

M.C. Arilla, I. Ibarrola,
E. Eraso, A. Martínez,
J.A. Asturias

Departamento de Investigación
y Desarrollo. Bial-Arístegui.
Bilbao.

Original

Inmunoensayo para la cuantificación de Dac g 1 en extractos de polen

Fundamento: La estandarización de los extractos alergénicos usados en diagnóstico e inmunoterapia es fundamental, dada la variabilidad de los mismos, pero el protocolo tradicional tiene algunas limitaciones, por lo que la medida cuantitativa de los alérgenos principales puede ayudar a garantizar en calidad. Las gramíneas son una causa importante de reacciones alérgicas estacionales, y los alérgenos del grupo 1 y 5 son los de mayor relevancia. El objetivo de este estudio fue desarrollar una prueba de enzimoimmunoanálisis (ELISA) para la cuantificación de Dac g 1 en extractos de polen de *Dactylis glomerata*. **Métodos:** El ensayo se basó en el uso de los anticuerpos monoclonales específicos para Dac g 1: 7A8 y 9F6, para la captura, y 9A4 marcado con biotina para la detección. Dac g 1 se purificó mediante cromatografía a partir de extractos de *D. glomerata* y se utilizó para construir una curva de calibrado. El contenido de Dac g 1 en los extractos se calculó por interpolación en la parte lineal de la curva. **Resultados:** El método detecta concentraciones de Dac g 1 entre 62,5 y 500 ng/ml, con un coeficiente de variación del 14%, y un límite de detección de 31,25 ng/ml. El contenido medio de Dac g 1 en los 6 extractos de *D. glomerata* estudiados fue de 132 µg/ml. Se encontró una correlación significativa del contenido en Dac g 1 medido por ELISA con la potencia alérgica y con el contenido de Dac g 1 medido por densitometría. **Conclusiones:** Se describe un método sensible, específico y reproducible que resulta útil para una mejor estandarización de extractos de polen de gramíneas.

Palabras clave: Alérgeno. Cuantificación. Dac g 1. ELISA. Grupo 1 de gramíneas.

Immunoassay for quantification of Dac g 1 in pollen extracts

Background: An accurate standardization of allergenic extracts used for diagnosis and immunotherapy is fundamental. Current standardization methods have some limitations and therefore quantification of major allergens can help to guarantee the quality of allergenic extracts. Grass pollen is an important cause of allergic diseases all over the world and group 1 and 5 grass allergens are the most predominant allergens. The aim in this study was to develop a specific ELISA for Dac g 1 quantification of *Dactylis glomerata* extracts. **Methods:** Dac g 1 specific monoclonal antibodies were used for the assay: 7A8 and 9F6 as capture antibodies and biotinylated 9A4 for detection. Dac g 1 was purified from *D. glomerata* extracts by chromatographic procedures and used as standard at concentrations ranging from 15 to 1000 ng/ml. Dac g 1 content on the extracts

Correspondencia:
Dr. Juan A. Asturias
Bial-Arístegui, Departamento I+D
Alameda Urquijo, 27
48008 Bilbao
e-mail: la.lp@bial.es

Subvencionado por Bial-Arístegui, el Plan Nacional de I+D (Programa PROFIT, Ministerio de Ciencia y Tecnología, FIT-090000-2001-83) y el Programa INTEK (Departamento de Industria, Agricultura y Pesca, Gobierno Vasco, TEI-0017-2001).

was calculated from the dose-response curves of purified Dac g 1. **Results:** The assay measured Dac g 1 concentrations ranging from 62.5 to 500 ng/ml, with a coefficient of variation of 14%, and a detection limit of 31.25 ng/ml. Dac g 1 average content of the six *D. glomerata* extracts tested was 132 µg/ml. Significant correlation was found between Dac g 1 content measured by ELISA and the allergenic potency of the extracts, and between the Dac g 1 content measured by ELISA and by densitometry. **Conclusion:** A sensitive, specific and reproducible method for Dac g 1 quantification has been described and it will be helpful for accurate standardization of orchard pollen extracts.

Key words: Allergen. Quantification. Dac g 1. ELISA. Group 1 grass allergens.

Los extractos alérgicos usados habitualmente para diagnóstico e inmunoterapia están constituidos por una mezcla compleja de proteínas de las cuales sólo unas pocas tienen actividad alérgica. Por otro lado, debido a su origen biológico, la composición de los extractos puede variar dependiendo de la fuente natural de la que son obtenidos. Así, en el caso del polen pueden ser diferentes en función de las variedades o cultivares de la planta y de las condiciones ambientales en las que ésta se ha desarrollado. Adicionalmente, la composición del extracto puede estar influenciada por el método de procesamiento del mismo¹⁻³. La estandarización de los extractos alérgicos es, por tanto, fundamental para garantizar su calidad. Hasta ahora, el método habitual de estandarización se basa en pruebas cutáneas realizadas en pacientes alérgicos voluntarios empleando un extracto de referencia. Los posteriores lotes producidos se comparan con el de referencia usando métodos *in vitro* (como el EAST de inhibición), que utilizan una mezcla de sueros de pacientes alérgicos. Estos procedimientos presentan dos problemas principales: por un lado, implican el uso de sueros humanos, limitados y difíciles de estandarizar y por otro, tan sólo se puede determinar la potencia alérgica global del extracto, mientras que existen evidencias de que extractos con una potencia similar pueden tener diferentes concentraciones de los distintos alérgenos principales⁴. Actualmente, los anticuerpos monoclonales (AcMo) se utilizan ampliamente en el campo de la alergia, ya que permiten caracterizar los extractos alérgicos cuantificando el contenido de sus alérgenos principales; pueden servir, a su vez, para medir la concentración de un alérgeno en el ambiente y así establecer una relación entre la exposición alérgica ambiental y los sínto-

mas del paciente. Los AcMo presentan las ventajas de ser específicos para un único epítipo y de poder obtenerse en cantidades ilimitadas.

Los alérgenos procedentes de pólenes de gramíneas son una causa importante de reacciones alérgicas estacionales en todo el mundo. Aunque se han descrito 11 grupos alérgicos, tan sólo 8 se consideran como alérgenos principales⁵. No obstante, los grupos 1 y 5 son los predominantes, con una prevalencia de IgE mayor del 80%^{5,6}. Diversos grupos han desarrollado métodos para cuantificar alérgenos del grupo 5 en extractos de pólenes de gramíneas⁷⁻⁹, pero se han realizado pocos ensayos para la cuantificación de alérgenos del grupo 1¹⁰.

Recientemente hemos producido AcMo que reaccionan de manera específica con alérgenos del grupo 1 de pólenes de gramíneas. En este trabajo, tres de los AcMo que reconocen epítopos no solapados de este alérgeno se han utilizado en un inmunoensayo para determinar el contenido de Dac g 1 en extractos de polen de *Dactylis glomerata*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Extractos alérgicos y purificación de alérgenos

Los extractos alérgicos se obtuvieron a partir de polen de *D. glomerata*, una vez constatada su identidad y pureza, de acuerdo con el método previamente descrito¹¹. Dac g 1 se purificó a partir de extracto de polen de *D. glomerata* por una combinación de cromatografías de interacción hidrofóbica y tamizado molecular¹². Primeramente el extracto crudo se pasó a través de una columna Phenyl Sepharose HP 16/20 equilibrada con 10 mM de Tris-HCl pH 8, 1 M (NH₄)₂SO₄ y 1 mM EDTA empleando el sistema AKTA-prime™ (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido). La fracción unida se eluyó con agua, y se utilizó para los ensayos de suplementación de Dac g 1. La fracción no unida (que contenía Dac g 1) se concentró por ultrafiltración y se aplicó a una segunda columna de Superdex S-200 16/60 equilibrada con PBS. Las fracciones que contenían en Dac g 1 se mezclaron y concentraron. La determinación de proteína se realizó por el método Bradford utilizando el Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, California, EE.UU.) y albúmina bovina como estándar.

Producción y purificación de AcMo

Los AcMo 7A8, 9F6 y 9F4 que reconocían alérgenos del grupo 1 de extracto de pólenes de gramíneas fueron ob-

tenidos según se describió anteriormente¹⁰. Cada monoclonal reconocía epitopos no solapados como se demostró mediante ensayos de ELISA-inhibición¹⁰. Los AcMo fueron purificados a partir del sobrenadante de cultivo de sus respectivos hibridomas secretores mediante una columna de cromatografía HiTrap Protein G (Amersham Biosciences), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los AcMo purificados fueron marcados con biotina mediante el ECL™ protein biotinylation module (Amersham Biosciences).

SDS-PAGE e Inmunotransferencia

Las proteínas de los extractos de polen de *D. glomerata* y Dac g 1 purificado se separaron mediante geles de poliacrilamida al 12,5% en presencia de SDS según el método de Laemmli¹³. Las bandas proteicas se detectaron por tinción con Azul de Coomassie y se analizaron en un analizador de imagen GS-710 (Bio-Rad). La electrotransferencia se llevó a cabo según el método de Towbin et al¹⁴. Para ello, las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF Hybond-P (Amersham Biosciences). Tras el bloqueo con leche al 8,8% en TBS (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7,2), las membranas se incubaron durante 2 h a 37°C con los AcMo 7A8 (0,5 µg/ml), 9F6 (0,75 µg/ml) o 9A4 (1 µg/ml). Después de los lavados se incubó en condiciones similares con un suero antiinmunoglobulinas totales de ratón conjugadas a peroxidasa (Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri, EE UU). El revelado se realizó tras nuevos lavados mediante una solución que contenía como sustrato 4-cloro-1-naftol al 0,3% en metanol, H₂O₂ y TBS.

Cuantificación de Dac g 1 mediante doble sandwich ELISA

Para el ensayo se utilizaron placas de poliestireno (Nunc-Immuno™ 96 MicroWell™ Plates-MaxiSorp™, NUNC A/S, Roskilde, Dinamarca) que se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con 100 µl/pocillo de los AcMo 7A8 y 9F6, preparados a una concentración de 2,5 µg/ml en tampón bicarbonato 100 mM pH 9,6. A continuación las placas se bloquearon añadiendo 200 µl/pocillo de PBS-BSA 1%-Tween 20 0,05% (PBS-B-T) y se mantuvieron 1 h a 37°C. Posteriormente se añadieron 100 µl/pocillo de las diluciones de Dac g 1, comenzando con una concentración de 1 µg/ml en PBS-B-T, o de los extractos, partiendo en este caso de una concentración de 10 µg/ml, y se incubaron durante 1 h a 37°C. Tras tres lavados con 200 µl/pocillo de PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T), se añadieron 100 µl/pocillo del AcMo 9A4 marcado con biotina

(0,31 µg/ml en PBS-B-T) y las placas se incubaron de nuevo durante 1 h a 37°C. Después de tres nuevos lavados con PBS-T, se incubó 1 h a 37°C con 100 µl/pocillo de estreptavidina conjugada a peroxidasa (250 ng/ml en PBS-B-T) (Sigma). Tras tres lavados con PBS-T, se añadieron 200 µl/pocillo de una solución de *o*-fenilendiamina (Sigma-Fast™ *o*-phenylenediamine dihydrochloride Tablet Sets, Sigma) preparada según las instrucciones del fabricante y se mantuvieron las placas en oscuridad durante 30 min. A continuación la reacción se paró con 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 3M y la absorbancia se midió a 492 nm¹⁰.

Enzimoalergoabsorción de inhibición

La actividad alérgica de los extractos se determinó por enzimoalergoabsorción (EAST) de inhibición. Una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a polen de *D. glomerata* se preincubó con cantidades crecientes de los extractos a valorar y del extracto de referencia de *D. glomerata* y posteriormente se incubaron con el extracto de referencia acoplado a discos de celulosa. Los anticuerpos IgE unidos se detectaron mediante una prueba basada en un anticuerpo específico para IgE conjugado con peroxidasa de rábano, siguiendo las instrucciones del fabricante (Hytec-specific IgE EIA, Hycor Biomedical Inc., Carden Grove, California, EE UU). La actividad alérgica de los extractos se calculó comparando las concentraciones de los extractos necesarias para lograr el 50% de inhibición respecto al extracto de referencia.

Análisis estadístico

El límite de detección se calculó como la media más 2,33 veces la desviación estándar obtenida tras 30 medidas del valor cero. El coeficiente de variación (CV) se calculó como el cociente entre la desviación estándar y la media multiplicado por 100, no considerando significativos CVs menores del 20%. Las variaciones intraensayo se calculan midiendo la absorbancia de 20 pocillos a las concentraciones de 500, 250 y 125 ng/ml. Las variaciones interensayo se determinaron en 10 rectas estándar diferentes realizadas con diluciones seriadas de Dac g 1 en días diferentes.

RESULTADOS

Dac g 1 se purificó a partir de extractos de polen de *D. glomerata* por una combinación de cromatografías de interacción hidrofóbica y tamizado molecular. La compro-

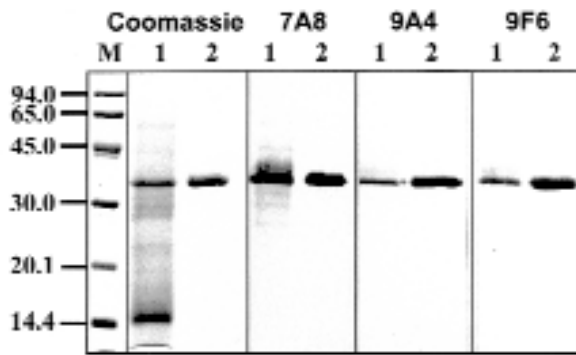


Fig. 1. Tinción de Coomassie (A) y reactividad de los AcMo 7A8 (0,5 $\mu\text{g/ml}$), 9A4 (1 $\mu\text{g/ml}$) y 9F6 (0,75 $\mu\text{g/ml}$) (B) frente a extracto de *Dactylis glomerata* (1) y Dac g 1 purificado (2).

bación de la purificación se realizó por SDS-PAGE e inmunotransferencia (fig. 1). La proteína purificada presentaba una única banda de 35 kDa en tinción de Coomassie y esa misma banda era detectada por los AcMo 7A8, 9A4 y 9F6, caracterizados por reconocer alérgenos del grupo 1 de pólenes de gramíneas. La preparación de Dac g 1 tenía una pureza del 95%, como se estimó por electroforesis y densitometría. El rendimiento de la purificación fue de 1 mg de proteína por cada 100 mg de extracto.

Los tres AcMo (7A8, 9A4, 9F6) eran de subtipo IgG1/ κ y se utilizaron en un doble *sandwich* ELISA para la cuantificación de Dac g 1. Los AcMo 7A8 y 9F6 se pegaron a la fase sólida y el AcMo 9A4 marcado con biotina se usó como detector. Como estándar se utilizó Dac g 1 purificado a concentraciones entre 15 y 1000 ng/ml (fig. 2). La correlación fue lineal en el intervalo entre 62,5 ng/ml y 500 ng/ml, con un límite de detección inferior a 31,25 ng/ml (Tabla I). El ensayo resultó reproducible y la media del coeficiente de variación interensayo en la parte lineal de la curva estándar fue del 13,9%. Los coeficientes de variación intraensayo a las concentraciones de 125 ng/ml, 250 ng/ml y 500 ng/ml fueron de 10,8, 8,4 y 4,2% respectivamente. La especificidad del ensayo se verificó entre diferentes tipos de gramíneas. Así, sólo se detectaban alérgenos del grupo 1 en extractos de polen de miembros

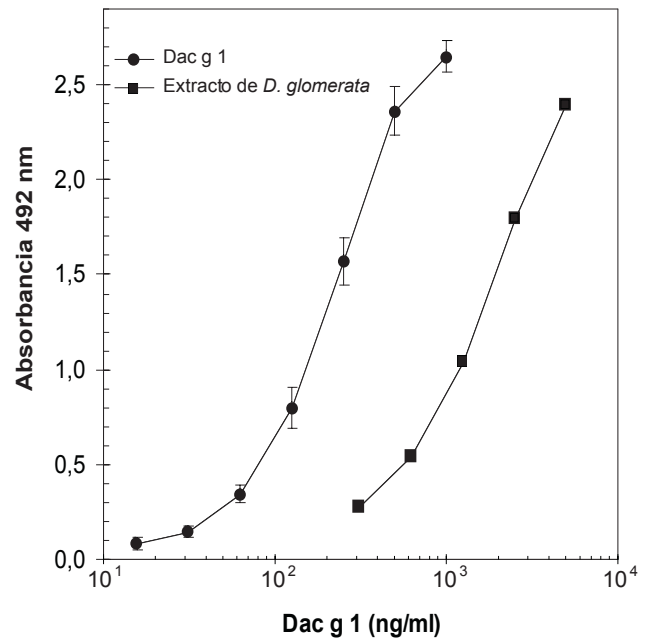


Fig. 2. Curvas de valoración estándar obtenidas en ELISA para Dac g 1 purificado y extracto de polen de *Dactylis glomerata*.

de la subfamilia Pooideae (*Lolium perenne*, *Holcus lanatus*, *Phleum pratense*, *Agrostis alba*, *Secale cereale* y *Poa pratensis*) pero no en la subfamilia Arundinoideae (*Phragmites communis*), como tampoco en miembros de la subfamilia Panicoideae (*Zea mays*) ni Chloridoideae (*Cynodon dactylon*). Iguales resultados negativos se obtuvieron con extractos alérgicos de polen de otras plantas que no fueran gramíneas (*Rumex acetosella*, *Plantago lanceolata*, *Parietaria judaica*, *Helianthus annuus* y *Olea europaea*).

Se determinó el contenido de Dac g 1 en diferentes lotes de extractos de *D. glomerata* producidos entre los años 1997 y 2001. Las curvas obtenidas con los extractos mostraban un buen paralelismo con la obtenida con el alérgeno purificado (fig. 2). El contenido medio de Dac g 1 fue 132 $\mu\text{g/ml}$ con un valor mínimo de 59 $\mu\text{g/ml}$ y un valor máximo de 217 $\mu\text{g/ml}$.

El patrón proteico que mostraban estos 5 extractos tras tinción de Coomassie se analizó por densitometría. Se

Tabla I. Análisis del ensayo de ELISA para la cuantificación de Dac g 1

Anticuerpos Captura	Monoclonales Detección	Parte lineal de la curva de valoración	Límite de detección	Coefficiente de Variación ($< 20\%$)
7A8 (2,5 $\mu\text{g/ml}$) 9F6 (2,5 $\mu\text{g/ml}$)	9A4 (0,31 $\mu\text{g/ml}$)	62,5-500 ng/ml n=10 $y=1,697 + 0,434x$ $r=0,994$	$< 31,25$ ng/ml	62,5-1000 ng/ml

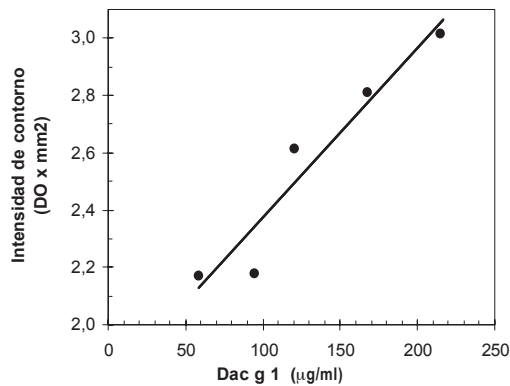


Fig. 3. Correlación entre el contenido de Dac g 1 ($\mu\text{g/ml}$), calculado mediante ELISA y la intensidad de contorno ($\text{DO} \times \text{mm}^2$), estimada por densitometría, en 5 extractos de polen de *Dactylis glomerata*.

estimó un valor numérico de Dac g 1 en cada extracto, denominado intensidad de contorno, que se definía como la densidad óptica por mm^2 . Estos resultados se compararon mediante regresión lineal con los valores de Dac g 1 calculados mediante el doble *sandwich* ELISA (fig. 3), y se obtuvo una correlación significativa ($r=0,959$; $p=0,01$). El pequeño número de extractos de polen de *D. glomerata* y su gran homogeneidad en contenido de Dac g 1 y potencia alergénica impedía estudiar correctamente la relación entre estos parámetros. Por esta razón, se obtuvieron extractos a los que se retiró mediante métodos cromatográficos el alérgeno Dac g 1; estos extractos se suplementaron posteriormente con cantidades conocidas de dicho alérgeno purificado y finalmente se determinó su potencia alergénica. La figura 4 muestra los resultados del estudio comparativo para establecer dicha correlación ($r=0,719$; $p<0,01$) entre el contenido de Dac g 1 y la potencia alergénica de los extractos obtenidos.

DISCUSIÓN

El doble *sandwich* ELISA es un tipo de inmunoanálisis que se usa frecuentemente para la caracterización de extractos alergénicos de muy variado origen^{7,8,15-24}. El método se basa en el uso de uno o varios AcMo para la captura del alérgeno, con lo que se evitan los posibles cambios conformacionales que pudieran ocurrir si el alérgeno se adsorbiera directamente a la fase sólida. Existe controversia sobre las limitaciones de esta técnica en la estandarización de los extractos²⁵, puesto que la especificidad de los AcMo puede ser excesiva y sólo reconocer ciertas variantes alergénicas. De este modo, el uso de más de un AcMo es aconsejable para no infravalorar el contenido de alérgenos

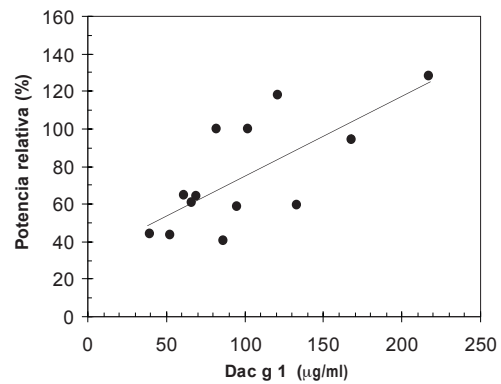


Fig. 4. Correlación entre el contenido de Dac g 1 ($\mu\text{g/ml}$), calculado mediante ELISA y la potencia relativa a los extractos, estimada por EAST de inhibición.

nos con varias isoformas. Por tanto, la siguiente generación de técnicas tiende a usar los denominados anticuerpos oligoclonales que son mezclas de AcMo²⁵. En este trabajo, se ha aplicado el doble *sandwich* ELISA a la cuantificación de Dac g 1 en extractos de polen de *D. glomerata*; se emplearon dos AcMo para la captura de la proteína y uno marcado con biotina para la detección. Los tres se seleccionaron por mostrar los valores de absorbancia más altos y reconocer epítopos no solapados frente a alérgenos del grupo 1 de la subfamilia Pooideae, cuyos miembros son las gramíneas más importantes implicadas en las alergias estacionales⁶.

Para la curva patrón se utilizó Dac g 1 purificado a partir de extractos de *D. glomerata*. Los grupos 1 y 5 son los principales grupos alergénicos de polen de gramíneas y se caracterizan por presentar similares parámetros bioquímicos tales como peso molecular y punto isoeléctrico, por lo que resultan difíciles de purificar por cromatografía de intercambio iónico o tamizado molecular. Tampoco otros métodos como la fase reversa resultan de utilidad, puesto que pueden alterar la conformación molecular del alérgeno, lo que influiría en su interacción con los anticuerpos del ensayo. Para la purificación de Dac g 1 se aplicó el método descrito en la purificación de Phl p 1¹². Este método estaba basado en las diferencias de hidrofobicidad entre los alérgenos del grupo 1 y 5 en presencia de 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. De esta forma, los alérgenos de los grupos 1, 2 y 3 se recogieron en la fracción no retenida tras pasar el extracto por una columna de Phenyl Sepharosa, mientras que el resto de las proteínas permanecían unidas a la columna. La diferencia de peso molecular entre los grupos 1 y 2-3 permitió la separación de los diferentes alérgenos mediante tamizado molecular.

Los principales criterios para definir un buen inmunoanálisis son una buena sensibilidad, especificidad y reproducibilidad. En este caso, la sensibilidad del método (31,25 ng/ml) fue similar a la encontrada en ensayos específicos para Phl p 4¹⁹ y Lol p 1¹⁰. Los CV intra e inter ensayo indicaron que el ELISA era reproducible en la parte lineal de la curva estándar, en el rango entre 62,5 y 500 ng/ml. Los análisis con extractos de polen de gramíneas y de otro tipo de plantas demostró que el análisis puede aplicarse específicamente a gramíneas de la subfamilia Pooideae. Esto se explica teniendo en cuenta que la identidad de la secuencia aminoacídica entre los alérgenos Lol p 1, Phl p 1, Hol l 1, Poa p 1 y Pha a 1 es mayor del 90%, mientras que entre estas proteínas y alérgenos del grupo 1 de *Cynodon dactylon*, incluido en la subfamilia Chloridoideae y *Oryza sativa* de la subfamilia Ehrhartoideae, es menor del 66%¹⁰. Sin embargo, con el fin de cuantificar de la forma más exacta posible el contenido de alérgenos del grupo 1, es necesario realizar curvas estándar diferentes para cada género de gramíneas y utilizar en cada caso su correspondiente alérgeno del grupo 1 purificado. Hechos similares ya se han descrito para la cuantificación de profilinas de distintos orígenes¹¹.

Las rectas obtenidas en la cuantificación de Dac g 1 en extractos de *D. glomerata* fueron paralelas a la curva patrón obtenida con Dac g 1, lo que confirma que no hubo alteración del alérgeno durante el proceso de purificación con la técnica empleada. Las diferencias en el contenido de Dac g 1 en los distintos extractos no guardaban relación con el origen de los mismos, puesto que los valores mínimos y máximos correspondían a extractos del mismo proveedor. No se pueden descartar, sin embargo, diferencias con respecto a las condiciones ambientales en las que se desarrolló cada lote de polen, puesto que los extractos analizados se procesaron en el período comprendido entre 1997 y 2001.

En inmunoterapia con alérgenos de gramíneas, gato, hongos y veneno hay evidencia de que una dosis de mantenimiento de 5-20 µg de alérgeno por inyección se asocia con una mejora significativa del historial sintomático del paciente^{26,27}. El contenido medio de Dac g 1 calculado en las dosis de mantenimiento de las vacunas fabricadas a partir de los lotes de extractos analizados es de 14,5 µg de alérgeno por inyección, valor que entra dentro de los límites indicados.

El cálculo del contenido de Dac g 1 en los extractos por densitometría mostró una buena correlación con el contenido estimado por el ELISA. Sin embargo, debido a

que los alérgenos del grupo 1 y 5 presentan similar peso molecular, no se puede asegurar que por este método el contorno calculado se corresponda únicamente con Dac g 1. En este estudio se ha observado también una buena correlación entre el contenido de Dac g 1 estimado por ELISA y la potencia alérgica global del extracto medido por EAST de inhibición. De todas formas, hay que tener en cuenta que la potencia alérgica de un extracto de polen de gramíneas no recae en una única proteína^{7,28,29}, ya que los alérgenos de los grupos 1 y 5 se reparten el 80% de la potencia alérgica de estos pólenes⁶. Además, las mezclas de sueros utilizados en el EAST de inhibición pueden reconocer otros alérgenos principales. Por estas razones, para una correcta estandarización biológica de extractos alérgicos es necesario cuantificar varios alérgenos principales. En el caso de gramíneas, el ensayo que aquí se describe, junto a los ensayos descritos para cuantificar alérgenos del grupo 5^{7,8}, permitirán realizar un preciso control de calidad de los extractos de gramíneas, y concretamente de *D. glomerata*.

En conclusión, el ensayo desarrollado es un método sensible, específico y reproducible de gran utilidad para la estandarización de extractos de polen de gramíneas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Martínez A, Asturias JA, Palacios R, Sanz ML, Sánchez G, Oehling A, et al. Identification of a 36 kDa olive-pollen allergen by in vitro and in vivo studies. *Allergy* 1999; 54: 584-592.
- Heymann PW, Chapman MD, Aalberse RC, Fox JW, Platts Mills TAE. Antigenic and structural analysis of group II allergens (Der f II and Der p II) from house dust mites (*Dermatophagoides* spp). *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 1055-1067.
- Ovsyannikova IG, Vailes LD, Li Y, Heymann PW, Chapman MD. Monoclonal antibodies to group II *Dermatophagoides* spp. allergens: murine immune response, epitope analysis, and development of a two-site ELISA. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 537-546.
- Van Ree R. A new start for allergen references and standardization based on purified (natural or recombinant) allergens and monoclonal and monospecific polyclonal antibodies. En: Kurth R, Hausteil D, ed. *Regulatory control and standardization of allergenic extracts*. Darmstadt: GIT Verlag, 2000; 87-92.
- Suphioglu C. What are the important allergens in grass pollen that are linked to human allergic disease? *Clin Allergy* 2000; 30: 1335-1341.
- Van Ree R, Van Leeuwen WA, Aalberse RC. How far can we simplify in vitro diagnostics for grass pollen allergy?: a study with 17 whole pollen extracts and purified natural and recombinant major allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 184-190.
- Fahlbusch B, Schlenvoigt G, Müller WD, Weber B, Jäger L. A two-site monoclonal antibody ELISA for the quantification of group V allergens in grass extracts. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 752-757.
- Ramírez J, Obispo TM, Duffort O, Carpizo JA, Chamorro MJ, Barber D, et al. Group 5 determination in Pooideae grass pollen extracts

- by monoclonal antibody-based ELISA. Correlation with biologic activity. *Allergy* 1997; 52: 806-813.
9. Schäppi GF, Taylor PE, Pain MCF, Cameron PA, Dent AW, Staff IA, et al. Concentrations of major grass group 5 allergens in pollen grains and atmospheric particles: implications for hay fever and allergic asthma sufferers sensitized to grass pollen allergens. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 633-641.
10. Arilla MC, Ibarrola I, Eraso E, Aguirre M, Martínez A, Asturias JA. Quantification in mass units of group 1 grass allergens by a monoclonal antibody-based sandwich ELISA. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 1271-1278.
11. Asturias JA, Arilla MC, Aguirre M, Gómez-Bayón N, Martínez A, Palacios R, et al. Quantification of profilins by a monoclonal antibody-based sandwich ELISA. *J Immunol Meth* 1999; 229: 61-71.
12. Suck R, Hagen S, Cromwell O, Fiebig H. Rapid and efficient purification of *Phleum pratense* major allergens Phl p 1 and group Phl p 2/3 using a two-step procedure. *J Immunol Meth* 1999; 229: 73-80.
13. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
14. Towbin H, Staehelin I, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4354.
15. Chapman MD, Heymann PW, Wilkins SR, Brown MJ, Platts-Mills TAE. Monoclonal immunoassays for major dust mite (*Dermaptophagoides*) allergens, Der p 1 and Der f 1, and quantitative analysis of the allergen content of mite and house dust extracts. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80: 184-194.
16. Chapman MD, Aalberse RC, Brown MJ, Platts-Mills TAE. Monoclonal antibodies to the major feline allergen Fel d 1. II. Single step affinity purification of Fel d 1, N-terminal sequence analysis, and development of a sensitive two-site immunoassay to assess Fel d 1 exposure. *J Immunol* 1988; 140: 812-818.
17. Pollart SM, Smith TF, Morris EC, Gelber LE, Platts-Mills TAE, Chapman MD. Environmental exposure to cockroach allergens: Analysis with monoclonal antibody-based enzyme immunoassays. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 505-510.
18. González R, Duffort O, Calabozo B, Barber D, Carreira J, Polo F. Monoclonal antibody-based method to quantify Gly m 1. Its application to assess environmental exposure to soybean dust. *Allergy* 2000; 55: 59-64.
19. Fahlbusch B, Müller WD, Rudeschko O, Jäger L, Cromwell O, Fiebig H. Detection and quantification of group 4 allergens in grass pollen extracts using monoclonal antibodies. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 799-807.
20. Calabozo B, Duffort O, Carpizo JA, Barber D, Polo F. Monoclonal antibodies against the major allergen of *Plantago lanceolata* pollen, Pla 1 1: affinity chromatography purification of the allergen and development of an ELISA method for Pla 1 1 measurement. *Allergy* 2001; 56: 429-435.
21. Ramírez J, Carpizo JA, Ipsen H, Carreira J, Lombardero M. Quantification in mass units of Bet v 1, the main allergen of *Betula verrucosa* pollen, by a monoclonal antibody based ELISA. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 926-931.
22. Vailes L, Sridhara S, Cromwell O, Weber B, Breitenbach M, Chapman M. Quantitation of the major fungal allergens, Alt a 1 and Asp f 1, in commercial allergenic products. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 641-646.
23. Raulf-Heimsoth M, Sander I, Chen Z, Borowitzki G, Diewald K, van Kampen V, et al. Development of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for detection of the latex allergen Hev b 1. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123: 236-241.
24. Jeoung BJ, Reese G, Hauck P, Oliver JB, Daul CB, Lehrer SB. Quantification of the major brown shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin) by a monoclonal antibody-based sandwich ELISA. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 229-234.
25. Aalberse RC, van Ree R. Monoclonal antibody assays for allergens: pick your antibodies with care! *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 625-626.
26. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *Allergy* 1998; 53: 1-42.
27. Durham SR, Walker SM, Varga EM, Jacobson MR, O'Brien F, Noble W, et al. Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med* 1999; 341: 468-475.
28. Van Ree R, Aalbers M, Kea O, de la Calle FMM, Sempere-Ortells JM, Villalba M, et al. A sensitive monoclonal antibody sandwich ELISA for the measurement of the major olive pollen allergen Ole e 1. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 122: 224-228.
29. Boluda L, Sastre J, Casanovas M, Fernández-Caldas E. Determination of Ole e 1 by enzyme immunoassay and scanning densitometry. Validation by skin-prick testing. *J Immunol Methods* 1999; 223: 17-26.