

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**



***Evaluación comparativa de dos métodos  
de diagnóstico para la determinación de  
alergia respiratoria***

***Comparison of two diagnostic methods for  
the determination of respiratory allergy***

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**

Autora: Ana Parra Hernández

Tutora: María Adelaida García Gimeno

**Curso 2019-2020**

**VALENCIA, SEPTIEMBRE DE 2020**



## **Glosario abreviaturas**

**APC-> Células presentadoras de antígenos**

**CCD-> Cross-reactive carbohydrate determinants o determinantes de reactividad cruzada con carbohidratos**

**CD40L-> proteína CD40 ligando**

**Der p 1-> Dermatophagoides pteronyssinus 1**

**Der p2-> Dermatophagoides pteronyssinus 2**

**FcεRI-> Receptor de alta afinidad**

**IgE-> Inmunoglobulina E**

**IgG-> Inmunoglobulina G**

**IL-4-> Interleuquina 4**

**IL-30-> Interleuquina 30**

**ITAM-> Motivos de activación basados en tirosina**

**NBT / BCIP-> cloruro de tetrazolio nitroblue / 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato**

**MD -> métodos de diagnóstico molecular**

**PC-> Pruebas cutáneas**

**RC -> Rinoconjuntivitis**

**Rpm-> revoluciones por minuto**

**TAB -> test de activación de basófilos**

**TH2-> Linfocitos T helper 2**

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismo alergia	5
<b>Figura 2.</b> Estructura y conformación IgE	6
<b>Figura 3.</b> Estructura y conformación IgE	6
<b>Figura 4.</b> Prevalencia de patologías asociadas a aeroalérgenos	8
<b>Figura 5.</b> Asociación de la urticaria con otras patologías	9
<b>Figura 6.</b> Funcionamiento discriminatorio del InmunoCAP <i>Phadia 250</i> <sup>®</sup>	12
<b>Figura 7.</b> Fármacos que distorsionan los resultados de las PC	14
<b>Figura 8.</b> Proporción por sexo de los pacientes estudiados	18
<b>Figura 9.</b> Distribución por sexo y general de la edad de los pacientes analizados respectivamente	18
<b>Figura 10.</b> Gráficas obtenidas a partir de los resultados del índice de correlación de Pearson	22- 23

<b>Tabla 1.</b> Alérgenos evaluados en las PC	15
<b>Tabla 2.</b> Alérgenos evaluados en Euroline <sup>™</sup> .	16
<b>Tabla 3.</b> Porcentaje positividad alérgenos en PC ordenados de mayor a menor	19
<b>Tabla 4.</b> Porcentaje positividad Euroline y nivel de IgE específica ordenados de mayor a menor junto con la desviación estándar	20
<b>Tabla 5.</b> Niveles promedio de IgE específica para cada alérgeno medidos por Euroline	21
<b>Tabla 6.</b> Índice de correlación de Pearson entre alérgenos	21
<b>Tabla 7.</b> Comparativa entre los distintos índices de correlación y determinación	25

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	4
<b>ABSTRACT</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	4
1.1 Aspectos moleculares de la alergia .....	4
1.2 Tipos de alérgenos .....	7
1.3 Prevalencia de las enfermedades alérgicas .....	7
1.4 Métodos de diagnóstico en alergia.....	9
1.4.1 Métodos “in vivo” .....	9
1.4.2 Métodos “in vitro” .....	10
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	13
2.1 Diseño experimental .....	13
2.2 Participantes.....	13
2.3 Medidas.....	14
2.4 Análisis estadístico .....	16
<b>RESULTADOS</b> .....	17
3.1 Datos demográficos de la población de estudio .....	17
3.2 Análisis descriptivo de los resultados de las pruebas complementarias .....	18
3.2.1 Prueba cutánea .....	18
3.2.2 Euroline .....	19
3.3 Estudio de correlación de los resultados de la prueba cutánea con Euroline .....	20
<b>DISCUSIÓN</b> .....	25
<b>CONCLUSIONES</b> .....	27
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	28

## ABSTRACT

Allergy is a immunological diseases with the most impact in the world. Since the clinical point of view, allergy is defined like a exacerbate reponse of the own immune system against external substances of differents sources as food, insect venoms or another arthropodal, medicines, latex, chemicals or aeroallergens like dust mite, animal epitheliums, fungus and pollen. Rhinitis and asthma joined suppose more of 50% of the allergic diseases and affect between 10-30% of population. That suppose a risk factor of asthma development. Consequently it produce a mucosa inflammation upon which it produce specific IgE against the aeroallergens sensitive to the patient. The impact of this pathology is increased in all western countries. Thanks to insertion of the new allergy methods, diagnosis have been improving significantly. New precisión medicine approachs are focus to support the clinical traditional diagnosis (skin prick test, SPT), with molecular diagnosis test that allow the determination of the specific IgE profile in each patient. The present work describe a descriptive, cross-sectional observational with retrospective data collection in which two of these methods, skin tests and the Euroline™ trial, EUROIMMUN AG, Lübeck, Germany will be compared in order to show the similarity in the results of both tests. For this, 46 patients belonging to the Allergy Service of the Hospital Universitario La Fe de Valencia were randomly selected. Of these 46 patients, 2 are negative controls, which didn't have any positive result in both PC and Euroline. Finally, the evidence on the similarity of the results is clear, as has been demonstrated with the use of Pearson's correlation coefficient and Cohen's Kappa coefficient. Although, without a doubt, the major limitation of the study is the sample number, which should be higher in order to establish more consolidated evidence. Therefore, these indications seem to suggest that Euroline could be established as a personalized diagnostic method as an alternative to singleplex or multiplex methods. Although, in the case of establishing multiparametric or multiplex methods as the only diagnostic tool, it would be necessary to clarify what will be the situations in which one or the other should be used depending on the clinical and symptomatology of the patients.

**Key words:** Diagnosis, *in vitro*, allergy, specific IgE, aeroallergens

## RESUMEN

La alergia es una de las enfermedades inmunológicas con más repercusión a nivel mundial. Desde el punto de vista clínico, la alergia se define como una respuesta exacerbada del propio sistema inmunitario contra ciertas sustancias externas, provenientes de distintas fuentes alérgicas como alimentos, venenos de insectos u otros artrópodos, medicamentos, látex, sustancias químicas o alérgenos respiratorios como ácaros del polvo, epitelios de animales, hongos y pólenes. La rinitis el asma y ambas juntas suponen más del 50% de las enfermedades alérgicas y afectan a un 10-30% de la población lo que supone un factor de riesgo para el desarrollo de asma. Como consecuencia se produce una inflamación de la mucosa en la que se produce IgE específica frente el aeroalérgeno que se haya sensibilizado el paciente. La incidencia de esta patología se encuentra sobre todo elevada en países occidentales. Gracias a la introducción de los nuevos métodos de alergia molecular, el diagnóstico de esta enfermedad se ha visto mejorado significativamente. Los nuevos enfoques de medicina de precisión en el campo de alergia se centran en apoyar el diagnóstico clínico tradicional (pruebas cutáneas, PC), con pruebas de diagnóstico molecular que permiten la determinación del perfil de IgE específica para cada paciente. El presente trabajo describe un estudio observacional descriptivo, transversal con recogida retrospectiva de información en el que se compararán dos de estos métodos, pruebas cutáneas y el ensayo Euroline™, EUROIMMUN AG, Lübeck, Alemania con el fin de poner de manifiesto la similitud en los resultados de ambas pruebas. Para ello se seleccionaron aleatoriamente 46 pacientes pertenecientes al Servicio de Alergia del Hospital Universitario La Fe de Valencia. De estos 46 pacientes, 2 son controles los negativos, lo cuales no poseían ningún resultado positivo tanto en PC como en Euroline. Finalmente, las evidencias sobre la similitud de los resultados son claras, como ha quedado demostrado con el uso del coeficiente de correlación de Pearson y el coeficiente Kappa de Cohen. Aunque, sin duda, la mayor limitación del estudio es el número muestral, el cual debería ser más elevado para así poder establecer una evidencia más consolidada. Por lo que, estos indicios parecen sugerir que Euroline podría ser establecido como método de diagnóstico personalizado como alternativa a los métodos singleplex o multiplex. Aunque, en el caso de establecer a los métodos multiparamétricos o multiplex como única herramienta de diagnóstico, sería necesario esclarecer cuáles serán las situaciones en las que se deberían utilizar unos u otros en función de la clínica y sintomatología de los pacientes.

**Palabras clave:** Diagnóstico, *in vitro*, alergia, IgE específica, aeroalérgenos



# INTRODUCCIÓN

La alergia es una de las enfermedades inmunológicas con más repercusión a nivel mundial. Afecta a casi el 30% de la población, y su consecuencia más grave (anafilaxia) puede implicar a diferentes órganos tales como el tracto respiratorio superior e inferior, la piel, el tracto gastrointestinal y el sistema cardiovascular (Valenta et al., 2018).

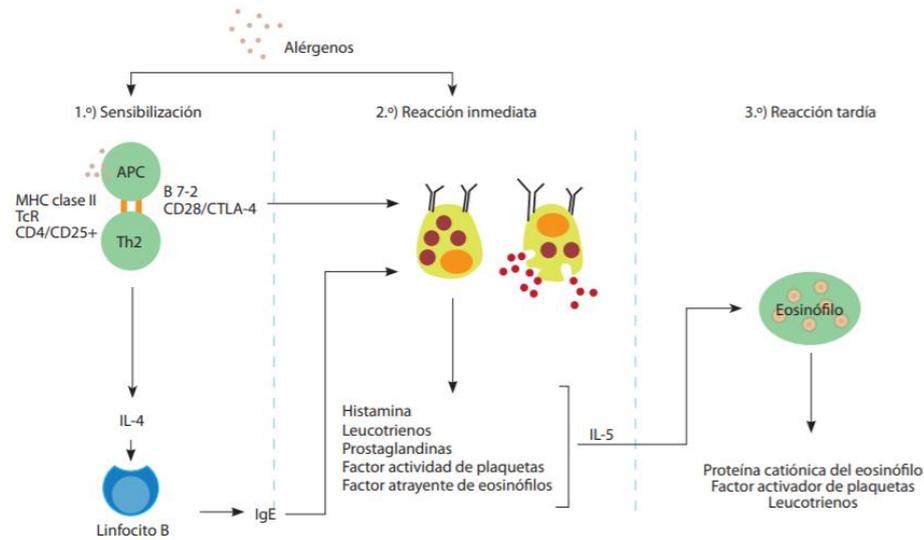
## 1.1 Aspectos moleculares de la alergia

Desde el punto de vista clínico, la alergia se define como una respuesta exacerbada del propio sistema inmunitario contra ciertas sustancias externas, provenientes de distintas fuentes alergénicas como alimentos, venenos de insectos u otros artrópodos, medicamentos, látex, sustancias químicas o alérgenos respiratorios como ácaros del polvo, epitelios de animales, hongos y pólenes (Zubeldia, Baeza, Jáuregui, & Senent, 2012).

En la mayoría de las ocasiones, la alergia suele estar ocasionada por proteínas o glicoproteínas, que no son más que proteínas que en el proceso de modificación post-traducciona han sufrido la adición de una o más moléculas de hidratos de carbono. También es común la alergia por lipoproteínas o proteínas que transportan lípidos, o incluso por azúcares no asociados a otras proteínas (alfa-galactosa). Para que se produzca la respuesta alérgica es necesario el contacto previo del organismo con los alérgenos implicados (pólenes, ácaros, etc.), ya que la hipersensibilidad tipo I es el mecanismo mayoritariamente implicado. El alérgeno será captado e introducido en el interior de unas células conocidas como células presentadoras de antígenos (APC), que procesarán el alérgeno en su interior para su posterior presentación a los linfocitos B, quienes se encargarán de producir la inmunoglobulina E (IgE) específica frente al alérgeno (Fig. 1). Una vez producida, la IgE es fijada en la superficie de las células (fundamentalmente mastocitos y basófilos), productoras de agentes mediadores de la respuesta alérgica (Fase de sensibilización). Por este motivo, en la primera exposición al alérgeno no suelen observarse manifestaciones clínicas. (Zubeldia et al., 2012).

Posteriormente, cuando se produce la reexposición al alérgeno, la IgE sintetizada en la fase de sensibilización y fijada en la superficie de mastocitos y basófilos, reconoce específicamente al alérgeno desencadenándose, en consecuencia, la liberación de los mediadores inflamatorios como histamina, triptasa o leucotrienos que dan lugar a los síntomas típicos de la alergia como enrojecimiento (eritema), hinchazón (edema) o picor (prurito). Las alergias asociadas a alimentos suelen desencadenar efectos como hinchazón de boca y labios, o en situaciones más graves náuseas, vómitos o dolor abdominal. Sin embargo, la manifestación alérgica que más complicaciones ocasiona es la anafilaxia. La anafilaxia se define principalmente como una

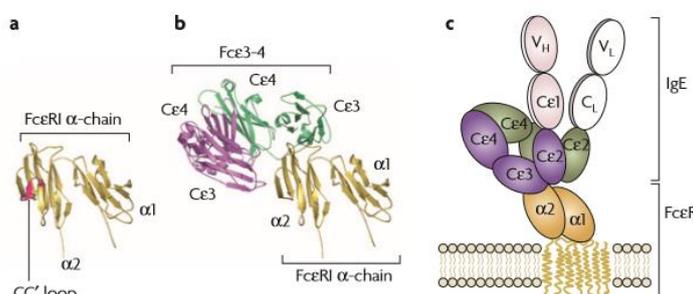
reacción rápida y sistémica, es decir, que implica a distintos órganos como la piel, el sistema respiratorio e incluso el sistema cardiovascular, pudiendo incluso causar la muerte del paciente (Zubeldia et al., 2012).



**Figura 1:** Mecanismo alergia. Fuente: Zubeldia, Baeza, Jáuregui, & Senent, 2012.

A nivel histórico, el término alergia (“allos”: otro y “ergon”: acción) fue utilizado por primera vez en 1906 por Clemens Von Pirquet para describir aquellas reacciones producidas por alérgenos que no se dan sino en ciertos individuos de una población. Sin embargo, no fue hasta 1966 cuando Johansson en Suecia y el matrimonio Ishizaka en EEUU determinaron que la alergia en sí estaba causada por una proteína que hoy en día conocemos como IgE o Inmunoglobulina de tipo E. Gracias a este descubrimiento, se pudo demostrar que la reacción de hipersensibilidad de tipo I es específica para ciertos antígenos (alérgenos), que requiere un factor sérico específico (IgE) y a su vez, un componente tisular (mastocitos) (Gell & Coombs, 1963)(Valenta et al., 2018).

La inmunoglobulina de tipo E supone el anticuerpo cuya concentración sérica es más baja, encontrándose en una proporción 50:50 libre en la sangre y unida a receptores de alta afinidad en tipos celulares como macrófagos y basófilos. La vida media de la IgE en sangre es de apenas dos días, mientras que su duración en tejidos y células puede llegar a ser de dos meses. Estas características determinan en gran medida el método de diagnóstico a utilizar en base a la historia clínica de los pacientes que han sufrido una reacción alérgica (Popescu & Vieru, 2018).

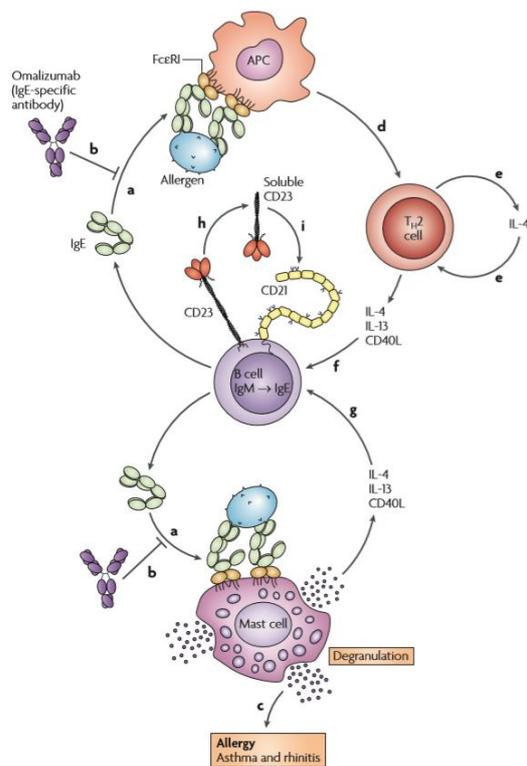


**Figura 2:** Estructura y conformación IgE. Fuente: (Gould & Sutton, 2008).

Desde el punto de vista estructural, la IgE posee la misma estructura básica que el

resto de inmunoglobulinas humanas con dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, aunque la principal diferencia entre la inmunoglobulina G (IgG) y la IgE radica en que esta última posee en la cadena  $\epsilon$  pesada un dominio más que la cadena  $\gamma$  pesada de IgG (Fig 2). La IgE se encuentra unida a diferentes tipos celulares a través de un receptor de alta afinidad conocido como Fc $\epsilon$ RI, aunque también puede encontrarse soluble en sangre de pacientes sensibilizados. El receptor Fc $\epsilon$ RI puede aparecer en forma de tetrámero  $\alpha\beta\gamma_2$  en mastocitos y basófilos, como un trímero  $\alpha\gamma_2$  en APC humanas e incluso en monocitos, eosinófilos, plaquetas y células de músculo liso. Como la mayoría de los receptores celulares, este receptor posee dos dominios extracelulares en la cadena  $\alpha$  (sFc $\epsilon$ RI $\alpha$ ) cuya función es la unión de la IgE y un dominio de señalización intracelular basado en motivos tirosina que permiten la activación de los inmunorreceptores (ITAM) en las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  (Gould & Sutton, 2008).

Los mastocitos y los basófilos se encuentran en las mucosas formando el complejo IgE-Fc $\epsilon$ RI de



**Figura 3:** Cadena de activación en enfermedades alérgicas. Fuente: (Gould & Sutton, 2008).

tal manera, que cuando se produce el contacto con el alérgeno, da lugar a lo que hoy conocemos como hipersensibilidad inmediata. Los mastocitos son generados en la médula ósea para posteriormente migrar a las mucosas. Allí comienza a expresarse el receptor de alta afinidad debido a la elevada presencia de IgE, cuya concentración es superior a la libre en sangre, probablemente por la presencia de células B locales (Gould & Sutton, 2008).

En definitiva, para que tenga lugar la reacción alérgica *per se*, es necesario el contacto previo con un alérgeno para la activación de los linfocitos B. En estos se produce un cambio de isotipo de IgM a IgE en la cadena pesada de las inmunoglobulinas. La IgE se unirá al receptor de alta afinidad presente en los mastocitos y en las

APC que regularán positivamente la activación de otras células. Una vez que se produce la reexposición a dicho alérgeno, tiene lugar la degranulación celular de los mastocitos. La presentación antigénica de las APC a los linfocitos T conduce a la diferenciación de estos hacia el linaje T helper 2 (TH2), que se encargan de la producción y liberación de interleuquina 4 (IL-4) para mantener su propia diferenciación, y de interleuquina 30 (IL-30) que junto con la

expresión de CD40L permite el cambio de isotipo de la IgE. Hoy en día se dispone de un tratamiento biológico (Omalizumab), que se utiliza para bloquear la unión de la IgE al receptor de alta afinidad FcεRI (Fig 3).

## 1.2 Tipos de alérgenos

Los antígenos o alérgenos causantes de las reacciones alérgicas se pueden clasificar según su origen, su especie, o su mecanismo de sensibilización.

- Alérgenos inhalados o aeroalérgenos: son incorporados mediante las vías respiratorias. Se distinguen dos grupos, los alérgenos de *interior*, como los ácaros del polvo o la caspa de animales, que se asocian a una sintomatología perenne, y los alérgenos de *exterior*, como los pólenes, cuya sintomatología suele ser estacional debido a la polinización.

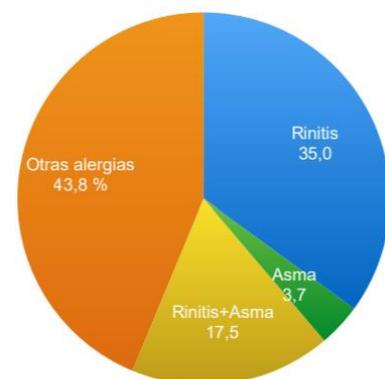
- Alérgenos por ingestión: dentro de este grupo se encuentran principalmente los alimentos. La sintomatología asociada a la alergia alimentaria puede darse en diferentes órganos como la piel (prurito), el sistema digestivo (náuseas o vómitos), sistema respiratorio (estornudos, dificultad respiratoria...), el sistema cardiovascular o el sistema nervioso. Los niños son comúnmente alérgicos a proteínas de la leche, huevos y pescado, mientras que los adultos lo son a frutas, verduras, frutos secos o mariscos.

- Alérgenos inyectados: o picaduras de insectos. En estos casos, el alérgeno es inoculado directamente en el organismo, entrando en contacto con el sistema inmunitario, por lo que estas picaduras se asocian con reacciones rápidas o inmediatas. Los principales insectos cuyas picaduras son causantes de alergias son los himenópteros (véspidos y ápidos) y las garrapatas.

- Medicamentos: estos compuestos adquieren su capacidad alérgica al asociarse a proteínas transportadoras. En nuestro país, los medicamentos que más comúnmente causan alergia son los antibióticos derivados de la penicilina y antiinflamatorios como el ibuprofeno (Zubeldia et al., 2012).

## 1.3 Prevalencia de las enfermedades alérgicas

Los alérgenos inhalados son responsables de patologías ampliamente conocidas como son la rinitis alérgica, la conjuntivitis, el asma leve, el asma grave, la urticaria y el angiodema. Como puede observarse en la figura 4, la rinitis el asma y ambas juntas suponen más del 50% de las enfermedades alérgicas.



**Figura 4:** Prevalencia de patologías asociadas a aeroalérgenos. Fuente: (Sastre Domínguez, 2017)

La rinitis alérgica aparece como consecuencia de la inflamación de la mucosa nasal tras la reexposición a un alérgeno inhalado. Afecta a un 10-30% de la población y supone un factor de riesgo para el desarrollo de asma. Como consecuencia de la inflamación de la mucosa, se produce IgE específica frente el aeroalérgeno que se haya sensibilizado el paciente. La incidencia de esta patología se encuentra sobre todo elevada en países occidentales. La conjuntivitis implica tanto cuadros leves como episodios graves, donde se produce una inflamación severa de la mucosa conjuntival con afectación corneal (Ryan, Yusuf, Stubbe Ostergaard, & Román-Rodríguez, 2013).

La prevalencia de la rinoconjuntivitis (RC) es ligeramente mayor en el sexo femenino que en el masculino (55,4% y 44,6% respectivamente ) (Ryan et al., 2013), y esto puede ser debido a la mayor activación inmunológica de las mujeres debido a la influencia de las hormonas sobre el sistema inmunitario (Ghazeeri, Abdullah, & Abbas, 2011).

El 65,1% de los pacientes alérgicos residen en áreas urbanas, el 24,3% en semiurbanas y el 10,3% en u áreas rurales (Sastre Domínguez, 2017).

Los pacientes con rinitis alérgica cuyo perfil de sensibilización a alérgenos es más variado, poseen una mayor probabilidad de padecer asma (Matricardi, Dramburg, Potapova, Skevaki, & Renz, 2019).

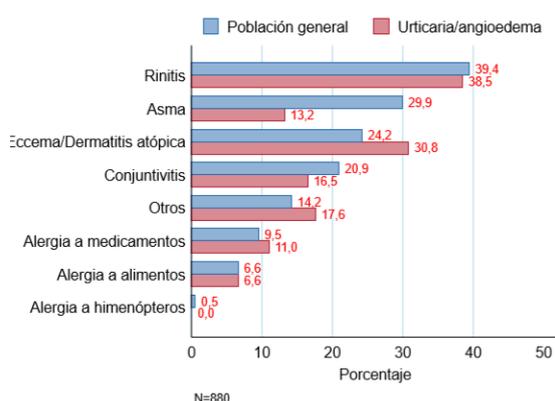
El asma aparece como consecuencia de una inflamación de las vías respiratorias, que puede tener lugar tanto en la infancia como en la edad adulta, y que suele perdurar durante toda la vida del individuo. La aparición de hiperreactividad de las vías respiratorias asociada a una obstrucción del flujo de aire es lo que empeora notablemente la calidad de vida de los pacientes, si no reciben el tratamiento adecuado (Ryan et al., 2013).

La atopia se define como la predisposición genética para desarrollar reacciones de hipersensibilidad mediadas por IgE frente a alérgenos inhalados, lo que supone un factor importante para el desarrollo del asma en la infancia. En los casos más graves de asma, se debe tratar a los pacientes con dosis altas de corticoesteroides inhalados o sistémicos. Actualmente, los pacientes no respondedores son tratados con terapia biológica cuyo objetivo es la inhibición de la respuesta de los linfocitos Th2 (Ryan et al., 2013).

Los pacientes que sufren asma tienen una edad media de 29,5 años. Aunque la prevalencia de los estudios realizados sugiere dos posibles inicios del asma, uno entre los 5 y los 15 años, y otro entre 35 y 40 años. Los datos de incidencia según el sexo coinciden con los de la rinoconjuntivitis, siendo del 55% en mujeres y de un 45 % en hombres. Por otro lado, los niños

son más propensos a sufrir episodios moderados a graves frente a los adultos, en los que predominan los episodios leves (Sastre Domínguez, 2017).

En un porcentaje muy elevado de pacientes, los síntomas comienzan tras el inicio de la primavera, ya que, como se ha comentado anteriormente, coincide con la estación de polinización de una gran parte de la vegetación.



**Figura 5:** Asociación de la urticaria con otras patologías. Fuente: (Sastre Domínguez, 2017)

Los signos y síntomas más característicos de la urticaria incluyen la aparición de habones, angioedema (inflamación profunda de la piel y mucosas) o ambos en cualquier parte del cuerpo, y pueden perdurar de 24 a 72 horas si no se administra el tratamiento adecuado (Ryan et al., 2013). El 12,8% de los pacientes que

sufren urticaria son niños mientras que los adultos suponen un 87,2%, lo que marca una clara diferencia entre niños y adultos. El

60% de los menores eran niñas mientras que el porcentaje de niños es del 40%. En la edad adulta, el mayor porcentaje corresponde a los varones con un 52,3%.

Suele ir muy relacionada con la aparición de otras patologías como la rinitis y el asma como puede observarse en la figura 5 (Sastre Domínguez, 2017).

#### 1.4 Métodos de diagnóstico en alergia

Las pruebas complementarias utilizadas en Alergia para el diagnóstico se pueden dividir en dos grandes grupos:

- Pruebas “in vivo”: son aquéllas que se realizan directamente sobre el paciente.
- Pruebas “in vitro”: son aquéllas que se realizan en muestras de sangre completa o suero extraídas de los pacientes.

##### 1.4.1 Métodos “in vivo”

Este grupo se clasifica principalmente en:

- Pruebas cutáneas. Se realizan sobre la capa más externa de la piel (epidermis) en la cara anterior del antebrazo) (Zubeldia et al., 2012).

- Pruebas intradérmicas. Más sensibles que las anteriores, se llevan a cabo cuando las PC no dan resultados fiables sobre la segunda capa de la piel (dermis), con ayuda de una fina aguja (Zubeldia et al., 2012).
- Pruebas epicutáneas. Se llevan a cabo mediante la mezcla del extracto o alérgeno con vaselina y su posterior contacto directo con la piel gracias a unos apósitos de polietileno. Al contrario que las anteriores, que dan resultados inmediatos, los apósitos permanecen en contacto con la piel durante dos días (Zubeldia et al., 2012).
- Pruebas de función respiratoria. Se utilizan sobre todo para diagnosticar enfermedades respiratorias relacionadas con la alergia como el asma. También se llevan a cabo para el seguimiento de los pacientes o para evaluar los efectos del tratamiento marcado, así como para determinar un mal pronóstico. Esta prueba consiste fundamentalmente en la realización de una espirometría la cual mide la cantidad de aire expirado e inspirado de manera forzada en un intervalo de tiempo. Actualmente, esta técnica se encuentra informatizadas (neumotacógrafos) para así facilitar la obtención de los resultados (Zubeldia et al., 2012).
- Pruebas de exposición. Hacen referencia a la exposición directa del paciente a una sustancia de naturaleza conocida, como por ejemplo alimentos, medicamentos, venenos o sustancias inhaladas para determinar su tolerancia en el organismo (“Pruebas de exposición, provocación, tolerancia | SEICAP - Pacientes,”).

#### 1.4.2 Métodos “in vitro”

Dentro de los métodos de diagnóstico molecular (MD), existen diferentes enfoques:

- Los métodos Singleplex son utilizados para una única determinación de IgE específica.
- Los métodos Multiparamétricos permiten realizar entre 1 y 10 determinaciones a la vez.
- Los métodos de Multiplex, los cuales detectan más de 100 tipos de sensibilizaciones simultáneamente.

##### 1.4.2.1 Métodos Singleplex

Este enfoque permite al alergólogo llevar a cabo una estrategia conocida como “de arriba hacia abajo” en la que a partir de la historia clínica y el resultado de las PC, el médico selecciona moléculas específicas basado en una hipótesis clínica precisa (Francesca et al., 2019).

Los métodos Singleplex actuales, se encuentran en su mayoría, automatizados. Para la realización de dichos métodos son necesarios una serie de componentes obligados como un

reactivo en el que se encuentran fijados los alérgenos ya sea en fase sólida o en fase líquida. Por último, es necesario un reactivo de detección anti-IgE que suele ser un anticuerpo monoclonal específico para el fragmento Fc constante de IgE humana y un sistema de calibración y procesamiento de datos (Popescu & Vieru, 2018).

El más conocido mecanismo de análisis de IgE específica Singleplex es la tecnología de inmunoensayo (FEIA) InmunoCAP *Phadia 250*<sup>®</sup> (hermo Fisher Scientific Inc., Phadia AB, Uppsala, Suecia) que permite la detección de anticuerpos de manera individual, precisa y cuantitativa, aunque los niveles sean bajos posibilitando el análisis de unos 650 extractos de alérgenos y 105 alérgenos moleculares individuales. El proceso de detección comienza con la fijación del alérgeno nativo o recombinante unido covalentemente a una esponjilla o “CAP” activada por bromuro de cianógeno de celulosa hidrofílica altamente ramificada encapsulada que es puesta en contacto con el suero o plasma del paciente. Posteriormente, se pone en contacto con el reactivo de revelado para lo que se agrega un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgE marcado con β-galactosidasa. Para eliminar aquella enzima que no ha sido unida a los anticuerpos, se utiliza 4-metilumbeliferil-β-galactósido como sustrato fluorogénico que da lugar a la 4-metilumbeliferona fluorescente (Fig. 6). Para la realización de la prueba, solamente son necesarios 40 μL de suero. Los límites de detección del método InmunoCap son aproximadamente de 0.10-100 kU<sub>A</sub> / L. Las clases de IgE específicas de ImmunoCAP se definen utilizando seis calibradores: 0, 0.35, 0.7, 3.5, 17.5 y 100 kU<sub>A</sub> / L (Clase 0: de 0 a <0.35 kU<sub>A</sub> / L; Clase 1: de 0.35 a <0.7 kU<sub>A</sub> / L; Clase 2: de 0.70 a <3.5 kU<sub>A</sub> / L; Clase 3: de 3.50 a <17.5 kU<sub>A</sub> / L; Clase 4: de 17.5 a <50 kU<sub>A</sub> / L; Clase 5: de 50 a <100 kU<sub>A</sub> / L y Clase 6: de ≥ 100 kU<sub>A</sub> / L) (Popescu & Vieru, 2018).

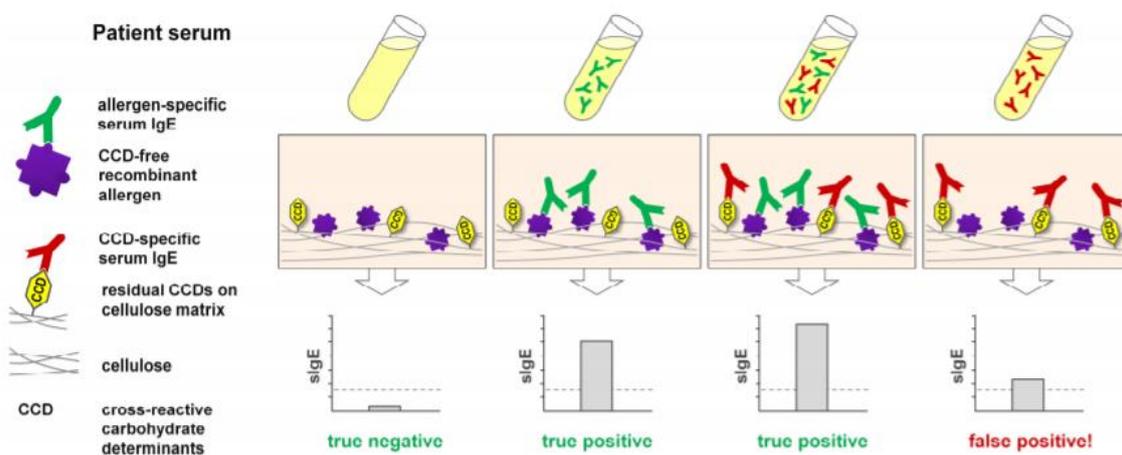


Figura 6: Funcionamiento discriminatorio del InmunoCAP *Phadia 250*<sup>®</sup>. Fuente: (Hemmer et al., 2018)

El InmunoCAP *Phadia* 250® proporciona resultados fiables siempre y cuando se tenga previamente una historia clínica detallada del paciente para así poder determinar cuáles son las proteínas alergénicas de interés a determinar (Matricardi et al., 2019).

#### *1.5.2.2 Métodos multiparamétricos*

Los ensayos multiparamétricos permiten la determinación IgE específica para alérgenos presentes en extractos naturales completos, nativos o recombinantes (entre 2 y 11 alérgenos).

El ensayo Euroline™, EUROIMMUN AG, Lübeck, Alemania, utiliza una tira reactiva en la cual se encuentran fijados tanto los alérgenos individuales moleculares como extractos completos. Cada componente alergénico recombinante o nativo aparece acoplado a las tiras de transferencia como líneas paralelas delgadas en posiciones definidas. Al igual que el método Singleplex anteriormente mencionado, el ensayo Euroline™ se encuentra automatizado. El proceso de diagnóstico comienza con la unión de la IgE presente en el suero del paciente a la fase sólida, la tira. A continuación, se realiza un lavado para la eliminación del sobrenadante no unido a la tira y se procede a la adición del anticuerpo conjugado anti-IgE marcado para la detección de aquel anticuerpo que si ha permanecido unido. Se trata de un anticuerpo monoclonal IgE anti-humano de ratón marcado con fosfatasa alcalina. En la última etapa un sustrato cromogénico permite el revelado de la unión del anticuerpo anti-IgE con el anticuerpo humano de manera que los anticuerpos unidos se tiñen con cloruro de tetrazolio nitroblue / 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (NBT / BCIP) (Popescu & Vieru, 2018). Finalmente, las tiras son retiradas del aparato y colocadas sobre un documento donde vienen reflejados los números de identificación de los pacientes analizados. Este documento es escaneado obteniendo los resultados de cada paciente de forma individual.

#### *1.5.2.3 Métodos multiplex*

Ofrecen una visión mucho más amplia de la sensibilización del paciente y se solicitan cuando para el diagnóstico, es necesario pedir la determinación de 13 o más componentes. Este enfoque es conocido como “bottom up”. El valor de IgE obtenido con es semicuantitativo, lo que supone la principal desventaja de los métodos Multiplex, además, son menos sensibles (Francesca et al., 2019).

Dentro de los métodos Multiplex más conocidos se encuentran:

- El microarray más ampliamente utilizado en clínica en los servicios de alergología es el ISAC® de Thermo Fisher, Suecia, que permite el análisis de 112 moléculas diferentes, tanto recombinantes como nativas, con una pequeña cantidad de suero (30 µL) (Francesca et al., 2019).

- Más recientemente una nueva tecnología ha surgido en el mercado, conocida como Allergy Explorer-ALEX®, Macro-ArrayDX Wien, Austria. La principal diferencia con respecto al convencional microarray ISAC® es la presencia tanto de extractos de alérgenos (157) como de componentes moleculares (125) simultáneamente. Otra gran diferencia radica en la inhibición de la reactividad de los determinantes de carbohidratos de reacción cruzada (CCD) que suponen muchos falsos positivos en alergia (Francesca et al., 2019).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Diseño experimental

El presente trabajo describe un estudio observacional descriptivo, transversal con recogida retrospectiva de información sobre el resultado de las pruebas cutáneas y método Euroline efectuados a pacientes, mayores de 14 años, atendidos en la consulta del Servicio de Alergia del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, durante los meses de Noviembre de 2019 hasta Marzo de 2020. En definitiva, se compararán los resultados obtenidos de la prueba cutánea (PC), estudio convencional en alergia con los resultados de una técnica de nueva generación de diagnóstico molecular (Euroline™).

### 2.2 Participantes

De forma aleatoria se seleccionaron los resultados de las pruebas complementarias realizadas a 46 pacientes los cuales fueron clasificados, según el diagnóstico en la primera visita, en dos grandes grupos.

#### **a.- Controles**

Dentro de este grupo, se seleccionaron aquellos pacientes que no poseían ningún resultado positivo tanto para las PC como para Euroline™. En total, en este estudio, se seleccionaron 2 controle negativos, un varón de 31 años, y una mujer de 26.

#### **b.- Positivos**

El número total de pacientes positivos usados en el estudio es de 44 pacientes, los cuales poseían, al menos, un resultado positivo tanto como para PC, como para Euroline™.

El personal de enfermería es el encargado de realizar la extracción y las PC, que sirven para el diagnóstico cualitativo de la alergia.

Los pacientes seleccionados son aquellos que presentan un cuadro clínico de rinitis alérgica, conjuntivitis, asma leve, asma grave, urticaria y angiodema asociado a alérgenos inhalados, ya sea por cercanía a su lugar de residencia o por aparición ocasional cuando se está en contacto con dichos antígenos.

### 2.3 Medidas

En ambos grupos se analizó la siguiente información:

- Pruebas cutáneas. Estas pruebas también son conocidas como Test de diagnóstico prick y se realizan directamente sobre la piel del paciente. Normalmente, van dirigidas a alérgenos alimentarios, venenos, aeroalérgenos y medicamentos. Las reacciones derivadas de estas pruebas suelen ser muy rápidas, así como muy sensibles en el caso de alérgenos inhalados (Bousquet et al., 2012).

Antes de la realización de las PC, se pregunta al paciente por los fármacos que ha tomado

Treatment	Degree	Duration	Clinical significance
Oral H1-antihistamine	++++	2-7 days	Yes
Intranasal H1-antihistamine			None
H2-antihistamine	0 to +		None
Imipramines	++++	Up to 21 days	Yes
Phenothiazines	+ to ++	Up to 10 days	Yes
Corticosteroids Systemic, short term	0		None
Systemic, long term	Possible		None
Inhaled	0		None
Topical skin	+ to ++	Up to 7 days	Yes

previamente, pues la toma de alguno de ellos, como los antihistamínicos de tipo H1, pueden distorsionar los resultados obtenidos (Fig. 7). Otro aspecto a tener en cuenta es la calidad del alérgeno o extracto del test sobre todo en el caso de ácaros, caspa de animales y mohos. Para ello, se recomienda el uso de alérgenos recombinantes purificados (Bousquet et al., 2012).

**Figura 7:** Fármacos que distorsionan los resultados de las PC. Fuente: (Bousquet et al., 2012)

Para su realización, se introduce en la piel del antebrazo una fina aguja de metal a través de la cual se deja caer una pequeña gota del extracto

alergénico. Se debe usar una única aguja por cada punción o alérgeno. Tras la punción, se deben esperar unos 15-20 minutos para observar los primeros efectos que suelen manifestarse en forma de pequeñas ronchas sobre la piel circundante a donde ha tenido lugar la punción. En las PC se evalúan los siguientes alérgenos respiratorios:

**Tabla 1:** Alérgenos evaluados en las PC.

<b>ALÉRGENOS</b>
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
<i>Dermatophagoides farinae</i>
Gato
Perro
<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Alternaria alternata</i>
<i>Gramíneas salvajes</i>
<i>Olea europaea</i>
<i>Platanus acerifolia</i>
<i>Cupressus sempervirens</i>
<i>Chenopodium</i>
<i>Kali</i>
<i>Parietaria judaica</i>
Látex
LTP

Las pruebas cutáneas intraepidérmicas (prick test) se utilizan para detectar la IgE unida a mastocitos cutáneos. Para ello, es necesario colocar una gota del alérgeno sobre la piel e incidir sobre la misma con una lanceta a 1mm de profundidad aproximadamente. Con esto, se consigue introducir el alérgeno en la epidermis y se pone en contacto con el mastocito. Si el paciente está sensibilizado a este alérgeno, la IgE anclada en los mastocitos es capaz de reconocerlo, de forma que al unirse se degranula, dando lugar a reacción de hipersensibilidad tipo I, generando lo que denominamos pápula o habón en la piel de forma inmediata. Deberá ser de al menos 3 mm de diámetro para considerarse positiva.

Las pruebas intradérmicas son capaces de reflejar hipersensibilidad inmediata y tardía (tipo IV), dependiendo del momento de la lectura. Se inoculan 0,05 ml del alérgeno diluido (según el alérgeno) en la dermis del paciente con una aguja fina (30G o similar). Se considera positiva una pápula de al menos 5 mm de diámetro. Generalmente se utilizan para testar fármacos.

En ambos casos se utiliza un control positivo (generalmente histamina), y otro negativo (generalmente suero salino) para determinar si las pruebas son concluyentes. Esto es necesario porque existen varios factores capaces de influir en el resultado, la toma de fármacos (antihistamínicos o ansiolíticos) o las afecciones cutáneas (dermografismo, urticaria...).

- Euroline™, EUROIMMUN AG. Las muestras de sangre se centrifugan a 1500 rpm durante 5 minutos para separar la sangre del suero (este queda en la parte superior).

Tras la centrifugación, se decanta el sobrenadante (suero) en otro tubo y se etiqueta con el número de muestra del paciente.

Posteriormente, se lleva a cabo el ensayo multiparamétrico Euroline™ para la determinación IgE específica simultánea de 34 alérgenos. En este estudio solo van a ser comparados 17, aquellos que son comunes a las PC anteriormente mencionadas. Como se comentó en la introducción, este ensayo utiliza una tira reactiva en la cual se encuentran fijados los alérgenos como extractos completos. Los alérgenos utilizados en las tiras se describen a continuación:

**Tabla 2:** Alérgenos evaluados en Euroline™.

<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (d1)	<i>Secale cereale</i> (g12)
<i>Dermatophagoides farinae</i> (d2)	<i>Alnus incana</i> (t2)
<i>Acarus siro</i> (d70)	<i>Betula verrucosa</i> (t3)
<i>Lepidoglyphus destructor</i> (d71)	<i>Corylus avellana</i> (t4)
<i>Blomia tropicalis</i> (d201)	<i>Olea europaea</i> (t9)
Gato (e1)	<i>Platanus acerifolia</i> (t11)
Perro (e2)	<i>Cupressus sempervirens</i> (t23)
Caballo (e3)	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> (w1)
<i>Cladosporium herbarum</i> (m2)	<i>Artemisia vulgaris</i> (w6)
<i>Aspergillus fumigatus</i> (m3)	<i>Plantago lanceolata</i> (w9)
<i>Alternaria alternata</i> (m6)	<i>Chenopodium</i> (w10)
<i>Blatela germanica</i> (i6)	<i>Kali</i> (w11)
<i>Bermuda grass</i> (g2)	<i>Parietaria officinalis</i> (w19)
<i>Dactilo</i> (g3)	<i>Parietaria judaica</i> (w21)
<i>Lolium perenne</i> (g5)	Látex (u85)
<i>Phelum pratense</i> (g6)	Marcador CCD (CCD)
<i>Poa pratensis pratense</i> (g8)	

## 2.4 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de las pruebas cutáneas y el sexo de los pacientes se interpretan como variables cualitativas dicotómicas (positivo/negativo, hombre/mujer) mientras que los obtenidos de la realización de Euroline (valores numéricos de la concentración de IgE específica) y la edad se consideran como variables cuantitativas continuas.

Desde un punto de vista descriptivo, las variables cualitativas se estudian según proporciones mientras las variables cuantitativas se estudian según medidas de dispersión.

Para el estudio multivariante de la correlación entre ambas pruebas diagnósticas, se identifican los resultados positivos como 1 y los negativos como 2 (tanto para prueba cutánea como para Euroline con resultado  $>0,35$  kUI/L) convirtiendo ambas variables en cuantitativas discretas por lo que se evalúan a través del coeficiente de correlación de Pearson ( $\rho$ ). El grado de correlación se considera débil si  $\rho < 0,5$ , moderado si  $\rho$  se encuentra entre 0,5 y 0,8 y fuerte si  $\rho > 0,8$ . Los resultados obtenidos para cada alérgeno fueron utilizados para la representación gráfica de los datos mediante gráficos de dispersión en los que se muestra la relación de dependencia entre los dos conjuntos de datos, siendo el eje X los datos obtenidos mediante Euroline y el eje Y los datos de las PC. Como resultado, se obtiene una nube de puntos a partir de la cual se obtiene la ecuación de la recta que aporta información sobre la recta de regresión verdadera. Cuanto mayor sea el valor de la “r” obtenida, mayor es el índice de correlación (Akoglu, 2018).

Para el estudio multivariante de la correlación a través del coeficiente Kappa de Cohen se identifican los resultados de Euroline  $>0,35$  kUI/L como “positivos” y los  $<0,35$  kUI/L como “negativos” convirtiendo esta variable en cualitativa. Los resultados obtenidos, a diferencia con el coeficiente anterior, se representan de la siguiente manera:  $k \leq 0$  sin relación entre los resultados; 0,01–0,20 ninguna o leve; 0,21–0,40 relación moderada, 0,41-0,60 relación buena; 0,61-0,80 relación muy buena y 0,81-1,00 concordancia casi perfecta (Bojcukova, Vlas, Forstenlechner, & Panzner, 2019)(Francesca et al., 2019).

Todos los cálculos se realizan con un intervalo de confianza del 95% y se consideran significativos con un valor de  $p < 0,05$

## RESULTADOS

### 3.1 Datos demográficos de la población de estudio

De los 46 pacientes incluidos en el estudio, la mayor proporción se corresponde con el grupo de mujeres el cual supone un 65,90% (30 pacientes) del total respecto al 34,10% (16 pacientes) de hombres (Fig. 8). Esta proporción es similar a la encontrada en otros estudios y parece ser debida a un componente hormonal que incrementa la prevalencia de alergia en mujeres sobre hombres a partir de los 14 años (Ghazeeri et al., 2011).

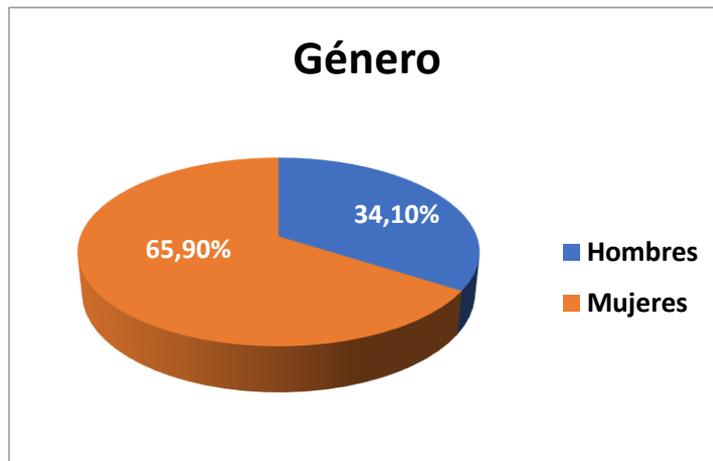


Figura 8: Proporción por sexo de los pacientes estudiados.

La edad media global de la población de estudio fue de  $38,02 \pm 14$  años con valores máximos y mínimos entre 71 y 17 años. Según el sexo, la edad media de los hombres fue ligeramente superior a la de las mujeres (39,67 vs 37,17). El 50% de los pacientes se hayan comprendidos entre los 26,25 y 46 años (rango intercuartílico: 19,75) (Fig.9)

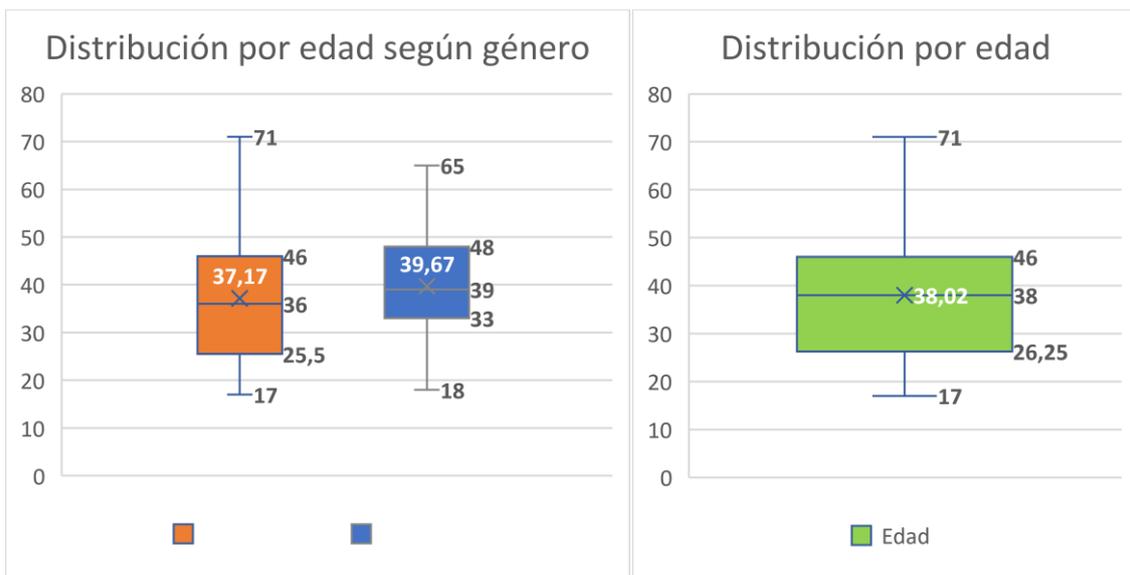


Figura 9: Distribución por sexo y general de la edad de los pacientes analizados respectivamente.

### 3.2 Análisis descriptivo de los resultados de las pruebas complementarias

Para los controles negativos el 100% de los alérgenos en prueba cutánea y en Euroline fueron negativos lo que implica una concordancia de 100% entre ambas pruebas.

#### 3.2.1 Prueba cutánea

El alérgeno reconocido con más frecuencia por los pacientes sometidos a PC fue *Dermatophagoides farinae* (58,69%), seguido de *Dermatophagoides pteronyssinus* (54,34%) y *Olea europaea* (47,86%) mientras que los que presentaron menos resultados positivos fueron los hongos aerógenos *Alternaria alternata* (13,04%) y *Aspergillus fumigatus* (4,34%) (Tabla 3).

**Tabla 3:** Porcentaje positividad alérgenos en PC ordenados de mayor a menor.

% positividad PC	
Dermatophagoides farinae (d2)	58,695
Dermatophagoides pteronyssinus (d1)	54,347
Olea europaea (t9)	47,826
Platanus acerifolia (t11)	39,13
Perro (e2)	36,956
Poa pratensis pratense (g8)	34,782
Gato (e1)	32,608
Dactilo (g3)	30,434
Lolium perenne(g5)	30,434
Phelum pratense (g6)	30,434
Bermuda grass (g2)	26,086
Chenopodium (w10)	19,565
Kali (w11)	19,565
Parietaria judaica (w21)	19,565
Cupressus sempervirens (t23)	17,391
Alternaria alternata (m6)	13,043
Aspergillus fumigatus (m3)	4,347

### 3.2.2 Euroline

Los alérgenos que han mostrado un mayor nivel de positividad en esta prueba diagnóstica han sido el polen de olivo y Lolium (63,6%) seguidos por los ácaros del polvo (*Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides Farinae*) y el polen de *Poa pratense* (61,36%). En contraposición, los alérgenos con menor nivel de detección (también presentes en prueba cutánea) son los hongos aerógenos *Alternaria alternada* (25%) y *Aspergillus fumigatus* (22,73%) y el polen de *Salsola Kali* (20,45%). De los alérgenos no presentes en prueba cutánea los valores más bajos de detección se corresponden con *Blomia tropicalis* (18,18%), polen de *Ambrosía* (15,91%) y látex (15,91%). En la tabla 4 se muestran los resultados de positividad de todos los alérgenos incluidos en Euroline y entre paréntesis el nivel medio de IgE específica para cada alérgeno y su desviación estándar.

Según los niveles promedio de IgE específica para cada alérgeno (Tabla 5), medido por Euroline, aquéllos que presentan mayores niveles de detección son el polen de *Poa pratensis* (31,33 kUI/L), *Dermatophagoides farinae* (29,53 kUI/L) y los pólenes de Lolium y Phleum pratense (29,17 kUI/L) mientras que los alérgenos con menores niveles medios de IgE específica son los pólenes de *Salsola Kali* (0,49 kUI/L), *Cupressus sempervivens* (0,47 kUI/L) y *Alnus icana* (0,39 kUI/L). En verde oscuro quedan marcados aquellos alérgenos que son comunes a Euroline y PC, mientras que en verde más claro se encuentran reflejados los alérgenos específicos de Euroline.

**Tabla 4:** Porcentaje positividad Euroline y nivel de IgE específica ordenados de mayor a menor junto con la desviación estándar.

<b>Pacientes activos</b>	<b>(n = 44)</b>		
<b>Género (M/H)</b>	<b>29/15</b>		
<b>Edad ± Desv. Est.</b>	<b>38,02 ± 14</b>		
<i>Olea europaea</i>	<b>63,64%</b> (19,69 ± 22,94)	<i>Lolium perenne</i>	<b>63,64%</b> (29,17 ± 28,98)
<i>Dermatophagoides farinae</i>	<b>61,36%</b> (29,53 ± 31,09)	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	<b>61,36%</b> (25,16 ± 24,31)
<i>Poa pratensis pratense</i>	<b>61,36%</b> (31,33 ± 28,67)	<i>Phelum pratense</i>	<b>54,55%</b> (29,16 ± 29,09)
<i>Dactilo</i>	<b>52,27%</b> (17,17 ± 16,64)	<i>Secale cereale</i>	<b>50,00%</b> (25,81 ± 22,53)
Gato	<b>45,45%</b> (16,08 ± 17,57)	<i>Bermuda grass</i>	<b>43,18%</b> (7,55 ± 8,20)
<i>Chenopodium</i>	<b>40,91%</b> (0,78 ± 0,61)	<i>Parietaria officinalis</i>	<b>38,64%</b> (19,78 ± 16,84)
Perro	<b>38,64%</b> (9,90 ± 10,40)	<i>Blatela germanica</i>	<b>27,27%</b> (4,17 ± 6,19)
<i>Platanus acerifolia</i>	<b>25,00%</b> (4,17 ± 3,69)	<i>Artemisia vulgaris</i>	<b>25,00%</b> (4,98 ± 4,00)
<i>Parietaria judaica</i>	<b>25,00%</b> (23,23 ± 18,08)	<i>Caballo</i>	<b>25,00%</b> (14,45 ± 10,47)
<i>Alternaria alternata</i>	<b>25,00%</b> (4,05 ± 3,49)	<i>Plantago lanceolata</i>	<b>22,73%</b> (0,91 ± 0,71)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<b>22,73%</b> (0,57 ± 0,27)	<i>Salsola kali</i>	<b>20,45%</b> (0,49 ± 0,20)
<i>Lepidoglyphus destructor</i>	<b>18,18%</b> (8,05 ± 6,74)	<i>Blomia tropicalis</i>	<b>18,18%</b> (11,80 ± 11,63)
Látex	<b>15,91%</b> (7,40 ± 5,30)	<i>Betula verrucosa</i>	<b>13,64%</b> (2,84 ± 1,87)
Marcador CCD	<b>13,64%</b> (7,31 ± 5,21)	<i>Alnus incana</i>	<b>11,36%</b> (0,39 ± 0,12)
<i>Cladosporium herbarum</i>	<b>11,36%</b> (0,52 ± 0,14)	<i>Corylus avellana</i>	<b>9,09%</b> (1,46 ± 0,42)
<i>Cupressus sempervirens</i>	<b>6,82%</b> (0,47 ± 0,13)		

### 3.3 Estudio de correlación de los resultados de la prueba cutánea con Euroline

De forma global, la comparación entre promedios de positividad obtenidos para ambas pruebas nos muestra un nivel moderado de correlación:  $\rho = 0,70$  ( $p = 0,0025$ ; (IC:95%))

Tras la conversión de la variable cualitativa “resultado de prueba cutánea” en cuantitativa (según se explica en el apartado del metodología) tal y como queda reflejado en la tabla 6, en la mayoría de los alérgenos comparados como *Dermatophagoides pteronyssinus* (0,83), *Dermatophagoides farinae* (0,75), gato (0,81), perro (0,77), gramíneas salvajes (*Cynodon*, *Dactylis*, *Phleum* y *Poa*; 0,85;0,85;0,83;0,79 respectivamente), así como para *Olea europaea* (0,86), *Platanus acerifolia* (0,85) y *Cupressus sempervirens* (0,77) el índice de correlación de Pearson es superior a 0,75 y marca una tendencia entre moderada y fuerte.

**Tabla 5:** Niveles promedio de IgE específica para cada alérgeno medidos por Euroline.

Nivel de IgE específica (promedio)	
Poa pratensis pratense (g8)	31,33
Dermatophagoides farinae (d2)	29,53
Lolium perenne(g5)	29,17
Phelum pratense (g6)	29,17
Secale cereale (g12)	25,81
Dermatophagoides pteronyssinus (d1)	25,16
Parietaria judaica (w21)	23,23
Parietaria officinalis (w19)	19,78
Olea europaea (t9)	19,69
Dactilo (g3)	17,17
Gato (e1)	16,08
Caballo (e3)	14,45
Blomia tropicalis (d201)	11,80
Perro (e2)	9,90
Lepidoglyphus destructor (d71)	8,05
Bermuda grass (g2)	7,55
Látex (u85)	7,40
Marcador CCD (CCD)	7,31
Artemisia vulgaris (w6)	4,98
Platanus acerifolia (t11)	4,17
Blatela germanica (i6)	4,17
Alternaria alternata (m6)	4,05
Acarus siro (d70)	2,87
Betula verrucosa (t3)	2,84
Corylus avellana (t4)	1,46
Plantago lanceolata (w9)	0,91
Chenopodium (w10)	0,78
Ambrosia artemisiifolia (w1)	0,69
Aspergillus fumigatus (m3)	0,57
Cladosporium herbarum (m2)	0,52
Kali (w11)	0,49
Cupressus sempervirens (t23)	0,47
Alnus incana (t2)	0,39

Algo menor es el valor de la correlación entre los alérgenos *Chenopodium*, *Salsola kali* y *Parietaria judaica* pero siempre con valores mayores a 0,65 (Tabla 6).

**Tabla 6:** Índice de correlación de Pearson entre alérgenos.

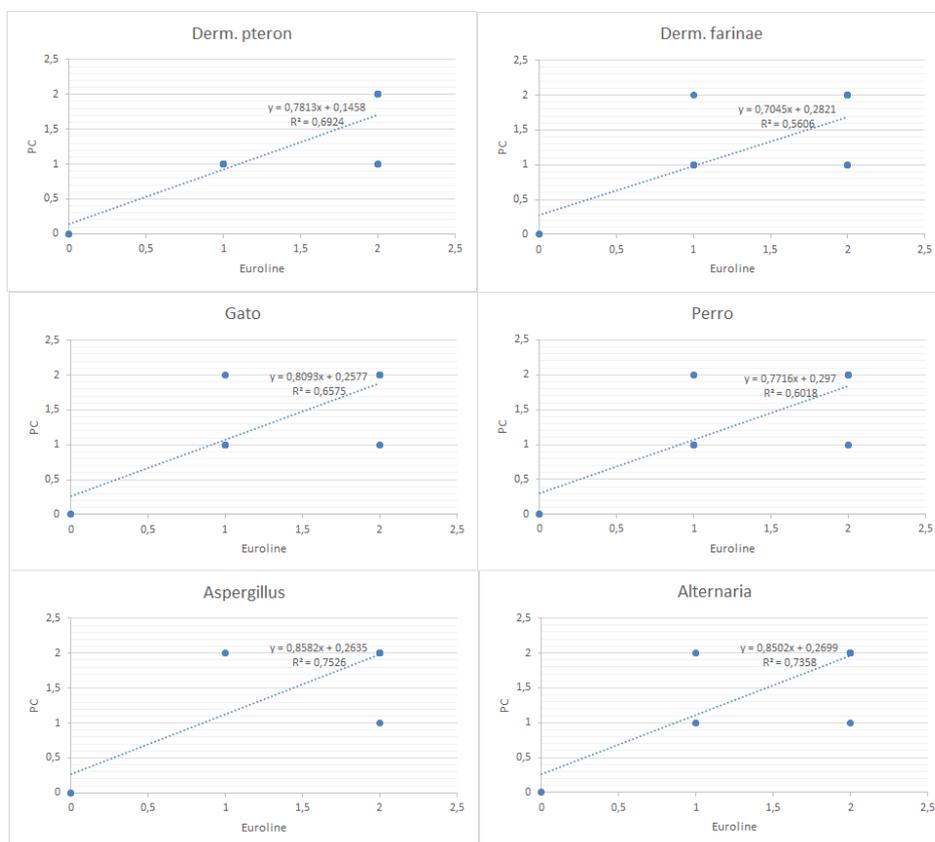
Alérgenos	Coef. De Pearson
<b><i>Derm. pteron</i></b>	0,8321015
<b><i>Derm. farinae</i></b>	0,74870284
<b>Gato</b>	0,81084723
<b>Perro</b>	0,77573985
<b><i>Aspergillus</i></b>	0,86752029
<b><i>Alternaria</i></b>	0,85775993
<b><i>Cynodon</i></b>	0,84778421
<b><i>Dactilys</i></b>	0,84909769
<b><i>Lolium</i></b>	0,79406835
<b><i>Phleum</i></b>	0,82850237
<b><i>Poa</i></b>	0,79289696
<b><i>Olea europaea</i></b>	0,85616438
<b><i>Platanus acerifolia</i></b>	0,85404874

<b><i>Cupressus sempervirens</i></b>	0,76545117
<b><i>Chenopodium</i></b>	0,66007164
<b><i>Salsola kali</i></b>	0,66716967
<b><i>Parietaria judaica</i></b>	0,72497918

Para el mismo número de alérgenos seleccionados, se ha llevado a cabo la realización de gráficos de dispersión para de nuevo, verificar que existe una correlación entre los resultados de las pruebas cutáneas en alergia y un nuevo método de diagnóstico (Fig. 10). A mayor coeficiente de determinación (R2), obtenido a partir de la ecuación de la recta de los gráficos, mayor es el nivel de correlación según puede comprobarse en las tablas anteriores.

Por ejemplo, para *Dermatophagoides pteronyssinus* también conocido como ácaro del polvo, el índice de correlación de Pearson tiene un valor de 0,8321015 mientras que, el valor del coeficiente de determinación es de 0,6924. Por otro lado, para *Dermatophagoides farinae* su valor de coeficiente de correlación es 0,74870284 y su R2 es de 0,5606.

Dentro del conjunto de resultados obtenido por este método, los alérgenos que presentan niveles menores de correlación vuelven a ser *Chenopodium*, *Salsola kali* y *Parietaria judaica*, cuyos valores de correlación son 0,66007164, 0,66716967 y 0,72497918 respectivamente, mientras que sus valores de R2 son 0,4357, 0,4721 y 0,5256.



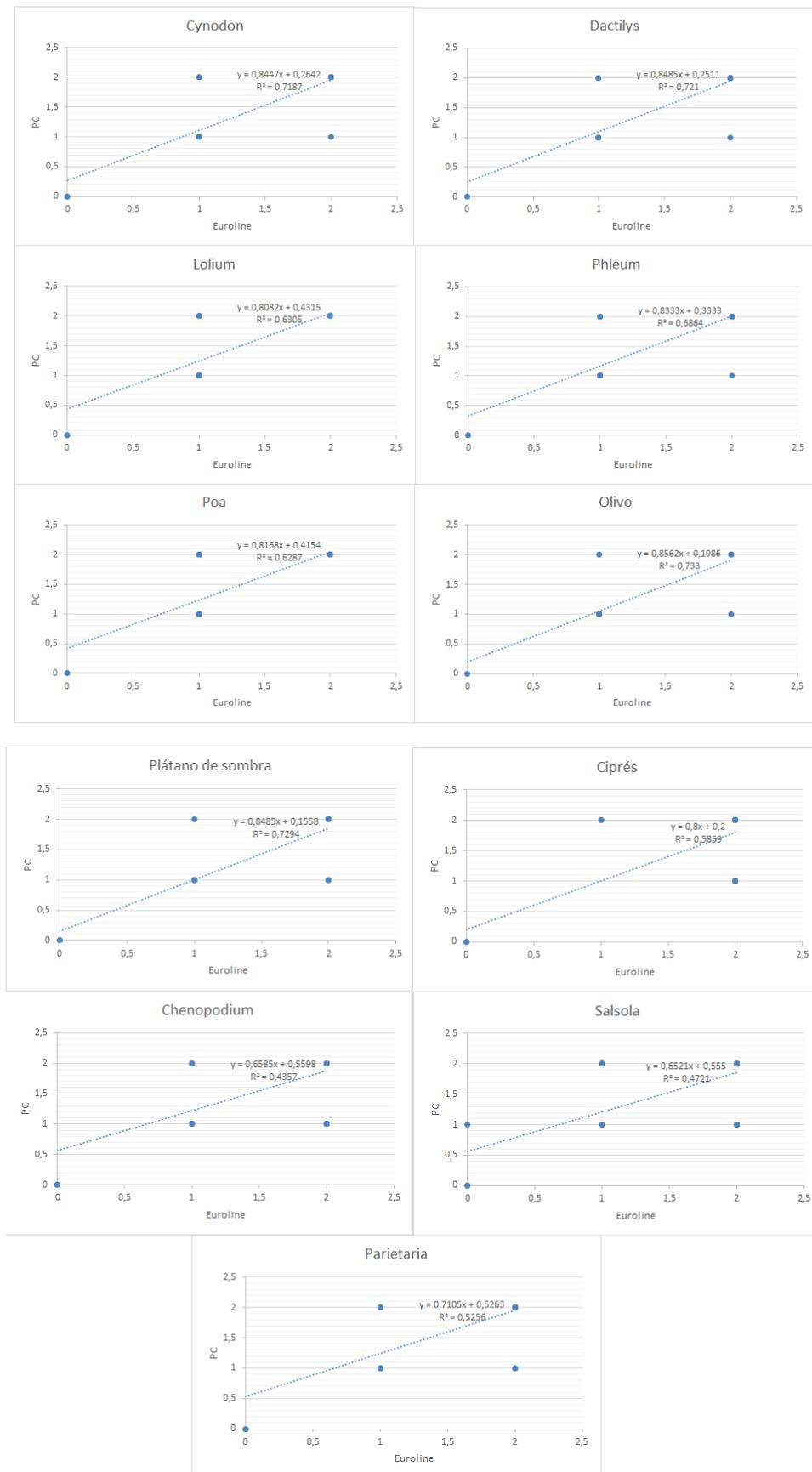


Figura 10: Gráficas obtenidas a partir de los resultados del índice de correlación de Pearson. Fuente: elaboración propia.

En el último de los análisis, el coeficiente Kappa de Cohen, se convierte la variable cuantitativa “resultado de Euroline” en cualitativa confirmando como “positivo” todo resultado con nivel de IgE específica >0,35 kUI/L y como “negativo” todo resultado que no cumpla el requisito anterior. El cálculo de este nuevo estadístico confirma de nuevo, una relación lineal entre los resultados obtenidos con el mismo y el resto de coeficientes anteriores (Tabla 7).

Con este nuevo enfoque, se observa, al igual que con los anteriores, una menor concordancia para los alérgenos *Chenopodium*, *Salsola kali* y en este caso ciprés, cuyo valor de k es inferior a 0,6. Sin embargo, se observa una muy buena correlación para el resto de alérgenos, como en el caso del olivo, plátano de sombra y gramíneas salvajes, ente las cuales se encuentran *Cynodon* y *Dactilys* cuyos valores de k son superiores a 0,7.

**Tabla 7:** Comparativa entre los distintos índices de correlación y determinación.

<b>Alérgenos</b>	<b>Coef. De Pearson</b>	<b>Coef. Determinación (R2)</b>	<b>Coef. Kappa de Cohen</b>	<b>CI 95%</b>
<b>Derm. pteron</b>	0,8321015	0,6924	0,75459	0,58149 - 0,92769
<b>Derm. farinae</b>	0,74870284	0,5606	0,67358	0,46838 - 0,87877
<b>Gato</b>	0,81084723	0,6575	0,74957	0,56342 - 0,93573
<b>Perro</b>	0,77573985	0,6018	0,69808	0,50072 - 0,89545
<b>Aspergillus</b>	0,86752029	0,7526	0,76351	0,54077 - 0,98626
<b>Alternaria</b>	0,85775993	0,7358	0,78261	0,58443 - 0,98079
<b>Cynodon</b>	0,84778421	0,7187	0,80114	0,62588 - 0,97639
<b>Dactilys</b>	0,84909769	0,721	0,80769	0,63926 - 0,97613
<b>Lolium</b>	0,79406835	0,6305	0,72420	0,53326 - 0,91515
<b>Phleum</b>	0,82850237	0,6864	0,77419	0,59671 - 0,95168
<b>Poa</b>	0,79289696	0,6287	0,72420	0,53367 - 0,91474
<b>Olivo</b>	0,85616438	0,733	0,83594	0,67780 - 0,99408
<b>Plátano sombra</b>	0,85404874	0,7294	0,81183	0,64891 - 0,97474
<b>Ciprés</b>	0,76545117	0,5859	0,59144	0,32514 - 0,85774
<b>Chenopodium</b>	0,66007164	0,4357	0,50254	0,23213 - 0,77295
<b>Salsola</b>	0,66716967	0,4721	0,53160	0,26480 - 0,79840
<b>Parietaria</b>	0,72497918	0,5256	0,62500	0,37641 - 0,87359

## DISCUSIÓN

En los últimos 10 años los métodos complementarios de diagnóstico en alergia han evolucionado de una manera exponencial pasando de la determinación aislada de IgE específica a determinados alérgenos a la existencia de métodos multiplexados que permiten la realización de cientos de determinaciones en un solo ensayo y con volúmenes mínimos, en rango de microlitros, de muestras serológicas.

De manera tradicional, la forma de proceder en alergia se ha basado en la realización de pruebas cutáneas acordes con lo que el paciente relataba en la anamnesis. Gracias a la combinación de la información obtenida en ambos procesos y a la determinación de IgE específica a las fuentes alérgicas se realizaba un diagnóstico sobre el que basar una actitud terapéutica.

No obstante, las pruebas cutáneas, al estar realizadas por personal, no están libres de errores humanos que pueden llevar a una confusión diagnóstica y al establecimiento de una terapia no del todo correcta. Además, la toma de determinados medicamentos, como por ejemplo los antihistamínicos, pueden alterar el resultado de estas pruebas y, además, su realización no está libre de cierto riesgo para el paciente al cual se le están administrando “in vivo” extractos a los que es alérgico. Por este motivo, en los últimos años se ha planteado la posibilidad de modificar este esquema de trabajo tradicional de la Alergia sustituyendo la prueba cutánea por alguno de los nuevos métodos de diagnóstico mencionados previamente. Esta tendencia se ha visto favorecida y potenciada debido a que estos métodos de diagnóstico son cada vez más asequibles económicamente.

Las principales ventajas de los MD son la rapidez, automatización, ausencia de interferencia con medicamentos y el bajo riesgo que suponen para el paciente, pues solo es necesaria una muestra de sangre para llevarse a cabo. Algunos estudios revelan discrepancia en los resultados de los MDM con respecto a las PC, probablemente debida a la calidad de los extractos o a los reactivos utilizados en el laboratorio (Wongpiyabovorn, Suratannon, Boonmee, & Chatchatee, 2018). Dentro de los MD, la tecnología Euroline™ presenta las ventajas de ser un sistema totalmente automatizado y de necesitar una pequeña cantidad de suero para detectar múltiples alérgenos, sin embargo, también presenta ciertas desventajas como que la detección sérica de IgE específica no siempre va asociada a la manifestación clínica de la misma pudiendo generar la aparición de “falsos positivos” (Wongpiyabovorn et al., 2018).

En la actualidad (y probablemente de cara a futuro), en el contexto de la pandemia por COVID-19, otra ventaja de estos métodos de diagnóstico es la de limitar el tiempo que el paciente está en el centro sanitario y en contacto con otras personas (personal sanitario y/o pacientes) ya que sólo debería permanecer en el centro sanitario el tiempo justo para realizar una extracción de sangre.

El presente trabajo tiene como objetivo principal estudiar las similitudes entre los resultados de las PC y el método Euroline™ con el fin de establecer este último como herramienta de diagnóstico en el servicio de Alergia del Hospital Universitario La Fe de Valencia y, en función de los resultados, plantear el remplazamiento las pruebas cutáneas por este nuevo método.

Los resultados muestran, de forma global, una correlación moderada-fuerte entre ambos tipos de pruebas y este nivel de resultado se mantiene para la práctica totalidad de alérgenos cuando estos se comparan directamente entre ellos tanto desde un punto de vista cuantitativo ( $\rho$  de Pearson) como cualitativo ( $K$  de Cohen).

Otro aspecto que refuerza el elevado grado de coincidencia entre métodos es que los tres alérgenos con mayor frecuencia de reconocimiento en prueba cutánea también lo son con el sistema Euroline (polen de olivo y ácaros del polvo). Además, los alérgenos que presentan un mayor nivel de IgE específica en Euroline coinciden con los alérgenos más frecuentes de ambas pruebas.

Otro hallazgo para destacar es que, en general, el porcentaje de positividad para cada alérgeno en Euroline suele ser superior al obtenido en la prueba cutánea lo cual podría ser indicativo de una mayor sensibilidad diagnóstica. No obstante, este hecho también podría deberse a la aparición de “falsos positivos” por lo que es necesario continuar estudiando este aspecto relacionando los resultados con los síntomas de los pacientes.

La relevancia de este trabajo radica en que, por primera vez, se compara un panel de aeroalérgenos con ácaros del polvo, epitelios de animales, hongos aerógenos y pólenes con los resultados de la prueba cutánea para esos mismos alérgenos. Existen otros estudios como el Wongpiyabovorn et al., que, en consonancia con nuestros resultados, en 2018, demostraron muy buenas evidencias al comparar Euroline, InmunoCAP y PC, sobre todo para alérgenos como los ácaros del polvo (Der p y Der f). No obstante, también mostró discordancia para algunos otros alérgenos, como en el caso de la caspa de gato. Otro estudio dedicado a analizar la concordancia de resultados en estas mismas pruebas con pólenes típicos del área mediterránea mostró incluso, que la capacidad de unión a los antígenos es mucho mayor en métodos multiparamétricos como Euroline, que en un solo punto de otras plataformas

multiplex de microarrays. De esta manera Euroline podría ser establecido como método de diagnóstico personalizado como alternativa a los métodos singleplex o multiplex (Di Fraia et al., 2019).

La mayor limitación del estudio es el número muestral, el cual debería ser más elevado para así poder establecer una evidencia más consolidada, sobre todo para algunos alérgenos, puesto que en este trabajo solo se analizan 44 muestras positivas y 2 controles negativos. Otros estudios similares barajaban entre 101 muestras de niños y 98 de adultos (Di Fraia et al., 2019), 101 muestras de adultos (Alimuddin, Rengganis, Rumende, & Setiati, 2018) o 202 muestras de adultos (Wongpiyabovorn et al., 2018)

## CONCLUSIONES

Hasta hace pocos años, la relevancia clínica de los resultados de las PC, provocaciones y MD no eran equiparables entre sí, sino que estos últimos se usaban para apoyar y/o confirmar el diagnóstico y así poder establecer una inmunoterapia más efectiva. Sin embargo, gracias al mejor conocimiento y práctica que se tiene sobre los MD, es posible que en el futuro lleguen a sustituir a las obsoletas y, en ocasiones arriesgadas pruebas cutáneas, ya que pueden desencadenar reacciones graves como la anafilaxia en los pacientes expuestos.

En el caso de los pacientes a los que se evalúa terminar con la inmunoterapia, no se usa en ningún caso las PC para determinar la decisión. Para ello, actualmente se recurre a la medición de IgE sérica específica, test de activación de basófilos (TAB) o a métodos multiparamétricos semicuantitativos como el Euroline (Bousquet et al., 2012).

Como ha quedado demostrado en los resultados, la tecnología Euroline™, EUROIMMUN AG es perfectamente capaz de dar resultados fiables y concordantes con las PC sin necesidad de exponer al paciente a una reacción anafiláctica. Además de ser más segura, esta prueba permite analizar una gama más amplia de alérgenos relacionados, siendo su capacidad de hasta 34 aeroalérgenos con tan solo 500 µL de suero. Los extractos alérgicos para diagnóstico a partir de los cuales se realizan las PC, solo constan de 15 aeroalérgenos, y aunque su tiempo de realización es menor en comparación con Euroline™, una vez que se llevan a cabo, es necesario observar al paciente durante un tiempo para evitar reacciones adversas. Por lo que, además de suponer un riesgo, suponen una mayor inversión en tiempo tanto para el médico y enfermeras, como para el paciente. Por otro lado, como ya se ha comentado, Euroline™ permite el análisis de otros alérgenos, es decir, aeroalérgenos, venenos

etc. Aunque los métodos multiplex como ISAC® de Thermo Fisher, son capaces de analizar la respuesta de 112 alérgenos a la vez en un simple chip, pueden dar lugar a confusión a la hora de interpretar los resultados pues no solo se analizan aeroalérgenos, sino que también se analizan alérgenos alimentarios, venenos y parásitos. Por ejemplo, al realizar un microarray a un paciente con alergia a gramíneas, sería posible encontrar IgE positiva para otros alérgenos como polen de árboles o incluso algunos alimentos vegetales. En esta situación, el médico debería tomar la decisión de vacunar al paciente o solamente prohibirle el consumo de ciertos alimentos.

Por lo tanto, en el caso de establecer a los métodos multiparamétricos o multiplex como única herramienta de diagnóstico, sería necesario esclarecer cuáles serán las situaciones en las que se deberían utilizar unos u otros en función de la clínica y sintomatología de los pacientes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akoglu, H. (2018, September 1). User's guide to correlation coefficients. *Turkish Journal of Emergency Medicine*. Emergency Medicine Association of Turkey. <https://doi.org/10.1016/j.tjem.2018.08.001>
- Alimuddin, S., Rengganis, I., Rumende, C. M., & Setiati, S. (2018). Comparison of Specific Immunoglobulin E with the Skin Prick Test in the Diagnosis of House Dust Mites and Cockroach Sensitization in Patients with Asthma and/or Allergic Rhinitis. *Acta Medica Indonesiana*, *50*(2), 125–131. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29950531/>
- Bojcukova, J., Vlas, T., Forstenlechner, P., & Panzner, P. (2019). Comparison of two multiplex arrays in the diagnostics of allergy. *Clinical and Translational Allergy*, *9*(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13601-019-0270-y>
- Bousquet, J., Heinzerling, L., Bachert, C., Papadopoulos, N. G., Bousquet, P. J., Burney, P. G., ... Demoly, P. (2012). Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *67*(1), 18–24. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02728.x>
- Di Fraia, M., Arasi, S., Castelli, S., Dramburg, S., Potapova, E., Villalta, D., ... Matricardi, P. M. (2019). A new molecular multiplex IgE assay for the diagnosis of pollen allergy in Mediterranean countries: A validation study. *Clinical and Experimental Allergy*, *49*(3), 341–349. <https://doi.org/10.1111/cea.13264>
- Francesca, B., Mirella, D. R., Enrico, S., Paola, M., Mariaelisabetta, C., Ignazio, B., & Danilo, V. (2019). Evaluation of a new multiplex assay for allergy diagnosis. *Clinica Chimica Acta*, *493*, 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.02.025>
- Gell, P. G. H., & Coombs, R. R. A. (1963). *CLINICAL ASPECTS OF IMMUNOLOGY* (Second edi). OXFORD: BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS. Retrieved from [https://www.seaic.org/wp-content/uploads/2019/07/gell\\_coombs\\_clinical\\_immunology\\_1968\\_seaic.pdf](https://www.seaic.org/wp-content/uploads/2019/07/gell_coombs_clinical_immunology_1968_seaic.pdf)

- Ghazeeri, G., Abdullah, L., & Abbas, O. (2011). Immunological differences in women compared with men: overview and contributing factors. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y. : 1989)*. *Am J Reprod Immunol*.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01052.x>
- Gould, H. J., & Sutton, B. J. (2008, March). IgE in allergy and asthma today. *Nature Reviews Immunology*. *Nat Rev Immunol*. <https://doi.org/10.1038/nri2273>
- Hemmer, W., Altmann, F., Holzweber, F., Gruber, C., Wantke, F., & Wöhrl, S. (2018). ImmunoCAP cellulose displays cross-reactive carbohydrate determinant (CCD) epitopes and can cause false-positive test results in patients with high anti-CCD IgE antibody levels. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *141*(1), 372-381.e3.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.04.028>
- Matricardi, P. M., Dramburg, S., Potapova, E., Skevaki, C., & Renz, H. (2019, March 1). Molecular diagnosis for allergen immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.12.1021>
- Popescu, F.-D., & Vieru, M. (2018). Precision medicine allergy immunoassay methods for assessing immunoglobulin E sensitization to aeroallergen molecules. *World Journal of Methodology*, *8*(3), 17–36. <https://doi.org/10.5662/wjm.v8.i3.17>
- Pruebas de exposición, provocación, tolerancia | SEICAP - Pacientes. (n.d.). Retrieved August 27, 2020, from [http://pacientes.seicap.es/es/pruebas-de-exposición-provocación-tolerancia\\_40200#que-son-las-pruebas-de-exposicion](http://pacientes.seicap.es/es/pruebas-de-exposición-provocación-tolerancia_40200#que-son-las-pruebas-de-exposicion)
- Ryan, D., Yusuf, O., Stubbe Ostergaard, M., & Román-Rodríguez, M. (2013). *WAO White Book on Allergy 2013 Update WAO White Book on Allergy WAO White Book on Allergy*. (R. Pawankar, G. Walter Canonica, S. T. Holgate, R. F. Lockey, & M. S. Blaiss, Eds.). Milwaukee, Wisconsin : World Allergy Organization. Retrieved from <https://www.worldallergy.org/UserFiles/file/WhiteBook2-2013-v8.pdf>
- Sastre Domínguez, J. (2017). *Alergológica 2015* . (FAES FARMA, Ed.). Retrieved from <https://www.seaic.org/inicio/noticias-general/alergologica-2015.html>
- Valenta, R., Karaulov, A., Niederberger, V., Gattinger, P., van Hage, M., Flicker, S., ... Pickl, W. F. (2018). Molecular Aspects of Allergens and Allergy. In *Advances in Immunology* (Vol. 138, pp. 195–256). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2018.03.002>
- Wongpiyabovorn, J., Suratannon, N., Boonmee, S., & Chatchatee, P. (2018). Comparison of specific IgE detection by immunoblotting anfluorescence enzyme assay with in vivo skin prick test. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, *36*(3), 159–165.  
<https://doi.org/10.12932/AP-270217-0035>
- Zubeldia, J. M., Baeza, M. . L., Jáuregui, I., & Senent, C. J. (2012). *Libro de las enfermedades alérgicas de la Fundación BBVA. Libro de las enfermedades alérgicas de la fundación BBVA*.

