

ESTANDARIZACIÓN DE IgE ESPECÍFICA
DOCUMENTO CONSENSO DEL COMITÉ DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA DE LA
SEAIC

Marcos López Hoyos

Los inmunoensayos para cuantificar los niveles de IgE específica frente a diversos alérgenos se desarrollan a gran velocidad. La utilidad de medir los niveles de IgE ha quedado sobradamente demostrada en las últimas tres décadas de uso clínico. A pesar de ello, quedan muchos aspectos técnicos aún por definir y establecer. Entre ellos destacan la variabilidad inter-laboratorio y entre los distintos ensayos comerciales que han proliferado en los últimos años.

1. INTRODUCCIÓN

El diagnóstico correcto de las enfermedades alérgicas requiere la combinación de una historia clínica completa con el examen físico y el uso de ensayos *in vitro* e *in vivo* para la detección de IgE frente a especificidades alérgicas en los tejidos o suero. Los laboratorios de diagnóstico de alergia han empleado durante más de 30 años ensayos comerciales para medir tanto IgE total como IgE específica. El primer ensayo para cuantificar los niveles de IgE específica apareció en 1967 y, desde entonces, ha experimentado una serie de mejoras para aumentar la sensibilidad analítica y la reproducibilidad. El avance técnico más importante ha sido la automatización y estandarización inter-laboratorio gracias al empleo de métodos de calibración referidos a un estándar internacional de referencia para la IgE total, responsable en gran medida

de la universalización de la cuantificación de IgE específica en el diagnóstico de alergia. Los distintos métodos de calibración empleados por los distintos ensayos desarrollados han sido sustituidos por una unidad común de medir la IgE: KIUA/L. Por otro lado, el número de alérgenos incluidos en la cartera de los métodos comerciales disponibles aumenta continuamente y muchas veces son redundantes, lo cual genera conflictos en los códigos empleados para identificar los alérgenos. Por ello, las empresas han hecho el esfuerzo necesario para unificar los códigos de los alérgenos de los distintos ensayos.

2. ENSAYOS *IN VITRO*

Las pruebas *in vivo*, así como las reacciones cutáneas, son fundamentales para confirmar el diagnóstico de enfermedad alérgica sugerido por la historia clínica. Sin embargo, son muy variables por el uso de distintas técnicas y métodos de cuantificación e interpretación, junto con la variabilidad asociada a la calidad y estabilidad del alérgeno empleado. Además, no debe olvidarse que las pruebas *in vivo* nunca están exentas de riesgo de reacciones adversas y, sobre todo en los niños, pueden no tolerarse. Esta es la principal razón por la que los ensayos serológicos empleados para cuantificar IgE específica frente a alérgenos se han convertido en una herramienta esencial en los algoritmos diagnósticos equivalente a las pruebas *in vivo*, pero sin riesgo para el paciente.

Los niveles elevados de IgE total se utilizaron al principio para identificar a los sujetos atópicos, aunque es claro que los niveles séricos de IgE total carecen de especificidad diagnóstica. Sujetos sin alergias pueden tener niveles de IgE total en los percentiles altos ajustados a la norma de sujetos no atópicos según las pruebas cutáneas. Más aún, los sujetos alérgicos pueden tener unos niveles de IgE total bajos en los percentiles

propios de sujetos no atópicos. Por ello, durante un tiempo la IgE total no se cuantificó rutinariamente en el diagnóstico de un paciente alérgico, excepto en los casos de aspergilosis broncopulmonar alérgica o en asma alérgico extrínseco, cuando la IgE total sérica parecía correlacionarse con la severidad de la enfermedad. Como consecuencia de la baja especificidad de la IgE total, la medida de IgE específica se convirtió en el primer análisis *in vitro* empleado como método confirmatorio diagnóstico alternativo a las pruebas *in vivo* para identificar el estado de sensibilización y para identificar la especificidad alérgica o las especificidades a las que el paciente se ha sensibilizado.

2.1. IgE TOTAL SÉRICA

La concentración de IgE sérica depende de la edad, siendo muy baja en cordón umbilical (< 2 UI/ml) porque no cruza la barrera placentaria. En los niños, los niveles de IgE sérica aumentan progresivamente hasta los 10-15 años. Este incremento es más lento en los adultos que el de la IgG, pero similar al de la IgA. Los niños atópicos tienen un aumento más precoz y rápido en los niveles de IgE en la infancia precoz en comparación con los niños no atópicos. Los niveles decaen entre la segunda y octava década de vida. Los niveles de IgE sérica de un paciente deben compararse siempre con los intervalos de referencia de una población estratificada por edad, sana y no atópica. Los niveles de IgE que están significativamente aumentados respecto a estos rangos correctamente establecidos se asocian estrechamente con enfermedades atópicas como la dermatitis atópica, el asma extrínseco y la rinitis alérgica. Los aumentos extremos de la IgE sérica se observan normalmente en parasitosis y son necesarios para el diagnóstico de síndrome hiper-IgE. Los niveles disminuidos pueden apoyar el diagnóstico de asma intrínseco (no alérgico) y pueden ayudar a excluir la aspergilosis

broncopulmonar alérgica. Dado que los niveles de IgE entre individuos atópicos y no atópicos suelen superponerse, la utilidad clínica de la concentración sérica de IgE total para confirmar la causa alérgica en la enfermedad respiratoria o cutánea es mínima. En caso de ser elevados pueden servir de confirmación, pero un valor normal o bajo no elimina la posibilidad de una patogenia mediada por IgE. Por ello, la IgE sérica total debe interpretarse con sumo cuidado en el contexto clínico de cada paciente.

En 2003 se aprobó el uso de Omalizumab (Xolair) para el tratamiento del asma alérgico. Omalizumab es un anticuerpo humanizado IgG₁ anti-Fc de la IgE, que se une a un epítipo en la cadena pesada epsilon (Cε3), responsable de la unión a la cadena alfa del receptor de alta afinidad de la IgE (α-FcεRI). La administración de Omalizumab produce una reducción de la IgE libre, bloquea la unión de la IgE al receptor α-FcεRI, y disminuye el número de receptores α-FcεRI en los basófilos y mastocitos. El tratamiento induce una reducción de los síntomas alérgicos en la mayoría de los sujetos tras la exposición a los alérgenos. Los pacientes con niveles de IgE entre 30-700 UI/ml son candidatos a este tratamiento. La concentración de IgE total en suero debe determinarse previamente para establecer que pacientes son candidatos al tratamiento con Omalizumab y para establecer la dosis del anticuerpo a administrar. Se ha desarrollado un nuevo método que emplea una forma biotinizada o insolubilizada del receptor α-FcεRI para cuantificar el porcentaje de IgE total libre en suero. Con este ensayo se puede determinar el número de moléculas de IgE en el suero de aquellos pacientes tratados con el anticuerpo que permanecen sin unirse al anticuerpo y que aun pueden unirse al receptor α-FcεRI y activar las células efectoras. Por otro lado, la cuantificación de IgE total con el ImmunoCAP prácticamente no se altera con el tratamiento con Omalizumab.

2.2. IgE ESPECÍFICA DE ALERGENO

A diferencia de la IgE total sérica, la presencia de una IgE en suero que reacciona de forma específica con un alergeno determina si un paciente está sensibilizado, e identifica la propensión a una reacción alérgica tras la exposición de nuevo al alergeno. La sensibilidad y especificidad de los ensayos que determinan la IgE específica se ha relacionado clásicamente con la historia clínica del paciente y/o las pruebas cutáneas en estudios transversales. Los datos en este sentido concluyen que la sensibilidad diagnóstica de la mayoría de las medidas de IgE específica es comparable al prick cutáneo con alérgenos respiratorios y alimentarios, y complementaria a la intradermorreacción en la alergia a venenos de himenópteros y fármacos. Los autoanalizadores empleados en la actualidad aportan medidas de IgE específica fiables, reproducibles y cuantitativas para muchas de las especificidades alérgicas clínicamente relevantes. Por ello, han comenzado a establecerse asociaciones entre una cierta concentración sérica de IgE específica y la probabilidad de reacción alérgica tras una exposición antigénica. La mayor probabilidad de riesgo se ha demostrado en la alergia alimentaria y en niños. Así, los niños con unas concentraciones definidas de IgE específica frente a cacahuete, clara de huevo, leche de vaca y pescados tienen una probabilidad elevada de desarrollar sintomatología clínica demostrada mediante las pruebas de provocación doble ciego. En concreto, un estudio de 2001 por Sampson *et al*, estableció distintos niveles diagnósticos de IgE específica frente a la clara de huevo (7 KUA/L), leche de vaca (17 KUA/L), cacahuete (14 KUA/L) y pescado (20 KUA/L). La detección de niveles por encima de esos puntos predecía la reactividad clínica con una especificidad > 95%. Este estudio establecía que la cuantificación de IgE específica frente a esos alérgenos podía sustituir a las pruebas de provocación, que pueden ser

peligrosas y que precisan mucho tiempo. Este estudio demuestra que para cada alergeno se puede establecer un punto de corte distinto. Además, deberá considerarse el método empleado, puesto que miden distintos tipos de IgE específica de alimentos, así como la población utilizada como control. Hará falta, por otro lado, extender esta aproximación de puntos de corte a otros alergenicos. El panorama se complica aun más según si el punto de corte se considera de acuerdo a la sensibilidad clínica o únicamente la sensibilización, según las posibles reacciones cruzadas entre alergenicos, etc.

Hasta la fecha se ha considerado únicamente la positividad en función de las clases asignadas a la concentración de IgE específica de forma artificial (Tabla 1). Se precisa de estudios que valoren los puntos de corte a establecer para cada alergeno según distintos “*endpoints*” (diagnóstico, pronóstico, sensibilización, etc.) y en distintas situaciones clínicas (niños, adultos, multisensibilizados, estación del año, etc.).

3. TRATAMIENTOS QUE PUEDEN INTERFERIR CON LA CUANTIFICACION DE IgE ESPECÍFICA

Existe una serie de tratamientos que pueden causar interferencias en los inmunoensayos para IgE total y para IgE específica. Cualquier tratamiento que altere la composición o el volumen del compartimiento sanguíneo del paciente (transfusiones sanguíneas, proteínas heterólogas, quimioterapia, administración de sueros o reacciones anafilácticas sistémicas recientes) tienen la capacidad de alterar artificialmente la cuantificación de IgE específica de alergenicos. La administración de Omalizumab interfiere con algunos ensayos de detección de IgE total e IgE específica. Fármacos como los esteroides o antihistamínicos no interfieren generalmente con la medida de IgE total o específica salvo que la administración prolongada de los esteroides ocasione

una inmunosupresión importante. La inmunoterapia tradicional puede alterar determinados métodos, dada la posibilidad potencial de generar inmunoglobulinas específicas frente al alérgeno de un isotipo no IgE.

4. MUESTRAS BIOLÓGICAS EN LAS QUE SE DETERMINA LA IgE

4.1. TIPO DE MUESTRA

El suero y plasma se consideran las muestras de trabajo empleadas rutinariamente en la detección de IgE total y específica. Otras muestras como lágrimas, lavados nasales o bronquiales, líquido cefalorraquídeo y sobrenadantes celulares se utilizan habitualmente para investigación y prácticamente ninguna empresa indica que sus ensayos se pueden emplear para analizar otro tipo de muestra diferente de suero y plasma. La presencia de anticoagulantes para obtener plasma puede interferir en la cuantificación exacta de los niveles sanguíneos de IgE total. Por ello, se recomienda el empleo de suero sobre todas las matrices biológicas. Los problemas de falta de paralelismo o causados por efectos relacionados con la matriz proteica pueden agravarse si se extrae menos sangre de la establecida para el tubo de recogida. Las muestras con presencia de hemólisis, ictericia o lipémicas a simple vista no deberían emplearse para el estudio de IgE debido a posibles interferencias en su determinación.

4.2. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Existe un número de recomendaciones acerca de la estabilidad de la muestra sanguínea a partir de la práctica habitual, que es similar a la de otros muchos parámetros

analizados mediante inmunoensayos. Aunque las muestras transportadas en contenedores *polyspan* pueden mantenerse a temperatura ambiente hasta una semana sin degradarse la IgE, se recomienda que el suero o plasma separado permanezca a temperatura ambiente menos de 8 horas (tiempo de trabajo habitual en un laboratorio asistencial). Si el ensayo no se puede realizar en ese tiempo, se recomienda que la muestra de suero o plasma se mantenga refrigerada a 4°C si el estudio se realiza en los siguientes 2-3 días, o congelado a -20°C si se posterga el análisis aun más. La congelación a temperaturas inferiores no es precisa aunque no altera la inmunorreactividad de la IgE. Como ocurre con la mayoría de las proteínas, se recomienda que las muestras no se congelen/descongelen repetidamente. Tampoco se recomiendan los congeladores libres de escarcha, porque los ciclos de congelación/descongelación pueden provocar cambios radicales de temperatura perjudiciales para proteínas como la IgE. Durante el almacenamiento prolongado, las muestras congeladas empiezan a tener separación de fases, concentrándose las proteínas en la parte inferior, por lo que la muestra de los tubos debe mezclarse antes de su uso en el ensayo. En el caso de emplear tubos con materiales separadores o aceleradores de la coagulación para la extracción sanguínea, se deben seguir las recomendaciones del fabricante y recoger los volúmenes diseñados para cada tubo.

5. MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS

La IgE, tanto como antígeno como anticuerpo, se estudia en suero actualmente mediante una serie de métodos disponibles comercialmente. De hecho, los ensayos de IgE total son los más estandarizados y los que mejor funcionan en los laboratorios clínicos.

5.1. ENSAYOS DE IgE TOTAL SÉRICA

La IgE se ha medido clásicamente con una serie de inmunoensayos competitivos y no competitivos, en fase sólida y líquida, isotópicos y no isotópicos, que usan anticuerpos específicos de IgE humana como reactivos de captura y/o detección. En la mayoría de los ensayos, estos anticuerpos están insolubilizados en la fase sólida (anticuerpo de captura) y/o directamente conjugado a un marcador (radio-nucleido, enzima o fluoroforo). Muchos de los ensayos actuales para cuantificar IgE total se realizan en analizadores automatizados que mejoran la precisión y reproducibilidad, al tiempo que aseguran la máxima sensibilidad y especificidad. Aunque se empleen distintos reactivos y fases sólidas, los ensayos comerciales usan de referencia un estándar común primario de IgE humana (OMS 75/502). Los resultados se cuantifican en unidades internacionales por volumen (UI/ml). En teoría, esas unidades arbitrarias se pueden transformar en unidades de masa mediante el factor de conversión 2,42 (1 UI = 2,42 ng), aunque dicha conversión no esta estandarizada y no se puede realizar directamente a partir de los ensayos que se emplean habitualmente y que determinan IU/ml de IgE. El hecho es que los ensayos de IgE total son muy reproducibles y los resultados son muy comparables, tal como se comprueba con los ensayos de calidad interlaboratorio (*proficiency testing*). Este tipo de controles de calidad interlaboratorio para la cuantificación de IgE total existen a nivel europeo y americano. En nuestro país actualmente existen controles de este tipo auspiciados por la SEI (Sociedad Española de Inmunología) y la SEQC (Sociedad Española de Química Clínica).

5.2. ENSAYOS ESPECÍFICOS DE ALERGENO

5.2.1. COMPONENTES ALERGÉNICOS DE LOS ENSAYOS DE IgE ESPECÍFICA

El ensayo de RAST apareció en 1967 para detectar anticuerpos IgE con una especificidad alérgica concreta. Este ensayo no competitivo, heterogéneo e inmunoradiométrico empleaba el alérgeno insolubilizado en discos de papel para unir anticuerpos específicos de todos los isotipos presentes en suero, un paso de separación del anticuerpo humano libre y unido, y el uso de un anticuerpo anti-IgE humano radio-marcado para detectar los anticuerpos IgE unidos al alérgeno. Mas tarde, se desarrollaron muchas variantes técnicas comerciales, que en muchos casos se han abandonado. Un formato de ensayo inverso emplea el alérgeno en fase líquida. En este caso, la IgE se captura previamente del suero con un anticuerpo anti-IgE en fase sólida, y posteriormente el anticuerpo IgE específico se detecta con el alérgeno marcado. Este ensayo inverso no se emplea habitualmente en clínica y se emplean más bien como ensayo de investigación. El resto de métodos de cuantificación de IgE desarrollados tienen las siguientes características comunes (Tabla 2):

- Pocillo de reacción: tubos de plástico o cristal, pocillos de placas de microtitulación, tiras de plástico, “CAP” de plástico con una matriz en esponja interna.
- Reactivos conteniendo el alérgeno: en fase sólida o en fase líquida.
- Reactivo de detección de la fracción Fc de la IgE humana (especifico de la cadena pesada epsilon)
- Sistema de calibración (por ejemplo, suero de referencia con una cantidad definida de IgE para construir la curva de calibración de IgE total).

- Tampón de reacción para mantener el pH y aportar la matriz proteica para la IgE a medir, que asegure una unión inespecífica mínima.
- Muestra: suero humano (que contenga la IgE) y un suero control negativo que no contenga IgE específica frente a ningún alérgeno.
- Autoanalizador (nevera, carrusel de reactivos, carrusel de muestras, cámaras de incubación, etc.).
- Sistema de procesamiento de datos (software, algoritmo).

De todos ellos, el alérgeno empleado en el ensayo es el componente más complejo en cuanto a su preparación desde el material biológico crudo, y el control de calidad entre lotes y su validación. Las preparaciones de alérgeno son mezclas complejas de proteínas que varían ampliamente en la distribución de tamaño y carga. Cada componente proteico induce una respuesta humoral inmunitaria heterogénea que varía en términos de isotipo y concentración de anticuerpo.

Generalmente, los alérgenos se utilizan en forma de un reactivo individual o separado para cada especificidad alérgica. A veces los alérgenos se combinan, bien conjugados o mezclados en un solo reactivo. En estos casos se emplean como reactivos de cribado de múltiples alérgenos (una mezcla de los alérgenos alimentarios o de los inhalados más representativos) y pueden contener alérgenos seleccionados de muchos grupos de especificidades (por ejemplo, pólenes de gramíneas, pólenes de árboles, epitelios, ácaros, alimentos, etc) o incluir muchas especificidades de un solo grupo de un alérgeno (polen de abedul, roble, arce, etc). Más aún, algunos reactivos de alérgeno contienen alérgenos recombinantes para suplementar alérgenos nativos que estén presentes a baja concentración (por ejemplo, el reactivo para látex suplementado con el recombinante rHev b 5). En un ensayo empleado en la clínica, el alérgeno está en fase líquida y

biotinilado para fijarse durante el ensayo a una fase sólida usando una avidina insolubilizada. Este ensayo emplea la química en solución para unir el anticuerpo y la posterior insolubilización para facilitar la separación del anticuerpo libre del unido al alérgeno.

El segundo reactivo más importante es el reactivo de detección de IgE humana que confiera la especificidad de IgE del ensayo. Son anticuerpos que pueden ser policlonales y producidos en otras especies (por ejemplo, conejo, cabra, oveja o caballo), o monoclonales que se unen a distintos epítopos, generalmente de la región Fc de la IgE humana. Se han empleado mezclas de anticuerpos monoclonales y policlonales específicos de IgE por los fabricantes para obtener paralelismo y linealidad óptimos en un rango amplio de trabajo. Los fabricantes usan diversos procedimientos y reactivos para documentar la especificidad y certificar el funcionamiento de estos reactivos de detección de IgE humana en el contexto de cada ensayo respectivo.

El tercer componente de estos ensayos que ha sufrido mayores variaciones en los ensayos comerciales ha sido el sistema de calibración empleado para cuantificar el nivel de IgE en el ensayo. La estrategia empleada para calibrar los ensayos de IgE específica es semejante entre distintos fabricantes: una curva de calibración de IgE total sérica heteróloga se usa para transformar las unidades de respuesta generada por el ensayo en unidades cuantitativas de IgE específica de alérgeno en KUIA/L. La "A" indica que es específico de alérgeno y distingue la unidad de la unidad en KUI/L usado en el ensayo de IgE total. Otros métodos empleados históricamente para informar los resultados en la señal de respuesta, tales como cuentas o cuentas normalizadas, no se han vuelto a emplear clínicamente. Las curvas de calibración homóloga con IgE específica conocida se emplean esporádicamente en estudios de investigación.

5.2.2. FORMATOS DE ENSAYOS ALTERNATIVOS

Los ensayos “*point of care*” son pruebas diagnósticas que se realizan en el hospital, consultas y en laboratorios, por personal no cualificado. Estos ensayos precisan poca manipulación y emplean una química sencilla que precisa añadir una gota de sangre completa en un cassette de plástico. La migración lateral transporta las proteínas séricas hasta una membrana, mezclándose con reactivos según migran. El ensayo está diseñado para generar un resultado rápido con un valor cualitativo (positivo/negativo) o una estimación semicuantitativa de la IgE específica frente a uno o varios alérgenos.

Un ensayo “multiplex” es un procedimiento por el que se detectan diversos analitos de especificidad diferente, y en algunos casos cuantifican, en una muestra de suero empleando una sola mezcla de reactivos. En el caso de la IgE específica, este tipo de ensayos mediría la IgE frente a varias especificidades alérgicas en una reacción de un paso único. Un ejemplo del ensayo “multiplex” de IgE, conocido como *microarray*, es el ensayo basado en el en un microchip de silicón en el que los alérgenos purificados individuales (normalmente recombinantes) se adhieren en puntos por triplicado. La incubación de una pequeña cantidad de suero en el microchip expone el suero del paciente a muchas especificidades alérgicas diferentes al mismo tiempo. Tras el lavado para eliminar las proteínas séricas libres, la IgE unida se detecta con un conjugado anti-IgE humana y la incubación posterior con el sustrato. Son métodos que están empezando a aplicarse en nuestro país y de los que todavía no se posee conocimiento práctico.

5.3. ESQUEMA DE CLASIFICACIÓN DE LOS INMUNOENSAYOS DE IgE ESPECÍFICA

Los ensayos disponibles en el mercado para la detección de anticuerpos IgE pueden clasificarse como cualitativos, semicuantitativos o cuantitativos dependiendo del grado con el que el ensayo refleja la cantidad de IgE en la muestra y la precisión del ensayo. Cada categoría tiene su utilidad y sus limitaciones en el diagnóstico e investigación de las enfermedades alérgicas (Tabla 3).

5.3.1. ENSAYO CUALITATIVO

Un ensayo cualitativo para cribado puede producir dos tipos de resultados: no reactivo, negativo, indetectable o ausencia; y reactivo, positivo, detectable o presente. No está diseñado para determinar la concentración exacta de IgE. Este tipo de ensayo tiene una muestra única de referencia que sirve para definir el punto de detección por encima del que se considera la prueba positiva.

Los resultados cercanos al punto de corte (*“cutoff”*) se informan como indeterminados (*“borderline”*). Un resultado positivo implica sólo que la señal de la prueba supera el umbral analítico o punto de corte establecido para conseguir un nivel de especificidad deseado. Lo ideal es que la señal positiva indique la presencia de IgE en el suero del paciente.

Un ejemplo del ensayo cualitativo es el cribado frente a múltiples alérgenos en el que diversas especificidades antigénicas se mezclan en un reactivo de alérgeno y la presencia de la IgE específica frente a esos alérgenos se determina en un único análisis. Dado el elevado número de proteínas alérgicas, es muy difícil controlar la calidad de la cantidad de alérgeno presente para garantizar la composición y cantidad de los alérgenos en la mezcla. Además, los sueros de los pacientes alérgicos tienen concentraciones variables de IgE específica del espectro de alérgenos y generan niveles

de respuesta muy variables en los ensayos de cribado frente a múltiples alérgenos, dada la diferente cantidad y las proporciones relativas de los alérgenos absorbidos.

Otros ejemplos incluyen los ensayos con tiras reactivas y los POCT. En el ensayo de tira reactiva, la IgE específica frente a un solo antígeno se determina por la presencia o ausencia de reacción en un examen visual del color e intensidad. De igual modo, el POCT está diseñado para determinar un resultado positivo o negativo mediante la presencia o ausencia de una banda visual o punto indicador de la presencia de la IgE. Evidentemente no se deben emplear como métodos diagnósticos pero sí pueden servir como cribado en ciertas situaciones (por ejemplo, elevada presión asistencial).

5.3.2. ENSAYO SEMICUANTITATIVO

Un ensayo de titulación semicuantitativo es una opción superior al ensayo cualitativo puesto que proporciona una idea de la magnitud de la respuesta. Las variaciones en la señal positiva detectada se determinan en términos de una serie de grados o clases crecientes (por ejemplo: I a VI; bajo a alto); y unidades arbitrarias por mililitro (U/ml) relativas a una curva dosis-respuesta heteróloga suministrada por el fabricante; una dilución hasta el punto en que la señal se hace negativa (por ejemplo, título); o en comparación con un esquema de graduación cualitativa (por ejemplo: intensidad de la banda generada). Un ensayo semicuantitativo puede definirse como un ensayo que emplea una curva de calibración de punto único o múltiple, y es posible que no sea capaz de identificar correctamente un cambio de dos veces en el nivel de IgE cuando el suero se diluye dos veces. El ensayo semicuantitativo refleja una estimación e unidades que son relativas y no extrapolables a cualquier material de referencia común. Por último, estos ensayos son normalmente incapaces de alcanzar de manera fiable uno o

más de los criterios de linealidad, recuperación de dilución y paralelismo típicos de los ensayos cuantitativos.

5.3.3. ENSAYOS CUANTITATIVOS

Un ensayo cuantitativo produce una estimación ajustada y reproducible de la concentración de IgE en la muestra biológica basado en una interpolación de una curva de calibración. Cumple todos los criterios analíticos para la cuantificación (paralelismo o linealidad, recuperación y precisión interensayo). En ausencia de un estándar de IgE específica frente a un alérgeno concreto, un ensayo cuantitativo se define funcionalmente como aquel que puede detectar con fiabilidad una reducción de dos veces el nivel de IgE cuando el suero se diluye dos veces dentro del rango de detección del ensayo. Los ensayos cuantitativos emplean una curva de calibración con múltiples puntos estándar, a partir de la cual se interpolan los datos a calcular. Una curva de referencia puede construirse con métodos de interpolación homólogos o heterólogos. A pesar de que lo deseable es contar con ensayos cuantitativos verdaderos en los que los resultados se informen en unidades referidas a un estándar internacionalmente reconocido (por ejemplo, WHO 75/702), no es posible hacerlo con el método de interpolación homóloga que requiere IgE homólogas calibradas individualmente para cada uno de los cientos de especificidades alérgicas. Por lo tanto, el ensayo de calibración que usa una interpolación heteróloga es una alternativa aceptable y es el método que emplean por norma los ensayos comerciales. En este sistema de calibración la cantidad de IgE específica frente a cada alérgeno se interpola en una única curva de calibración heteróloga, como la curva de referencia de la IgE total en suero. Con este método, en teoría el ensayo de IgE puede compararse a un estándar sérico internacionalmente reconocido. Los ensayos cuantitativos son los más complejos y sus

resultados se informan como unidades de masa ($\mu\text{g/l}$ para la IgE total) o unidades internacionales (kIU/l para IgE total o KUA/l para la IgE específica).

6. CONTROLES DE CALIDAD DE LOS ENSAYOS DE IgE.

La variabilidad intra- e inter-laboratorio y la validación diaria de ensayos de la IgE total y específica de alérgenos séricos se evalúan normalmente por los fabricantes y los usuarios finales de los laboratorios clínicos. La evaluación repetida de *pools* de sueros humanos con concentraciones variables de IgE puede ayudar a asegurar la calidad de los resultados a lo largo del tiempo. Se han propuesto diversas estrategias para asegurar *pools* de sueros con concentraciones conocidas de IgE para realizar el control de calidad, pero existen dificultades prácticas para obtener cantidad suficiente de suero de sujetos alérgicos sin infecciones y bien caracterizados. La aproximación más práctica ha sido la recolección de la mayor cantidad de suero posible de sujetos hipersensibilizados o bien de personas sanas que tienen una historia positiva con un resultado confirmatorio positivo (cutáneo o serológico) y que no hayan recibido inmunoterapia con alérgenos (estos suelen desarrollar $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpos IgG específicos que pueden interferir en algunos ensayos que detectan niveles de ng/ml de IgE). Estos *pools* de suero, cuando se fusionan en cantidades iguales contienen mezclas heterogéneas de anticuerpos de diversos isotipos y especificidades alérgicas. Mientras el objetivo teórico de este procedimiento es obtener la máxima heterogeneidad de IgE de manera que el *pool* de suero mimetice la respuesta inmunitaria humoral de la población general alérgica, en la práctica se obtiene el efecto opuesto. La mezcla de muchos sueros tiende a concentrar las especificidades de IgE más comunes y diluir las especificidades de IgE menores. Dado que el empleo de un suero individual puede sobreexpresar reactividades menores

idiosincrásicas y una mezcla de sueros diferentes diluye las especificidades menores, lo ideal debe ser usar tanto sueros individuales como mezclas de *pooles* para demostrar la sensibilidad y especificidad diagnóstica de cualquier ensayo.

En casos seleccionados, el pool de suero puede caracterizarse por su heterogeneidad con distintos métodos como la Inmunoelectroforesis radial o los ensayos de inhibición con antígeno soluble en Western Blot. Los isotipos potencialmente competidores (IgG, IgA) puede también medirse para estudiar la posibilidad de inhibición competitiva o la unión de IgE bloqueante de especificidades alérgicas menores.

Tabla 1. Transformación de los niveles cuantitativos de IgE específica en KUA/L a niveles semicuantitativos en clases.

KUA/L de IgE específica	Clase
<0,35	0
0,35-0,70	1
0,70-3,5	2
3,5-17	3
17-50	4
50-100	5
>100	6

Tabla 2. Características de los principales ensayos de cuantificación de IgE específica disponibles actualmente en España

EMPRESA	POCILLO DE REACCIÓN / FASE REACCIÓN	SISTEMA CALIBRACIÓN	RANGO DE DETECCIÓN	MÉTODO DETECCIÓN	AUTOANALIZADOR
PHADIA	CAP / fase solida	OMS 75/502	0.1 -100 KUA/L	Fluorescencia	UniCAP 100 ImmunoCAP 250 ImmunoCAP 1000
DPC (Actualmente SIEMENS Healthcare Diagnostics)	Tubos de cristal / fase líquida	OMS 75/502	0.1 - 100 KUA/L	Quimioluminiscencia	Immulite 2000
BAYER (Actualmente SIEMENS Healthcare Diagnostics)	Placa ELISA / fase líquida		3 - 1000 IU/ml	ELISA	AlaSTAT microplate
HYPHEN BIAMED	Partículas paramagnéticas/fase sólida	IgE anti-r Bet v1	0.1 - >100 KUA/L	Quimioluminiscencia	Advia Centaur
HYCOR	Discos de papel / fase solida	OMS 75/502	0.35-100 KUA/L	ELISA	Hytech

Tabla 3. Clasificación de los ensayos de IgE específica

Clasificación	Informe de resultados	Calibradores	Calibradores y controles	Método comercial (empresa)
Cualitativo	- Reactivo o negativo - No reactivo o positivo - Puede emplearse una zona indeterminada	- Calibradores simples o dobles	- Una muestra de referencia - Control positivo y negativo	- Rapid (Phadia)
Semicuantitativo	- Unidades arbitrarias o clases	- Calibradores simples o dobles	- Control negativo y controles positivos de dos niveles. - Referencias únicas para el sistema específica obtenido de un pool de sueros	- CLA
Cuantitativo	- Unidades relacionadas a una preparación de referencia reconocida (ej., Standard OMS IgE 75/702)	- Curva con varios puntos para interpolar	- Controles positivos de tres niveles - Muestras referencia calibradas	- CAP (Phadia) - Fase líquida (DPC)

			frente a una preparación de referencia	- Discos papel (Hycor)
--	--	--	--	------------------------