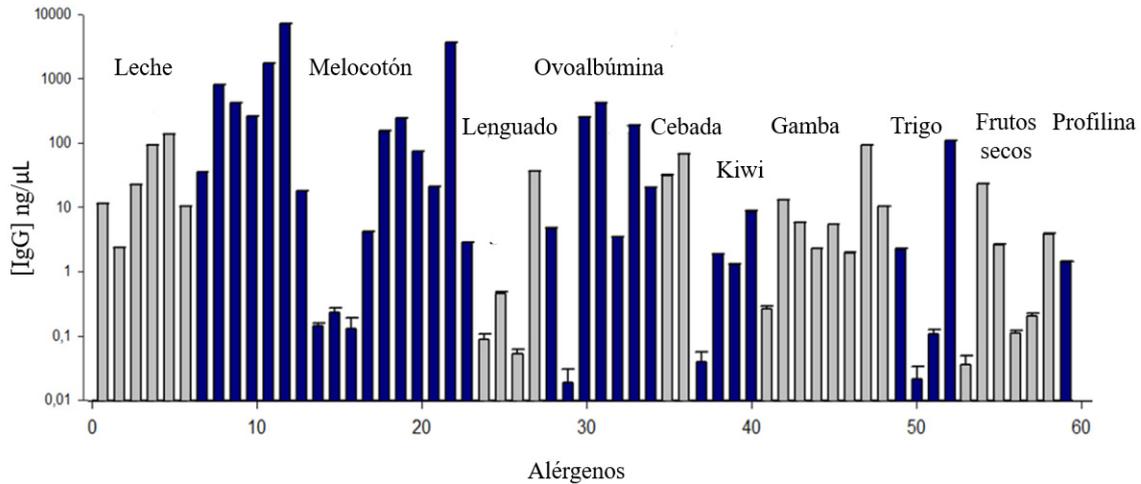
##### 4.4.1. Evaluación del ensayo multiplexado

Una vez seleccionadas las condiciones del ensayo, se incubaron distintas concentraciones de IgG humana: 0,04, 0,2, 1 y 5 ng/ $\mu$ L en PBST. A partir de las señales registradas, se calculó el límite de detección y de cuantificación a partir de 9 réplicas obteniéndose valores de 0,04 y 0,23 ng/ $\mu$ L, respectivamente. La reproducibilidad del método el mismo día y entre días distintos, obtenidas a partir de 4 réplicas analizadas, se encontró entre el 3,6-23% y de entorno al 30%, respectivamente.

Respecto a la reproducibilidad del método para la cuantificación de IgG específica, los valores de RSD obtenidos a partir de 4 réplicas se encontraron entre el 5-9% para los ensayos el mismo día y entre el 7-20% para los ensayos entre días distintos.

##### 4.4.2. Aplicación a muestras de pacientes alérgicos a alimentos

La aplicabilidad del método se estudió analizando la IgG específica presente en el suero sanguíneo de 37 pacientes a una dilución 1/50. Para cuantificar la IgG específica, se interpolaron las señales en la curva de calibrado. En la Figura 26, se observan las concentraciones de IgG específica para cada uno de los alérgenos a los cuales se encontraban sensibilizados los pacientes del estudio.



**Figura 26.** Representación de las concentraciones de IgG (ng/μL) específica obtenidas a partir de muestras de suero sanguíneo de pacientes alérgicos, agrupados según los alérgenos alimentarios recogidos en la normativa de la UE.

#### 4.5. Interpretación de los resultados

Aplicando la metodología desarrollada, se estableció un umbral de diagnóstico, es decir, un valor de concentración de este biomarcador para clasificar los pacientes en subgrupos. Para ello, se incubaron 9 pacientes no atópicos, a partir de los cuales se obtuvieron los valores de IgG específica basales frente a los distintos alérgenos. Las señales registradas para la IgG específica fueron promediadas y se interpolaron en la curva de calibrado para obtener el umbral (Tabla 4).

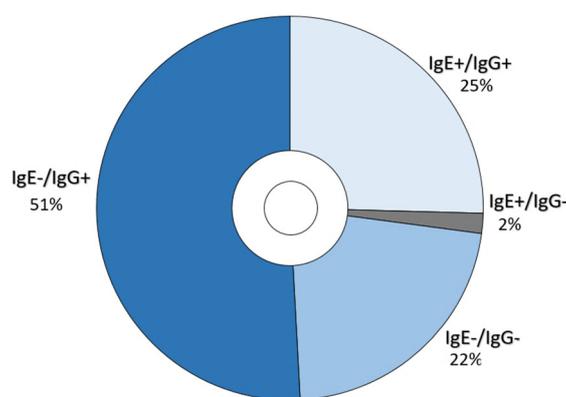
**Tabla 4.** Umbral de IgG específicas para los distintos alérgenos alimentarios basados en el promedio de sueros de pacientes no atópicos.

Alérgeno	Umbral (ng/μL)
Leche	640,4
Ovoalbúmina	396,9
Cebada	181,2
Kiwi	137,4
Pistacho	30,9
Gamba	20,2
Nuez	17,1
Trigo	7,1
Profilina	10,4
Cacahuete	2,7
Lenguado	1,3
LTP-melocotón	1,0

Esta variación en los umbrales (1 - 640 ng/μL) se interpretó según el mecanismo de la alergia alimentaria. Según indica Redondo (2018), la protección frente al alérgeno se puede lograr a través de una exposición regular y continua, que conlleva a lo que denominamos *desensibilización*. Esto implica, un descenso en la actividad de mastocitos y basófilos, que puede conllevar a un aumento IgG específica del alérgeno (acción protectora).

Los umbrales más elevados de IgG corresponden con la leche y la ovoalbúmina (huevo), alimentos a los que, generalmente se está expuesto en el día a día ya que se encuentran integrados en la dieta mediterránea. Es por ello, que estos valores de IgG podrían justificar la ausencia de hipersensibilidad en estos individuos.

Tras definir el umbral de diagnóstico para la IgG específica de los distintos alérgenos, se agruparon los pacientes en IgG positivos e IgG negativos. La figura 27, muestra la relación entre la IgE y la IgG específicas de los 37 pacientes estudiados. Se observó que la mitad de los alérgicos estaban por debajo del umbral de IgG mientras que, un cuarto lo superaba. De aquellos que no presentaban alergia, un 1,69% superó el umbral mientras que el 22% no lo hizo. Estos valores, sugieren el papel protector de la IgG frente a las reacciones alérgicas mediadas por IgE.



**Figura 27.** Clasificación de los 37 pacientes por su relación IgE e IgG.

Esta metodología *in vitro* en formato micromatriz presenta un elevado potencial. Su facilidad y rapidez de obtención de resultados, así como su bajo coste la convierten en una técnica prometedora para el diagnóstico clínico de alergia. La alergia alimentaria puede aparecer en cualquier etapa de la vida y muchos individuos presentan predisposición genética a padecerla, por lo que tener la posibilidad de conocer el nivel de sensibilización frente a un panel de alérgenos de forma simultánea es clave para proteger al consumidor y aumentar su seguridad. Así, el hecho de disponer información sobre el estado de salud de forma instantánea evitaría riesgos como es el choque anafiláctico (por ejemplo, monitorizando a los individuos). El consumidor tendría la oportunidad de evitar aquellos productos que, por predisposición genética u otro motivo, en un momento de su vida, han dejado de ser reconocidos como inocuos. Además, este método sería aplicable para el seguimiento de los tratamientos de inmunoterapia, monitorizando los niveles de IgE e IgG de los pacientes.

## 5. CONCLUSIONES

En este trabajo fin de grado se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- ✓ Se ha desarrollado una metodología analítica que permite la identificación de pacientes alérgicos a un panel de 12 alérgenos alimentarios mediante la cuantificación de IgE específica de un modo sencillo y fiable.
- ✓ Dada la capacidad de multiplexado de la metodología y la gran superficie del disco, es posible ampliar tanto el número y la naturaleza de alérgenos como la cantidad de muestras a analizar.
- ✓ El sistema permite la cuantificación de IgG específica, y así establecer la correlación de la concentración de IgG e IgE.
- ✓ Se ha observado que, aproximadamente el 50% de la población estudiada que no era alérgica, presentaba valores de IgG por encima del umbral (IgG positivos), sugiriendo el posible papel protector de esta inmunoglobulina en las alergias alimentarias.
- ✓ Estos ensayos pueden ayudar a optimizar la gestión del tratamiento de los pacientes alérgicos y a comprender el mecanismo de las alergias mediadas por inmunoglobulinas, contribuyendo en la mejora de la calidad de vida de los consumidores.

Este TFG se ha realizado en el contexto de una beca de Colaboración del Ministerio de Educación. Además, la Asociación de Científicos y Tecnólogos de Alimentos de Valencia (ACTA-V) en colaboración con el departamento de Tecnología de Alimentos a la Universidad Politécnica de Valencia concedió un premio extraordinario para la realización del mismo (ANEXO I). Por último, se participó en el XII International Workshop on Sensors and Molecular Recognition con la realización de un póster (ANEXO II).

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- ACERO, V. V. (2014). Detección de alérgenos. *AENOR: Revista de la normalización y la certificación*, (289), 6-12.
- ALMEIDA, M. B., BUSSAMRA, M. H. C., & RODRIGUES, J. C. (2006). ABPA diagnosis in cystic fibrosis patients: the clinical utility of IgE specific to recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens. *Jornal de pediatria*, 82(3), 215-220.
- ARMENTIA, S. L. L., & VIVAS, D. N. (2018). Alergia a proteínas de leche de vaca. *Pediatría Integral; XXII (2)*: 76 – 86.
- ARRUDA, E. (2004). Pruebas diagnósticas en alergia y su utilidad clínica. *Revista Médica Herediana*, 15(2), 113-117.
- BADRAN, A. A., MORAIS, S., & MAQUIEIRA, Á. (2017). Simultaneous determination of four food allergens using compact disc immunoassaying technology. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 409(9), 2261-2268.
- BLANCO, C. Repercusión clínica de la reactividad cruzada. *Revista Española Alergología e Inmunología Clínica*. 2001; 6: 30-5.
- BIOAGILYTIX (2018). Immunocap platform for immunogenicity testing. Visto el 17 junio 2018. <https://www.bioagilytix.com/immunocap-platform-for-immunogenicity-testing/immunocap-2/>
- BURKS, A. W., TANG, M., SICHERER, S., MURARO, A., EIGENMANN, P. A., EBISAWA, M., FIOCCHI, A., CHIANG, W., BEYER, K. WOOD, R., HOURIHANE, J., JONES, S.M., LACK, G. & SAMPSON, H.A. (2012). ICON: food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(4), 906-920.
- DOBOSZ P, MORAIS S, PUCHADES R, MAQUIEIRA, A. Massive immune multiresidue screening of water pollutants. *Anal Chem*. 2015;87: 9817–24.
- HALKEN, S. y MURARO, A. (2014). Alergias alimentarias, en *Global Atlas of Allergy*. European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Ed. Board. 199-201.
- HEFLE, S. L., & TAYLOR, S. L. (2004). Food allergy and the food industry. *Current allergy and asthma reports*, 4(1), 55-59.
- HERNÁNDEZ, R. (2013). Diferencias entre CD, DVD y Blu-RAY. Visto el 12 junio 2018 <<http://rodhzuniga.blogspot.com/2013/01/diferencias-entre-cddvd-y-blu-ray.html>>

- IBÁÑEZ-SANDÍN, M.D.P, DE LA HOZ CABALLER, M.B., ESCUDERO-DIEZ, C., CUESTA-HERRANZ, J. (1999) Metodología diagnóstica en la alergia a los alimentos, en SEAIC. Cap. 50.
- IGLESIAS, E. M. (2018). Alergia a los alimentos. *Pediatría Integral*, 2018; XXII (2): 87 – 93.
- KINDT, T.J., GOLDSBY, R.A., OSBORNE, B.A. (2007). *Inmunología de Kuby*. 6ª Ed. McGraw-Hill Interamericana, Mexico. 699 pp.
- LÓPEZ, M. (2005). Estandarización de IgE específica. *Documento consenso del comité de Inmunología Clínica de la SEAIC*, 22 pp.
- MAYORGA, C., SANZ, M. L., GAMBOA, P. M., GARCÍA, B. E., CABALLERO, M. T., GARCIA, J. M., LABRADOR, M., LAHOZ, C., LONGO-ARESO, N., LÓPEZ-HOYOS, M., QUESADA, J. M. & MONTESEIRÍN, F.J. (2010). *In vitro* diagnosis of immediate allergic reactions to drugs: an update. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 20(2), 103-9.
- MORAIS, S., TAMARIT-López, J., CARRASCOSA, J., PUCHADES, R., & MAQUIEIRA, Á. (2008). Analytical prospect of compact disk technology in immunosensing. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 391(8), 2837-2844.
- MORAIS, S., PUCHADES, R., & MAQUIEIRA, Á. (2016). Disc-based microarrays: principles and analytical applications. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(17), 4523-4534.
- MORENO, M.V. (2016). Diferencias en el perfil clínico e inmunológico de pacientes alérgicos a frutas en el área este de España. Tesis Doctoral en Ciencias Químicas. Univ. Autònoma de Barcelona, 219pp.
- PHADIA (2012) Fundamentos del procedimiento de análisis. Visto el 17 junio 2018. <<http://www.phadia.com/es/5/Productos/ImmunoCAP-ISAC/Principio-del-test-ImmunoCAP-ISAC/>>
- QUIRÓS, Joselyn. (2003). Diagnóstico de alergias utilizando IgE alérgeno-específico. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 38(1-2), 20-25.
- REDONDO, M. R. (2018). Metodología diagnóstica en Alergología Pediátrica. *Pediatría Integral*, 2018; XXII (2): 102.e1 – 102.e8.
- REGLAMENTO (UE) nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor.
- SICHERER, S. H. (2011). Epidemiology of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 594-602.

- SICHERER, S. H. (2014). Factores de riesgo ambiental para la alergia: alimentos, en: *Global Atlas of Allergy*. European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Ed. Board. 127-129.
- SICHERER, S. H., & SAMPSON, H. A. (2010). Food allergy. *Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2), S116-S125.
- SICHERER, S. H., & SAMPSON, H. A. (2014). Food allergy: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(2), 291-307.
- TORTAJADA-GENARO, L.A.; SANTIAGO-FELIPE, S.; MORAIS, S.; GABALDÓN, J.A.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, Á. (2012). Multiplexed DNA detection of food allergens on a digital versatile disk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 36-43.
- TEMPLIN, M. F., STOLL, D., SCHRENK, M., TRAUB, P. C., VÖHRINGER, C. F., & JOOS, T. O. (2002). Protein microarray technology. *Drug discovery today*, 7(15), 815-822.
- VAN HENGEL, A. J. (2007). Declaration of allergens on the label of food products purchased on the European market. *Trends in food science & technology*, 18(2), 96-100.
- WORM, M., BOHLE, B., MURARO, A. (2018). Food allergy. *EAACI White Paper on Research, Innovation and Quality Care*, 65-68.



ACTA VALENCIA



ACTA UPV

La Asociación de Científicos y Tecnólogos de Alimentos de Valencia (ACTA-V),  
en colaboración con el departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia,  
conceden un premio extraordinario para la realización del trabajo fin de grado a:

*Doña Natalia Casañ Raga*

Por su excelencia como alumna de la Diplomatura en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.



El Presidente de Acta-V

D. Javier Tomas Valle

La Secretaria

Dña. Carme Navarro Altarriba

El Tesorero

D. Juan A. Serra Belenguer

En Valencia a 18 de mayo de 2018.

# ENSAYO *IN VITRO* PARA LA DETECCIÓN MULTIPLEXADA DE ALERGIAS ALIMENTARIAS

Natalia Casañ-Raga<sup>1</sup>, Salvador Mas<sup>1</sup>, Ángel Maquieira<sup>1,2</sup>, Luis A. Tortajada-Genaro<sup>1,2</sup>, Dolores Hernández Fernández de Rojas<sup>3</sup>, Ethel Ibáñez-Echevarría<sup>3</sup>, Sergi Morais<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM). Universitat Politècnica de València-Universitat de València. Camino de Vera s/n, 46022 Valencia.

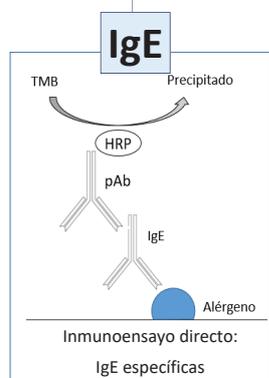
<sup>2</sup>Departamento de Química, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, E46022 Valencia.

<sup>3</sup>Hospital Universitari i Politènic La Fe, Servicio de Alergología, Avinguda de Fernando Abril Martorell, 106, 46026 València, Spain. Email: nacara@etsiamn.upv.es

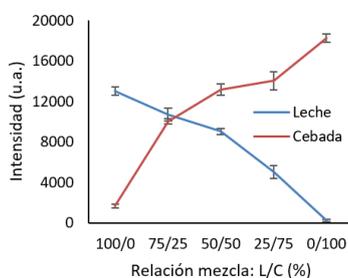
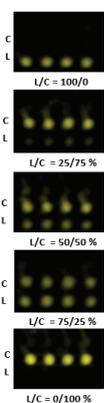


La alergia alimentaria es una hipersensibilidad de tipo I que afecta al 6% de los niños y al 2% de los adultos. Desencadena síntomas molestos y disminuye la calidad de vida además de suponer un elevado coste personal y sanitario. La IgE es el biomarcador utilizado para su diagnóstico, mientras que la IgG puede considerarse un marcador de respuesta inmunológica protectora. El **objetivo** de este trabajo es la puesta a punto de un ensayo *in vitro* multiplexado, fiable y de bajo coste, para la determinación de alergias alimentarias en una población de 47 individuos.

## Imunodetección



## Selectividad



LOD = 0.31  
LOC = 0.41  
(UI/mL)

Ensayo de selectividad realizado con mezclas de muestras de pacientes alérgicos. En las imágenes se muestra el perfil de reconocimiento y en la gráfica la evolución de la intensidad para los alérgenos leche (L) y cebada (C).

## Validación

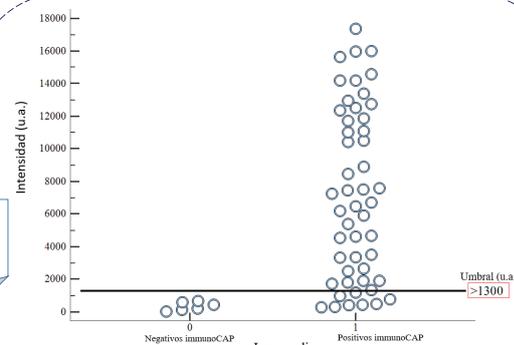
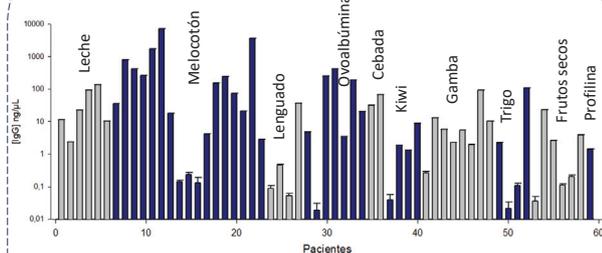


Diagrama de puntos representando los valores de intensidad para cada uno de los pacientes agrupados en función de los resultados del método de referencia immunoCAP. La barra horizontal representa el umbral de diagnóstico. La sensibilidad y especificidad del inmunodisco del 84 % y del 100 %, respectivamente.

## Cuantificación IgG específicas

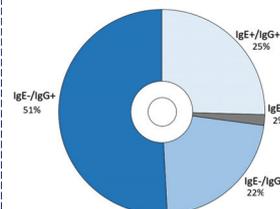


Representación de las concentraciones de IgG (ng/μL) específicas obtenidas a partir de muestras de suero sanguíneo de 37 pacientes alérgicos, agrupados según los alérgenos alimentarios recogidos en la normativa de la UE.

## IgE vs IgG

En la tabla se muestran los valores de IgG específicos considerados como umbral para los distintos alérgenos alimentarios.

Alérgeno	Umbral (ng/μL)
Leche	640.4
Ovaalbúmina	396.9
Cebada	181.2
Kiwi	137.4
Pistacho	30.9
Gamba	20.2
Nuez	17.1
Trigo	7.1
Profilina	10.4
Cacahuete	2.7
Lenguado	1.3
LTP-melocotón	1.0



Clasificación de los pacientes en función de los resultados de IgE y IgG obtenidos.

## Conclusiones

- ✓ Se ha desarrollado un método para la detección simultánea de IgE e IgG específicas a los principales alérgenos alimentarios.
- ✓ Se ha estudiado la correlación de la concentración de IgG e IgE y se ha observado que, aproximadamente el 50% de la población estudiada que no era alérgica, presentaba valores de IgG por encima del umbral (IgG positivos), sugiriendo el posible papel protector de esta inmunoglobulina en las alergias alimentarias.
- ✓ Estos métodos apoyarán a mejorar la gestión de los pacientes alérgicos y a la comprensión del mecanismo de las alergias mediadas por inmunoglobulinas.

**ACKNOWLEDGMENTS:** Financial support from FEDER, GVA (PROMETEO/2014/40), COBIOPHAD (Horizon 2020, 688448) and Spanish MINECO (CTQ2016-75749-R)