

Diagnóstico molecular en Alergología: aplicación de la técnica de micromatrices (microarrays)

M Ferrer,¹ ML Sanz,¹ J Sastre,^{2,3} J Bartra,^{4,3} A del Cuvillo,⁵ J Montoro,⁶ I Jauregui,⁷ I Davila,⁸ J Mullol,^{9,3} A Valero^{4,3}

¹ Departamento de Alergia e Inmunología Clínica, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, Spain

² Servicio de Alergia, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

³ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES)

⁴ Unitat d'Al·lèrgia, Servei de Pneumologia i Al·lèrgia Respiratòria, Hospital Clínic (ICT), Barcelona, Spain

⁵ Clínica Dr. Lobatón, Cádiz, Spain

⁶ Unidad de Alergia, Hospital La Plana, Vila-Real (Castellón), Spain

⁷ Servicio de Alergología, Hospital de Basurto, Bilbao, Spain

⁸ Servicio de Inmunoalergia, Hospital Universitario, Salamanca, Spain

⁹ Unitat de Rinologia, Servei d'Otorinolaringologia (ICEMEQ), Hospital Clínic, Barcelona, Spain

■ Resumen

En el momento actual la disponibilidad de alérgenos recombinantes y purificados permite determinar IgE específica frente a diversos componentes alergénicos. De esta manera es posible diagnosticar el perfil de sensibilización individual de cada paciente. La técnica de las micromatrices (microarrays) permite determinar IgE específica frente a múltiples alérgenos a un tiempo en un mismo paciente con una mínima cantidad de suero e incluso permite en una misma muestra de suero determinar IgG e IgM frente a los mismos alérgenos. Ya se están desarrollando no sólo determinaciones de anticuerpos sino ensayos de activaciones celulares en micromatrices. Además ayudará a explicar reacciones cruzadas, facilitará realizar una evaluación a sujetos en los que no podemos realizar pruebas cutáneas. Va a significar un gran impulso para el desarrollo de la Inmunoterapia dirigida exactamente a las sensibilizaciones de cada paciente, consiguiendo formas especialmente hipoalergénicas con gran poder inmunogénico, mejorando la seguridad y la eficacia de la inmunoterapia. Finalmente, estas técnicas van a facilitar la comprensión de la fisiopatología de las enfermedades alérgicas.

Palabras clave: Micromatrices. Microarray. Diagnóstico por componentes. IgE específica. Inmunoterapia.

Introducción

Al hablar de nuevos métodos diagnósticos, es bueno no perder la perspectiva histórica. En los años treinta Alexander Francis afirmaba que “Las pruebas cutáneas eran sencillas y fascinantes; y las vacunas con las que se inmunizaba contra la proteína que se había descubierto como causante de los síntomas llegó a ser tan popular como tratamiento universal, que se pensaba que se tenía al alcance la cura de todas las formas de asma” [1]. Años más tarde, el descubrimiento de la IgE produjo controversias entre los que defendían la fiabilidad de las pruebas cutáneas y los que apoyaban el diagnóstico *in vitro*, de tal forma que se llegó a afirmar en un editorial que la determinación de la IgE específica iba a “reemplazar rápidamente las primitivas pruebas cutáneas en la clínica práctica” [2].

Quizá con el diagnóstico molecular ocurra lo mismo. Pero lo que no puede ponerse en duda es que cuando para investigar su propia polinosis, Charles Blakely se realizó por primera vez una prueba cutánea a sí mismo con polen y cuando Kimishige y Teruko Ishizaka por una parte y Johansson por otra descubrieron la IgE, fueron hitos en la comprensión y el tratamiento de las enfermedades alérgicas.

Diagnóstico molecular

A final de los años ochenta cuando se clonó el primer alérgeno [3] se abrió una nueva etapa para producir alérgenos recombinantes purificados para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades alérgicas [4].

Hasta ese momento se podía saber a qué fuente alérgica era sensible un paciente, con el diagnóstico molecular o por componentes se puede diagnosticar el perfil de sensibilización individual, esto es, qué partes del alérgeno reconoce cada paciente. En estos últimos años se han ido caracterizando y produciendo los alérgenos más relevantes a nivel molecular, la mayoría han sido producidos como proteínas recombinantes [5, 6]. Sin embargo, conforme han ido apareciendo los distintos alérgenos recombinantes y purificados, el número es creciente y se hace casi imposible estudiar en un mismo paciente todos los recombinantes de familias relacionadas.

Posteriormente los esfuerzos han estado y están dedicados a comprobar que los alérgenos recombinantes o alérgenos naturales que se disponen son los que realmente reconoce la IgE del paciente y que desencadenan síntomas. Se trata de comprobar que poseen un perfil de reconocimiento por los epítopes de IgE similar al de los alérgenos que hasta ahora se habían estudiado. Además, se está determinando qué panel de alérgenos es el representativo para una determinada sensibilización [7].

Fundamento de la técnica

Las micromatrices o biochips nacieron como una herramienta para poder analizar expresión génica en genomas. Desde su introducción a principios de los noventa, la técnica de DNA con micromatrices se ha aplicado para determinar ácido nucleico, y del DNA se pasó a analizar expresión de RNA. Este paso se precisaba entre otras razones porque al estudiar expresión génica se necesitaban herramientas cada vez más capaces para estudiar expresión de proteínas a nivel intracelular. Se desarrolló así la técnica de micromatrices para proteínas adoptándose la misma técnica de micromatrices que comenzó para DNA.

En síntesis se trata de un inmunoensayo múltiple en una fase sólida donde las proteínas (alérgenos recombinantes o naturales purificados) son inmovilizadas en esa fase sólida y cantidades mínimas de suero son incubadas con estas proteínas en condiciones estándar. Los anticuerpos presentes en el suero son captados por los distintos alérgenos, y tras un lavado para eliminar las sustancias que no se han unido, se detectan los anticuerpos por un segundo anticuerpo anti-isotipo marcado por fluorescencia o por un enzima que se detectará mediante un láser o mediante quimioluminiscencia.

Hasta ahora se determinaba la IgE específica alérgeno por alérgeno, y con esta técnica se determinan múltiples componentes alérgicos en una misma muestra de suero, es más, puede determinarse en esa misma muestra de suero no sólo IgE sino IgG, IgM e IgA al mismo tiempo y en el mismo ensayo frente a los mismos alérgenos.

Como en el micromatrices de DNA, se construye sobre superficies planas como por ejemplo portas de cristal de alta calidad de las mismas características que el empleado para microscopía óptica. Para la inmovilización de la proteína sobre el cristal [8,9] se modifica la superficie por ejemplo con estructuras de nitrocelulosa o similares a hidrogeles. Los distintos tipos de proteína (recombinantes, anticuerpos, péptidos, o heptámeros) se depositan en espacios micrométricos mediante robótica —en el momento actual mediante robótica pueden depositarse hasta 30.000— para que posteriormente pueda tener la reacción con el li-

gando cuya unión será detectada mediante anticuerpos marcados con fluorescencia, tinciones o técnicas combinadas. La fluorescencia habitualmente se detectará mediante láser. Para calcular y analizar de forma semicuantitativa el resultado debe contarse con un software que compara la fluorescencia de los alérgenos problemas con una curva de concentraciones conocidas de IgE con lo que se extrapola el resultado del problema.

En general el proceso completo dura como máximo cinco horas y no tiene dificultad técnica. El número de pacientes dependerá del número de portas que se procesen a la vez. En el caso de IgE específica con la técnica que empleamos los autores del prototipo de VBC-Genomics, en cada porta pueden analizarse cuatro pacientes.

El concepto de una reacción de ligando para proteínas se publicó por primera vez hace quince años [10]. No pudo llevarse a cabo hasta ahora por la dificultad de inmovilizar en espacios tan pequeños proteínas debido a su tamaño, carga y estructura tridimensional. No fue hasta diez años después en que se publicó por primera vez el empleo de micromatrices con alérgeno crudo en cristales convencionales amplificando la señal [11] y posteriormente el equipo de Kim lo realizó en un chip en base de nitrocelulosa [12]. Además, se añade la dificultad de que en el proceso de inmovilización la proteína puede desnaturizarse y para el reconocimiento por parte de la IgE es vital mantener la estructura terciaria.

Se trata en resumen de un enzimoensayo indirecto semicuantitativo de IgE específica. La principal ventaja frente a otros métodos es que permite realizar una determinación múltiple de IgE específica frente a un panel de componentes alérgicos que se podrá ir ampliando. Reconoce los anticuerpos IgE del paciente mediante un anticuerpo secundario que se marca con fluorescencia. Como hemos explicado anteriormente un panel de alérgenos recombinantes o naturales se inmoviliza en un chip, las dimensiones del cristal son manejables para trabajar, ya que tienen el tamaño de un porta. En el que se dispone actualmente, cada alérgeno está fijado al porta por triplicado para asegurar reproducibilidad del ensayo. La cantidad de suero que se precisa es de 50 microlitros junto con los calibradores, cada pocillo donde se sustenta el alérgeno está rodeado de Teflon para evitar que se desborde la muestra. Cada pocillo contiene la misma cantidad de alérgeno por si se quieren posteriormente estudiar diluciones. El número de alérgenos que pueden inmovilizarse mediante esta técnica es prácticamente ilimitado (Figura).

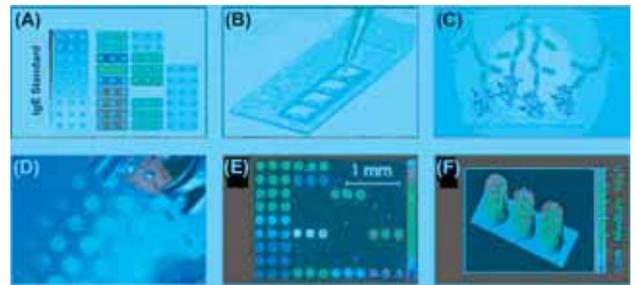


Figura. Los pasos de la técnica son un lavado previo para eliminar todos aquellos enlaces no covalentes que puedan estar unidos a los alérgenos, se aplica entonces 50 microlitros de suero, se deja incubar y tras un lavado corto se aplica el anticuerpo marcado mediante fluorescencia y tras un segundo lavado se escanea el cristal con un láser.

Tabla 1. Lista de alérgenos disponibles

Alimentos		Árboles	Ácaros	Látex
Kiwi	nAct d 1 nAct d 2 nAct d 5 nAct d 8 nAct d 1 nAct d 2	Aln g 1.0101 Bet v 1.0101 Bet v 1.0401 Bet v 2.0101 Cor a 1.0103 Cup a 1 Ole e 1	Der f 1 Der f 2 Der p 1 Der p 2 Der p 10.0101 Der s 1 Epitelios animales	Hev b 10.0102 Hev b 6.02 Hev b 7.02 Hev b 8.0204 Hev b 11.0101 Hev b 1.0101 Hev b 3.0101
Apio	Api g 1.0101	Ole e 2 Pho d 2.0101	Can f 1 Can f 3	Hev b 5.0101 Hev b 0.0101
Leche	Bos d 4 Bos d 6 Bos d 7 Bos d 8 Bos d Lactoferrin Bos d 8 alpha S1 Bos d 8 beta Bos d 8 kappa Bos d 5.0102 Bos d 5.0101 Cor a 8	Pla a 2 Pla a 1.0101 Gramíneas Cyn d 12.0101 Lol p 1 Phl p 1.0102 Phl p 5.0101 Phl p 12.0101 Phl p 2.0101 Phl p 6.0101	Fel d 1 Hongos Alt a 1.0101 Alt a 6.0101 Asp f 1 Cla h 8.0101 Cucaracha Bla g 2.0101	
Zanahoria	Dau c 1.0103	Phl p 7.0101	Bla g 5.0101	
Huevo	Gal d 1 Gal d 2 Gal d 3 Gal d 4 Gal d 5	Malezas Art v 1 Hel a 2.0101	Per a 7.0101 Anisakis Ani s 3.0101	
Manzana	Mal d 1.0108	Mer a 1.0101	Ani s 1.0101	
Gamba	Pen i 1 Pen m 1	Par j 1.0103 Par j 2.0101	Himenópteros	
Melocotón	Pru p 1 Pru p 3	Par j 3.0102	Api m 1	
Trigo	Tri a 18 Tri a 19 Gliadina Tri a 19.0101 Tri a aA_TI	Marcador de CCD* Ana c 2	Api m 4	
Anacardo	Ana o 2.0101			
Sésamo	nSe s i1			
Nuez Brasil	rBe re 1			
Cacahuete	nAra h 1 nAra h 2 nAra h 3 rAra h8			
Avellana	rCor a 1.0401 rCor a 8 nCor a 9			
Soja	rGly m 4 NGly m b-conglycinin nGly m glycin			

* Carbo-hydrate Cross Determinants.

Correlación con determinación de IgE específica

Existen varios estudios que exploran la correlación de la técnica de micromatrices con las empleadas hasta ahora. El primer estudio compara la técnica de micromatrices con la técnica de fluorescencia producida por VBC-Genomics con el sistema de CAP de Phadia para tres alérgenos de gramíneas, abedul y ácaros y encuentra una correlación mayor de 0.9 [13]. Lebrun [14] publicó los resultados empleando una técnica colorimétrica frente a alérgenos comunes detectando niveles de IgE específica menores que el punto de corte aceptado para la técnica convencional de 0.35Ku/l.

Más recientemente Wöhrl y cols. [15] han publicado los resultados comparando micromatrices con la técnica ISAC versión CRD-50 también de VBC-Genomics y UniCAP de Phadia demostrando que el diagnóstico de recombinantes era igual de sensible que la determinación de alérgenos completos mediante UniCAP para pacientes alérgicos a gramíneas, gato y abedul. Con ácaros aunque menos sensible seguía teniendo una sensibilidad y especificidad altas mientras que menos sensible para detectar a pacientes sensibles a la Artemisia.

Beneficios

Resumimos las ventajas en la Tabla 2.

Un primer beneficio es que permite analizar hasta varios cientos de alérgenos a la vez, con una mínima cantidad de muestra, únicamente 50 microlitros de suero y todo ello en un único análisis. En el caso de VCB-genomics en el momento actual son 103 alérgenos por chip (ver en Tabla 1 la lista de alérgenos). En definitiva, permite presentar a la IgE el mayor número posible de epítopes reconocibles. Esta técnica permite también analizar distintas fluorescencias, por lo tanto es posible medir en el mismo ensayo IgE específica e IgG por ejemplo.

La segunda ventaja es que facilita el diagnóstico basado en componentes [15-17], que permite determinar de una forma mucho más precisa qué alérgeno reconoce un paciente, ayuda a explicar reacciones cruzadas y resuelve enigmas como el de los pacientes con positividades a múltiples pólenes a los que nunca ha estado expuesto y aparentemente poco relacionados cuya explicación es la sensibilización a panalérgenos. Por los métodos tradicionales sería prácticamente imposible analizar

el panel de recombinantes y alérgenos naturales para presentarlo a un número significativo de epítopes, por otra parte las moléculas quizá no tengan la misma reactividad inmunológica que el alérgeno natural completo.

Otro gran beneficio de esta técnica es que facilita la realización de un screening a sujetos en los que no se pueden realizar pruebas cutáneas como es el caso de pacientes con dermatitis atópica grave, dermatografismo, niños o por la intensidad de la reacción.

Inmunoterapia

Un campo en que la aportación de esta técnica va a ser esencial es en el desarrollo de la composición de la inmunoterapia. Hasta ahora empleamos los extractos de alérgenos, que consisten en una mezcla de componentes alergénicos y no alergénicos, son difíciles de estandarizar y no se ajustan al perfil de sensibilización de cada paciente. Ya que en el momento actual la inmunoterapia puede contener alérgenos a los que el paciente no es sensible, o bien contener dosis insuficientes de los alérgenos relevantes para el paciente, o, lo que es más importante, pueden faltarle precisamente aquellos componentes a los que es más sensible. Finalmente, la inmunoterapia con extractos completos junto con el poder inmunogénico tiene poder alergénico que conlleva un riesgo de presentar reacciones de hipersensibilidad.

Hay trabajos que demuestran que la inmunoterapia dirigida frente a alérgenos recombinantes es eficaz y segura [18-21], permitiendo además formas especialmente hipoalergénicas con gran poder inmunogénico, por lo que se mejorará en un futuro cercano la calidad, la seguridad y la eficacia de la inmunoterapia [21]. Permitirá además investigar el mecanismo de la inmunoterapia.

Para esto hay que demostrar que tienen el mismo poder que los alérgenos naturales completos y que el panel de alérgenos recombinantes abarca todos los epítopes que reconocen las células B y células T. En el caso de las gramíneas se ha demostrado que inmunizando con un panel de cinco recombinantes (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5a, Phl p 5b) [22] o bien con ese panel más Phl p 6 [23] se reduce significativamente los síntomas y se induce una respuesta IgG específica frente a estos alérgenos muy intensa [24]. De forma similar se comportan los alérgenos de abedul.

Aunque con alérgenos de ácaros se obtiene un número mucho mayor de recombinantes, también se ha demostrado que combinando un panel de recombinantes se consigue inhibir de forma completa la unión de IgE al alérgeno completo [25], luego se demuestra que los alérgenos recombinantes pueden sustituir al extracto natural y que varios recombinantes son suficientes para el diagnóstico. En el caso de pacientes sensibles a ácaros ya permite conocer si están sensibilizados a grupo 1 y grupo 2 o si por lo contrario tienen sensibilización a tropomiosina lo que constituiría una contraindicación para la inmunoterapia con extractos de ácaros que contengan alérgenos de los grupo 1 y 2.

Incluso se ha demostrado una gran capacidad inmunogénica de híbridos de recombinantes de fuentes alergénicas no relacionadas [26].

Tabla 2. Ventajas de la técnica de micromatrices.

Simplicidad
Escaso volumen de muestra
Flexibilidad
Elevado rendimiento
Elevada capacidad de producción
Necesidad de escasa cantidad de alérgeno
Escalabilidad
Automatización

Otras aplicaciones de las micromatrices en Alergología

Recientemente se ha publicado una forma innovadora de aplicar la técnica de micromatrices en el diagnóstico de alergología [27]. Se basa en la técnica del test de activación de basófilos que consiste en analizar la expresión de marcadores de activación del basófilo como CD63 tras el estímulo con los diferentes alérgenos [28,29]. Los autores eliminan la IgE de basófilos humanos maduros y de una línea celular basofílica y los resensibilizan con suero de pacientes alérgicos a gramíneas, determinando entonces expresión de CD63 tras la incubación. Encuentran además que la línea celular responde de la misma forma que los basófilos adultos de sangre periférica. Son resultados que deben ser reproducidos y confirmados por otros grupos, pero es una muestra de la capacidad de desarrollo que va a tener los micromatrices.

La inmovilización de basófilos se consiguió por el desarrollo del micromatrices para el diagnóstico de tipaje de leucemias.

El concepto de esta técnica en que la presencia de IgE específica no implica necesariamente que sea capaz de puentear los receptores de IgE de basófilos y mastocitos y desencadenar síntomas, indica simplemente que está sensibilizado. Esta técnica cuantifica la activación del basófilo que un alérgeno determinado ha producido mediante la unión a la IgE específica presente en el suero del paciente estudiado, no sólo la presencia en suero de IgE específica.

Futuras aplicaciones

La primera aplicación será el descubrir nuevos pacientes que hasta ahora eran catalogados como no alérgicos ya que algunos alérgenos recombinantes no están presentes en los extractos alergénicos que venimos empleando.

En lo que se refiere a alergia alimentaria es especialmente importante ya que podría permitir desarrollar paneles que incluyan al menos el conjunto de proteínas al que estamos expuestos en una determinada dieta y a las que pacientes que provengan de un área geográfica estén más expuestos, esto se está desarrollando en otras dietas como la británica [30].

Finalmente, esta técnica puede permitir establecer valores predictivos para severidad de síntomas – como ya se está haciendo con las LTPs y la anafilaxia- o con la probabilidad de que una sensibilización alimentaria en niños desaparezca con el crecimiento. Y ofrecer una composición de inmunoterapia adecuada.

Idealmente un método diagnóstico *in vitro* (además de las condiciones de reproducibilidad y fiabilidad) debe ser mínimamente invasivo capaz de ofrecer al clínico una información extensa y aplicable.

Esta técnica debe validarse, y realizarse estudios con amplios cohortes de población analizando y correlacionando parámetros clínicos. Mientras tanto, no podemos dejarnos llevar por un entusiasmo ciego, pero tampoco desaprovechar la oportunidad de posicionar al especialista en alergología.

Bibliografía

- Alexander Francis, editor. The francis treatment of asthma. London: ; 1932.
- Kniker WT. Is the choice of allergy skin testing versus in vitro determination of specific IgE no longer a scientific issue? *Ann Allergy*. 1989 May;62(5):373-4.
- Thomas WR, Stewart GA, Simpson RJ, Chua KY, Plozza TM, Dilworth RJ, et al. Cloning and expression of DNA coding for the major house dust mite allergen der p 1 in *Escherichia coli*. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1988;85(1):127-9.
- Gonzalez-Buitrago JM, Ferreira L, Isidoro-García M, Sanz C, Lorente F, Davila I. Proteomic approaches for identifying new allergens and diagnosing allergic diseases. *Clin Chim Acta*. 2007 Oct;385(1-2):21-7.
- Kazemi-Shirazi L, Niederberger V, Linhart B, Lidholm J, Kraft D, Valenta R. Recombinant marker allergens: Diagnostic gatekeepers for the treatment of allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002 Apr;127(4):259-68.
- Chapman MD, Smith AM, Vailes LD, Arruda LK, Dhanaraj V, Pomes A. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Sep;106(3):409-18.
- Vrtala S. From allergen genes to new forms of allergy diagnosis and treatment. *Allergy*. 2008 Mar;63(3):299-309.
- Harwanegg C, Hiller R. Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: State-of-the-art and future development. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2006 Sep;38(7):232-6.
- Harwanegg C, Hiller R. Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: State-of-the-art and future development. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(12):1321-6.
- Ekins R, Chu F, Biggart E. Multispot, multianalyte, immunoassay. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1990;48(9):655-66.
- Wiltshire S, O'Malley S, Lambert J, Kukanskis K, Edgar D, Kingsmore SF, et al. Detection of multiple allergen-specific IgEs on microarrays by immunoassay with rolling circle amplification. *Clin Chem*. 2000 Dec;46(12):1990-3.
- Kim TE, Park SW, Cho NY, Choi SY, Yong TS, Nahm BH, et al. Quantitative measurement of serum allergen-specific IgE on protein chip. *Exp Mol Med*. 2002 May 31;34(2):152-8.
- Jahn-Schmid B, Harwanegg C, Hiller R, Bohle B, Ebner C, Scheiner O, et al. Allergen microarray: Comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. *Clin Exp Allergy*. 2003 Oct;33(10):1443-9.
- Lebrun SJ, Petchpud WN, Hui A, McLaughlin CS. Development of a sensitive, colorimetric microarray assay for allergen-responsive human IgE. *J Immunol Methods*. 2005 May;300(1-2):24-31.
- Wohrl S, Vigil K, Zehetmayer S, Hiller R, Jarisch R, Prinz M, et al. The performance of a component-based allergen-microarray in clinical practice. *Allergy*. 2006 May;61(5):633-9.
- Valenta R, Twaroch T, Swoboda I. Component-resolved diagnosis to optimize allergen-specific immunotherapy in the Mediterranean area. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2007;17 Suppl 1:36-40.
- Lidholm J, Ballmer-Weber BK, Mari A, Vieths S. Component-resolved diagnostics in food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2006 Jun;6(3):234-40.

18. Rodriguez R, Villalba M, Batanero E, Palomares O, Quiralte J, Salamanca G, et al. Olive pollen recombinant allergens: Value in diagnosis and immunotherapy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007;17 Suppl 1:4-10.
19. Zeiler T. Recombinant allergen fragments as candidate preparations for allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100(6):721.
20. Pace E. Hypoallergenic fragment of par j 2 increases functional expression of toll-like receptors in atopic children. *Allergy*. 2006;61(12):1459.
21. van Ree R, Chapman MD, Ferreira F, Vieths S, Bryan D, Cromwell O, et al. The CREATE project: Development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification. *Allergy*. 2008 Mar;63(3):310-26.
22. Gehlhar K. Investigation of different recombinant isoforms of grass group-V allergens (timothy grass pollen) isolated by low-stringency cDNA hybridization. *Eur J Biochem* 1997;15;222.
23. Vrtala S. Genetic engineering of the major timothy grass pollen allergen, pHL p 6, to reduce allergenic activity and preserve immunogenicity. *J Immunol*. 2007;179:1730.
24. Jutel M. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(3):608.
25. Weghofer M. Comparison of purified dermatophagoides pteronyssinus allergens and extract by two-dimensional immunoblotting and quantitative immunoglobulin E inhibitions. *ClinExp Allergy*. 2005;35(10):1384.
26. Linhart B. A hybrid molecule resembling the epitope spectrum of grass pollen for allergy vaccination. *The journal of allergy and clinical immunology*. 2005;115(5):1010.
27. Lin J, Renault N, Haas H, Schramm G, Vieths S, Vogel L, et al. A novel tool for the detection of allergic sensitization combining protein microarrays with human basophils. *Clin Exp Allergy*. 2007 12/33;37(12):1854-62.
28. Sanz ML, Maselli JP, Gamboa PM, Oehling A, Dieguez I, de Weck AL. Flow cytometric basophil activation test: A review. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2002;12(3):143-54.
29. Gamboa PM, Sanz ML, Caballero MR, Antepará I, Urrutia I, Jaurégui I, et al. Use of CD63 expression as a marker of in vitro basophil activation and leukotriene determination in metamizol allergic patients. *Allergy*. 2003 Apr;58(4):312-7.
30. Renault NK, Mirotti L, Alcocer MJ. Biotechnologies in new high-throughput food allergy tests: Why we need them. *Biotechnol Lett*. 2007 Mar;29(3):333-9.

■ Marta Ferrer

Department of Allergy and Clinical Immunology
Clínica Universidad de Navarra
Universidad de Navarra
Pío XII, 36
31008-Pamplona, Spain
Phone: +349 48255400
Fax: +34948296500
E-mail: mferrerp@unav.es