Agència
de Gestió d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca

Memòria justificativa de recerca de les convocatòries BCC, BE, BP, CTP-AIRE, DEBEQ, FI, FI-ICIP, INEFC i PIV

La memòria justificativa consta de les dues parts que venen a continuació:
1.- Dades bàsiques i resums
2.- Memòria del treball (informe científic)

Tots els camps són obligatoris

1.- Dades bàsiques i resums

Nom de la convocatòria
BP

Llegenda per a les convocatòries:

BCC	Convocatòria de beques per a joves membres de comunitats catalanes a l'exterior
BDH	Beques i ajuts postdoctorals del Programa DGR-Henkel KGaA
BE	Beques per a estades per a la recerca fora de Catalunya
BP	Convocatòria d'ajuts postdoctorals dins del programa Beatriu de Pinós
CTP-AIRE	Ajuts per accions de cooperació en el marc de la comunitat de treball dels Pirineus. Ajuts de mobilitat de personal investigador.
DEBEQ (Modalitat A3)	Beques de Cooperació Internacional i Desenvolupament
FI	Beques predoctorals per a la formació de personal investigador
FI-ICIP	Beques i ajuts per a l'etapa de formació i de recerca de personal investigador novell en els àmbits d'interès de l'Institut Català Internacional per la Pau
INEFC	Beques predoctorals i de col·laboració, dins de l'àmbit de l'educació física i l'esport i les ciències aplicades a l'esport
PIV	Beques de recerca per a professors i investigadors visitants a Catalunya

Títol del projecte: ha de sintetitzar la temàtica científica del vostre document.
Desarrollo y validación de ensayos rápidos para la detección de aeroalérgenos ocupacionales/ambientales: soja y proteínas séricas de paloma.

Dades de l'investigador o beneficiari

Nom: Susana
Cognoms: Gómez Ollés

Correu electrònic
susana.go@vhir.org

Dades del centre d'origen

Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron
Laboratori de Recerca en Pneumologia

Agència
de Gestió d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca

Número d'expedient
2009BP-B00098

Paraules clau: cal que esmenteu cinc conceptes que defineixin el contingut de la vostra memòria.
Ensayo rápido, inmunocromatografía de flujo lateral, alérgenos, medidas ambientales, prevención

Data de presentació de la justificació
15/04/2013

SUSANA GÓMEZ OLLÉS
Nom i cognoms i signatura
del/de la investigador/a

Vist i plau del/de la responsable de la
sol·licitud

Generalitat de Catalunya
Departament d'Economia
i Coneixement

Resum del projecte: cal adjuntar dos resums del document, l'un en anglès i l'altre en la llengua del document, on s'esmenti la durada de l'acció

Resum en la llengua del projecte (màxim 300 paraules)
Tanto el asma ocupacional como la neumonitis por hipersensibilidad, como es el pulmón del cuidador de aves, son patologías respiratorias que se pueden prevenir o disminuir su aparición mediante la evitación de la fuente antigénica. Para poder actuar de forma preventiva es de utilidad el disponer de ensayos rápidos que sean capaces de estimar la presencia de alérgeno de forma inmediata. En el marco de este proyecto de dos años de duración tenemos por objeto el desarrollar y estandarizar dos métodos rápidos, inmunocromatográficos, para la determinación de alérgenos de soja y de proteínas séricas de paloma. Alérgenos que han sido seleccionados por su importancia en nuestro medio como agentes causales de asma y neumonitis por hipersensibilidad, respectivamente. También tenemos por objeto determinar la carga de alérgeno de soja en la fracción de partículas menores de 10 micrómetros (PM10) en los alrededores del puerto de Barcelona y compararla con los niveles en los filtros de partículas suspendidas totales (TSP). Como pasos previos al desarrollo de los ensayos rápidos se han producido anticuerpos específicos frente al extracto de cáscara de soja de bajo peso molecular y frente al suero de paloma, se ha desarrollado un ELISA tipo sándwich para cada alérgeno y parte de los anticuerpos se ha conjugado con oro coloidal. El ensayo inmunocromatográfico para la soja presenta un límite de detección de 6,25ng/ml y ha sido validado mediante el análisis de 119 muestras ambientales, presentado una elevada especificidad y sensibilidad. El ensayo inmunocromatográfico para la determinación de antígenos séricos de paloma requiere ser validado. Mediante un método de ELISA de inhibición se han determinado los niveles de alérgeno de soja en filtros PM10 y TSP. A pesar de la buena correlación entre los niveles de alérgeno en ambos filtros, se observó una amplia variación en la proporción PM10/TSP entre días.

Resum en anglès (màxim 300 paraules)
Allergen avoidance can help prevent or reduce occupational asthma and hypersensitivity pneumonitis such as bird breeder's lung. In order to prevent these lung diseases from occurring it is helpful to have rapid tests able to estimate the presence of allergen immediately. During this two years project, we aim to develop and standardize two rapid immunochromatographic tests to determine soy allergens and pigeon serum antigens. Those allergens have been chosen for their importance in our environment as causative agents of asthma or hypersensitivity pneumonitis, respectively. We also aim to determine the burden of soybean allergen in particles smaller than 10 micrometers (PM10) in the vicinity of the port of Barcelona and compare those levels with levels in the filters of total suspended particles (TSP). As a previous step for the development of both immunochromatographic tests, specific antibodies were produced against soybean hull low molecular weight extract and pigeon serum, a sandwich ELISA was developed for each allergen and part of the antibodies was conjugated to colloidal gold. The limit of detection of the immunochromatographic test to determine soy allergens was 6.25ng/ml and the test was validated by analyzing 119 environmental samples and showed high sensitivity and specificity. The immunochromatographic test for determining pigeon serum antigens require validation. Soy allergen levels in PM10 and TSP filters were analysed by an inhibition ELISA method.

Resum en anglès (màxim 300 paraules) – continuació -.

Despite the good correlation between the levels of allergen in both filters, there was a wide variation in the proportion PM10/TSP between days.

2.- Memòria del treball (informe científic sense limitació de paraules). Pot incloure altres fitxers de qualsevol mena, no més grans de 10 MB cadascun d'ells.

SUMARIO

2.1.- INTRODUCCIÓN

2.2.- OBJETIVOS

2.3.- METODOLOGÍA Y RESULTADOS

2.3.1.- Metodología objetivo 1

2.3.2.- Resultados objetivo 1

2.3.3.- Metodología objetivo 2

2.3.4.- Resultados objetivo 2

2.3.5.- Metodología objetivo 3

2.3.6.- Resultados objetivo 3

2.4.- CONCLUSIONES

2.5.- BIBLIOGRAFÍA

2.6.- PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA AYUDA

2.7.- MODIFICACIONES DEL PROYECTO ORIGINAL Y SU JUSTIFICACIÓN

2.1.- INTRODUCCIÓN

En los países industrializados el asma ocupacional (AO) es la primera causa de patología respiratoria de origen ocupacional (1). Esta enfermedad tiene unas importantes consecuencias socioeconómicas y de salud pública, siendo la prevención la herramienta principal para evitar y disminuir su aparición.

Actualmente existen más de 350 sustancias responsables de causar AO (2). A pesar de que todavía se desconoce la relación dosis-respuesta para la mayoría de alergenos ocupacionales, es bien conocida la relación entre el nivel de exposición a algunos de ellos (harinas, enzimas, proteínas de animales de laboratorio, sales de platino y ácidos anhídridos) y el desarrollo de sensibilización y/o síntomas respiratorios.

Otra patología respiratoria de gran importancia por su gravedad y que también es causada por la inhalación de antígenos y por la respuesta inflamatoria de tipo inmunológico a estos previa sensibilización es la Neumonitis por hipersensibilidad (NH) (3). Aunque son muchas las NH descritas, quizás las dos más frecuentes correspondan al pulmón del granjero y al pulmón del cuidador de aves. También pudiendo ser pues una patología de origen laboral. Sin embargo, a diferencia del asma, la NH, como la mayoría de las enfermedades intersticiales pulmonares, es una entidad poco frecuente (4-6). La progresión de la enfermedad conduce a insuficiencia respiratoria crónica como consecuencia del desarrollo de fibrosis pulmonar establecida o en algunos casos, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), lo que confiere un estatus de potencial gravedad a esta entidad (4,7). La presentación clínica puede ser aguda, subaguda o crónica, dependiendo, entre otros factores, de la intensidad y la frecuencia de la exposición antigénica. La forma aguda y subaguda, generalmente responden al tratamiento, mientras que las formas crónicas, en el momento del diagnóstico, generalmente se encuentran ya en un punto sin retorno, con una progresión irreversible hacia la desestructuración del parénquima pulmonar y desarrollo de fibrosis o enfisema (3,8). Tratándose de una enfermedad prácticamente incurable en su forma crónica, prevenir la progresión de esta actuando en la evitación de la exposición es crucial.

Un factor importante para la implantación, control y mantenimiento de límites de exposición a alergenos es disponer de ensayos bien estandarizados. En la actualidad se dispone para alguno de los alergenos, de ensayos altamente sensibles, pero se trata de métodos laboriosos, que requieren de personal especializado y que consumen tiempo, lo que imposibilita la obtención rápida de resultados (9). Estos ensayos no son útiles para la práctica de higiene ocupacional, donde se requiere que los resultados sean rápidos, sino inmediatos, para que informen en tiempo real de la presencia del alérgeno ocupacional. De esta limitación se deriva la necesidad de poseer de ensayos rápidos que sean capaces de estimar la presencia y los niveles del alérgeno ocupacional de forma inmediata para poder actuar de forma preventiva y evitar que los trabajadores se expongan a altas dosis de alérgeno.

El fundamento de estos ensayos rápidos consiste en la reacción del extracto con su anticuerpo específico inmovilizado en una membrana. Estos métodos de inmunocromatografía son rápidos, baratos, semicuantitativos, sencillos, y no requieren de personal especializado. Son sistemas de cribaje caracterizados por una elevada sensibilidad y especificidad y muy bien desarrollados para la detección rápida de diversas sustancias (10). El desarrollo de estos ensayos rápidos para la detección de alergenos ocupacionales permitiría determinar la presencia de alergenos en el lugar de trabajo "in situ" pudiendo llegar a establecerse como una herramienta de gran utilidad para los estudios de higiene ocupacional. Hasta la actualidad, según nuestro conocimiento, este tipo de dispositivo solo se ha desarrollado, en cuanto a la deteccion de alergenos ocupacionales se refiere, para la detección del enzima alfa-amilasa (11,12) utilizado en la panificación y para la detección de las proteínas de la orina de rata y ratón (13).

Por ello, el objetivo del presente estudio es el desarrollo de métodos rápidos (inmunocromatográficos) para la monitorización de dos aeroalergenos ocupacionales: la soja y las proteínas séricas de paloma. Aunque en el caso de ambos antígenos, se pueden encontrar tanto en el ambiente laboral como en el medioambiente, siendo en los dos ámbitos su evitación de importancia. En relación a la soja, Barcelona es una ciudad con una problemática especial de asma ocasionada por esta leguminosa. En esta ciudad se han producido diversas epidemias de asma por soja (14), lo que ha condicionado que se realicen mediciones ambientales diarias de los aeroalergenos de soja para controlar la dispersión de los mismos a la atmósfera y determinar la eficacia de las medidas de seguridad aplicadas en la descarga (15). Por ello el desarrollo de ensayos rápidos en este caso será de especial utilidad en la ciudad ya que permitiría disponer de resultados en tiempo real. Esto haría posible la adopción de medidas inmediatas en el caso de obtener niveles atmosféricos de alérgeno de soja elevados.

A la hora de mejorar el control de la exposición a aeroalérgenos también es importante evaluar de la fracción de polvo en suspensión que porcentage de alérgeno se encuentra en partículas de diámetro inferior a 10μm. Hay que tener en cuenta que el diámetro aerodinamico de las partículas biologícas determina su habilidad para penetrar en el sistema respiratorio humano, por lo que puede tener un impacto en su toxicidad o sus efectos nocivos en la salud (16).

En cuanto a las proteínas séricas de paloma, es uno de los antígenos causales de neumonitis por hipersensibilidad, y en concreto, del pulmón del cuidador de aves. El pulmón del cuidador de aves se da sobre todo en las personas aficionadas a la colombofilia y afecta entre el 4 i el 8% de estos cuidadores, pero también puede afectar al cuidador de cualquier otra ave, desde loros hasta periquitos, canarios, tórtolas, etc. (17). Se ha descrito que esta enfermedad incluso puede adquirirse fuera del domicilio o de la ocupación tras una carga antigénica no masiva pero persistente. Como fue el caso de una paciente que residia cerca de un parque público y desarrollo neumonitis por la inhalación de antígenos procedentes de los excrementos de los estorninos (18). Es en estos últimos casos dónde la determinación ambiental resulta de gran importancia para establecer la causalidad y por la implicación judicial de la misma. El poseer de un método rápido que permita determinar la presencia de alérgenos de proteinas séricas de paloma por encima de un nivel umbral, permitiría a los colombófilos poder determinar el estado de sus palomares, así como la eficacia de posibles medidas correctoras adoptadas. Este método supondría para aquellos pacientes con NH que sospechan de una posible exposición a antigenos aviares en su domicilio o lugar de trabajo poder corroborar o no dicha sospecha.

2.2.- OBJETIVOS

1.- Desarrollar y estandarizar un método rápido, inmunocromatográfico, para la determinación de la presencia de alérgenos de soja.

2.- Desarrollar y estandarizar un método rápido, inmunocromatográfico, para la determinación de la presencia de proteínas séricas de paloma.

3.- Determinar la carga de alérgeno de soja en la fracción de partículas menores de 10 micrómetros en el aire de los alrededores de las empresas que descargan soja en el puerto de Barcelona y compararla con los niveles en los filtros de partículas suspendidas totales.

2.3.- METODOLOGÍA Y RESULTADOS

Objetivo 1: ***Desarrollar y estandarizar un método rápido, inmunocromatográfico, para la determinación de la presencia de alérgenos de soja.***

2.3.1.- METODOLOGÍA OBJETIVO 1

Extracto antigénico
Se ha obtenido un extracto de cáscara de soja de bajo peso molecular (ECSBPM) mediante dos procesos cromatográficos de intercambio iónico, realizados con columnas DEAE-celulosa y CM-celulosa. El extracto antigénico se ha realizado a partir de cáscara de soja ya que estudios previos inmunológicos revelaron que el suero de los pacientes de asma por soja epidémica de la ciudad de Barcelona reaccionaban principalmente frente a un alérgeno de bajo peso molecular, Gly m 1, presente en la cáscara del grano de soja (19). A continuación se valoró la concentración de proteínas del extracto mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) y se procedió a su análisis mediante SDS-page utilizando el sistema NuPage de Invitrogen.

Producción anticuerpo policlonal
El extracto de cáscara de soja de bajo peso molecular (ECSBPM) se conjugo con Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) con el fin de estimular la respuesta inmunológica. Con el conjugado se inmunizaron dos conejos machos New Zealand. Para la realización de la primera inmunización el extracto antigénico se mezclo a partes iguales con adyuvante completo de Freund y se injectó subcutáneamente. Se realizaron 3 recordatorios a intervalos de 4 semanas. El antisuero policlonal obtenido en cada conejo fue purificado por cromatografía de afinidad con proteína A (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) y desalado con una columna de excelulosa (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) por separado. Los dos anticuerpos purificados se conservaron a -80ºC.

Marcaje anticuerpo policlonal
Parte de los anticuerpos policlonales obtenidos han sido marcados para su utilización como anticuerpos de detección. Para su uso como anticuerpo detector en el ELISA tipo sandwich se marcó con biotina mediante el kit (EZ link® Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit, Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) y se valoró la biotinización mediante ELISA.

Para el desarrollo del método rápido el anticuerpo policlonal se marcó con oro coloidal de 40nm (British BioCell Internationa, Cardiff, UK) mediante un método pasivo de conjugación. Después de la incubación del anticuerpo policlonal con las partículas de oro coloidal, este fue bloqueado con albúmina bovina sérica. El conjugado resultante fue concentrado y se midió la concentración de partículas mediante la lectura de la densidad óptica a 520nm siendo de 10. El conjugado se caracterizó mediante microscopía electrónica de transmisión.

Desarrollo del ELISA tipo sandwich
Como etapa previa al desarrollo de los métodos rápidos, hemos desarrollado el ensayo de captura también denominado ELISA tipo sandwich. El anticuerpo policlonal anti-ECSBPM se acopló a la placa de microtitulación (Costar, Cambridge, MA, USA) que posteriormente fue bloqueada con PBS/1% BSA/0,05% Tween-20. Tras 3 lavados con PBS/0,1% tween-20 los pocillos son incubados con la curva patrón que contiene de 8,25 a 0,06ng/ml de ECSBPM o bien con las muestras y controles internos. Tras previos lavados se incuba con el anticuerpo policlonal anti-ECSBPM marcado con biotina. Tras 3 lavados se adiciona la estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (Biosource) con el fin de amplificar la señal. Se revela la reacción mediante la adición de sustrato TMB y peróxido de hidrógeno y tras 20 minutos se para la reacción mediante la adición de ácido sulfúrico 2M. La absorbancia se mide a 450nm en un espectrofotómetro (Titertek Multiskan Plus MKII). Los resultados se calculan con el programa Genesis software (version 2.16, Life Sciences Ltd, UK) y se expresan en ng/ml frente al estándar de referencia correspondiente.

Evaluación del ELISA tipo sandwich
Se evaluó la sensibilidad, precisión y especificidad del ELISA desarrollado.

Sensibilidad: El límite inferior de detección se definio como la concentración del último punto de la curva estandard, teniendo que ser la DO de este punto 0,05 unidades superior a la DO del blanco. El límite inferior de cuantificación se definió com la concentración que corresponde en función de la ecuación de la curva patrón a la DO del último punto de la curva substrayendole la DO del blanco y adicionandole 0,2 unidades. El límite superior de cuantificación fue definido como la concentración que en función de la curva patrón se corresponde con el 80% de la DO del punto más concentrado de la curva patrón substrayendole la DO del blanco. Bajo estas premisas las determinaciones se limitan a la zona log-lineal de la curva.

Precisión: El coeficiente de variación (CV) se calculó mediante el análisis de dos controles internos de concentraciones 1 y 0,5 ng/ml. Para el CV intraensayo se analizarón en un mismo ensayo 30 replicados de cada control. Con el fin de determinar el CV interensayo se analizarón los 2 controles por duplicado en 30 ensayos diferentes durante un periodo de 3 meses y medio.

Especificidad: Para el estudio de la reactividad cruzada se han realizado extractos antigénicos de cáscara de cacahuete, grano de cacahuete, maíz, maíz salvaje, vaina judía, grano judía, guisante, guisante salvaje y trigo. Brevemente, se han macerado las materias primas con tampón bicarbonato amónico, pH 7,9, se han dializado mediante una membrana de tamaño de poro 3,5 kDa. Los extractos obtenidos han sido liofilizados y se ha valorado su contenido proteico mediante BCA. La reactividad cruzada se ha determinado mediante ELISA.

Ensayo de inmunocromatografía:
Se ha desarrollado un ensayo inmunocromatográfico para la determinación de la presencia de alérgenos de soja. En primer lugar se inmovilizó el anticuerpo policlonal anti-ECSBPM a razón de 1200ng/tira en la membrana de nitrocelulosa (Unisart CN95 19910 Sartorius stedim Biotech, Goettingen, Germany) (línea T). A 0,3cm por encima de la línea T (ver Fig. 1A) se inmovilizó un anticuerpo de cabra anti-conejo (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA) a razón de 600ng/tira (línea C). Esta línea C es la línea de control que sirve como control de calidad e indica que la muestra se ha aplicado y ha migrado por la membrana correctamente. La membrana se seco durante 1 hora a 37ºC. A continuación se montaron las tiras inmunocromatográficas usando la membrana anterior tal y como se indica en la figura 1A.

Se preparó una curva patrón de diluciones seriadas al medio del ECSBPM mediante la cual se determinó la sensibilidad del ensayo (Fig. 2) y se dispensaron 20µl/pocillo de las diferentes concentraciones de ECSBPM en una placa de microtitulación. A cada pocillo se añadieron 20µl de anticuerpo policlonal de conejo frente a ECSBPM conjugado con oro coloidal con una DO de 2 y se sumergió la tira tal y como se muestra en la figura 1B. El complejo ECSBPM -anticuerpo policlonal marcado con oro coloidal difunde por capilaridad a lo largo de la membrana (Fig. 1C). Se dejó desarrollar el color y se valoró el resultado tras 30 minutos. La intensidad de las bandas se densitometró mediante el programa informático Image J (NIH) (Fig. 2).

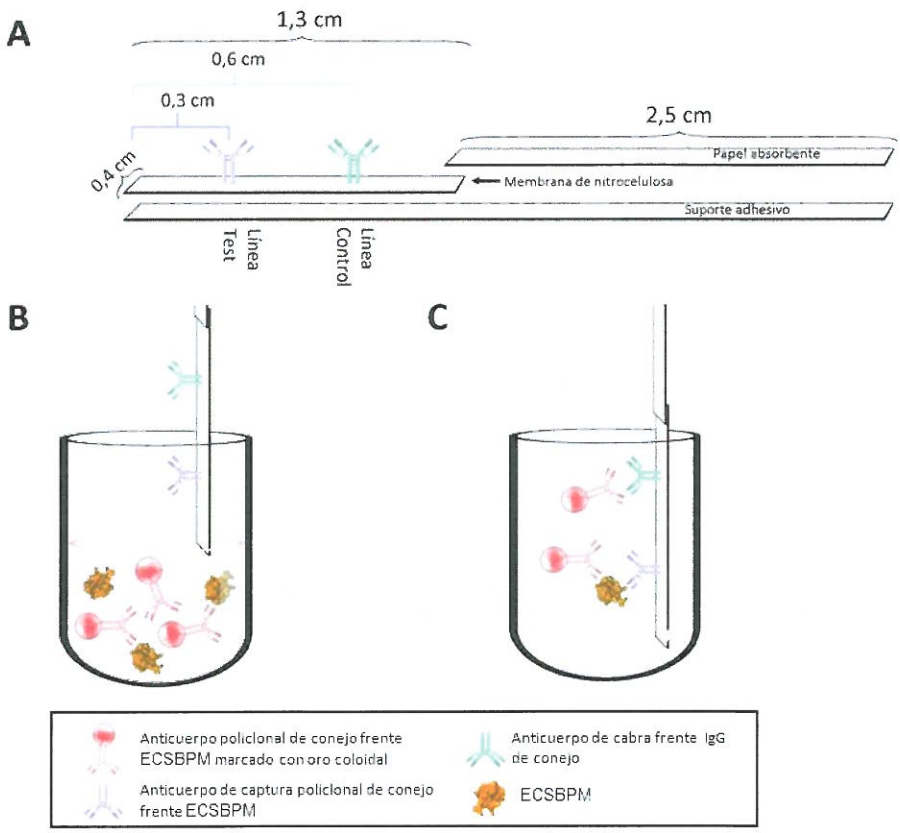

Fig 1. Esquema del ensayo inmunocromatográfico desarrollado: 1A) Esquema de los componentes de la tira y su disposición; 1B) Inmersión en el pocillo de la microplaca de la tira inmunocromatográfica desarrollada y 1C) Unión de los complejos ECSBPM-anticuerpo policlonal marcado con oro coloidal en la línea T y del anticuerpo policlonal marcado con oro coloidal libre en la línea C.

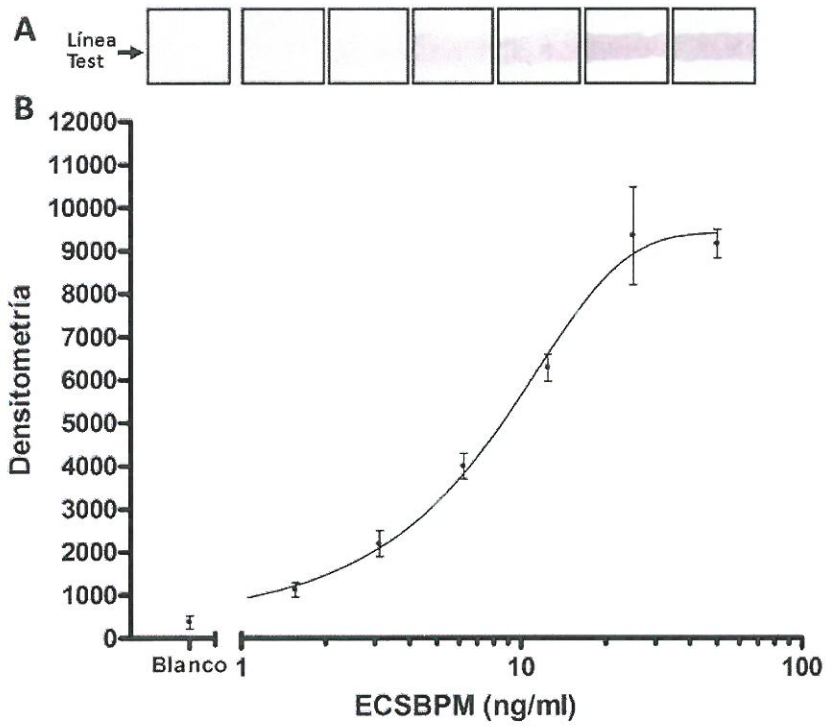

Fig 2. Curva estándar del ensayo inmunocromatográfico mediante la cual se determinó la sensibilidad del ensayo: 2A) Imagen de la banda T de las tiras inmunocromatográficas. Las imagenes se muestran alineadas con la concentración a la que corresponden en el gráfico 2B. 2B) Gráfico de los resultados obtenidos mediante densitometría a las concentraciones indicadas.

Validación del ensayo de inmunocromatografía

Muestreo: Para la validación del método se han seleccionado 119 filtros de los que se recogen diariamente en la ciudad de Barcelona para valorar los niveles ambientales de alérgenos de soja (15) con un amplio rango de concentraciones de aeroalérgenos de soja. Estos filtros se han recogido con un captador automático de alto volumen (CAV-A/HF, MCV, SA Barcelona, España) situado a 500 m de la zona de descarga de dicha leguminosa.

Elución: Los filtros han sido eluidos con 5ml de tampón PBS/0,2%BSA/0,5%Tween-20 durante 16h. Los eluidos se han conservado a -20ºC para su posterior análisis.

Análisis de las muestras: Las 119 muestras obtenidas se han analizado mediante el ELISA tipo sandwich estandarizado y mediante el ensayo de inmunocromatografía. Para la vigilancia de los niveles de aeroalérgenos de soja en la ciudad de Barcelona mediante el método de ELISA tipo sándwich hay establecidos unos niveles guía superior (NGS) e inferior (NGI) de 19ng/m^3 y 6ng/m^3, respectivamente. Estos valores corresponden para un volumen medio de aire de 165m^3 a 627ng/ml y 198ng/ml, respectivamente. Las muestras se analizaron a una dilución 1:100 en tampón (PBS/1% BSA/0,5% Tween-20). La intensidad de las bandas se densitometró mediante el programa informático Image J (NIH). Así mismo 3 observadores independientes analizarón la intensidad de las bandas visualmente calificando las tiras como negativas, positivas o doble positivas mediante la comparación de la intensidad de las bandas con la observada al analizar una patrón de ECSBPM de 3 puntos: 1,56ng/ml (-), 6,25ng/ml (+) y 25ng/ml (++) (Fig.3).

Fig 3. Patrón de ECSBPM de 3 puntos para la evaluación visual de los resultados.

2.3.2.- RESULTADOS OBJETIVO 1

Se ha desarrollado un ensayo inmunocromatográfico para la determinación de alérgenos de cáscara de soja de bajo peso molecular. El ensayo detecta un rango de concentraciones de 6,25 a 25ng/ml (Fig. 2), siendo el límite de detección inferior, determinado como la mínima concentración de ECSBPM que produce una banda morada en la línea T claramente visible, de 6,25ng/ml. El límite de detección superior, de 25ng/ml, fue definido como la máxima concentración de ECSBPM que produce una banda de intensidad superior a la de la concentración que la precede en la línea T (Fig. 2).

En total se han analizado 119 muestras mediante ambos métodos en paralelo, el ELISA tipo sandwich y el test rápido inmunocromatográfico. La media y rango de los niveles obtenidos mediante el método de ELISA fueron de 274,5 (1,18 – 1848)ng/ml, siendo 22 muestras (18,5%) superiores al valor del NGS (627ng/ml). En el ensayo inmunocromatográfico las muestras se testarón a una dilución 1:100 con el fin de que coincidiera el límite de detección inferior del ensayo (6,25ng/ml) con el NGS ambiental. De tal

manera que las muestras evaluadas como positivas o doble positivas por los observadores indicaran que la concentración de alérgenos de soja de la muestra es igual o superior al NGS establecido.

Las tiras inmunocromatográficas fueron analizadas visualmente por 3 observadores independientes mediante la comparación de la intensidad de las bandas con la de una curva estándar de 3 puntos. Los 3 observadores coincidieron en la interpretación del 71,4% de las muestras y en todas las muestras almenos 2 observadores coincidian en la interpretación. Se evaluó la concordancia entre observadores mediante el análisis del índice Kappa siendo este de 0,63 (CI 0,544-0,715), considerado substancial.

Los resultados obtenidos mediante densitometría mostráron la existencia de una fuerte correlación entre los niveles de alérgeno de soja analizados mediante el ELISA tipo sandwich y la intensidad de la banda obtenida en el ensayo rápido (Fig. 4A). Además la intensidad de la banda analizada mediante densitometría era significativamente superior en aquellas muestras que habían sido categorizadas como superiores al NGS mediante el ELISA (Fig. 4B).

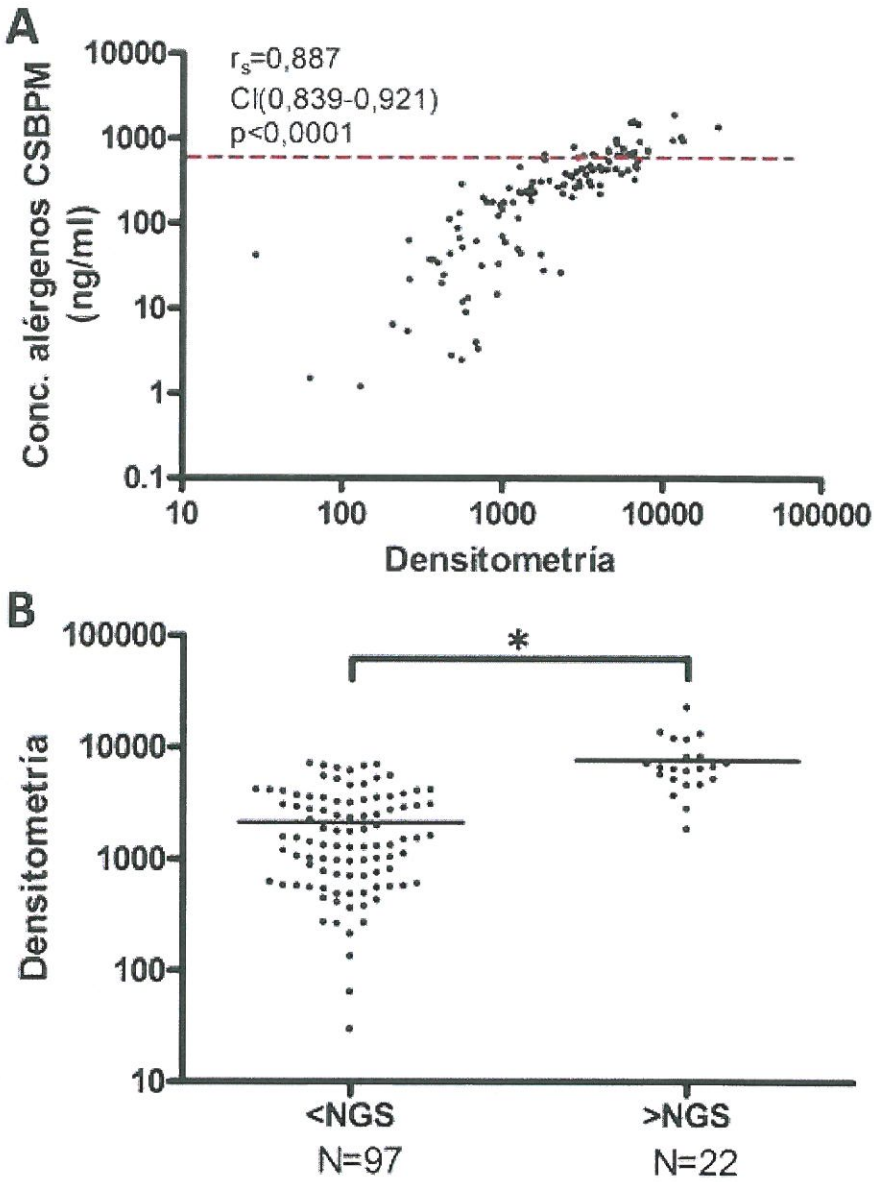

Fig 4. Representación gráfica de los resultados obtenidos mediante el análisis de la intensidad de la banda T del ensayo rápido mediante densitometría en relación a los resultados obtenidos mediante ELISA: 4A) Correlación entre densitometría y niveles de alérgeno y 4B) Comparación entre la intensidad de la banda analizada mediante densitometría de las muestras con niveles superiores al NGS y de las muestras con niveles inferiores al NGS.

Los resultados obtenidos mediante interpretación visual también mostrarón una buena concordancia con los resultados obtenidos mediante el método de ELISA, oscilando la sensibilidad entre el 77,3 y el 100% y la especificidad entre el 65 y el 83,5% dependiendo del observador (Tabla 1).

Tabla 1. Sensibilidad y especificidad de la interpretación visual realizada por los 3 observadores de las tiras inmunocromatográficas.

	Sensibilidad % (CI)	Especificidad % (CI)
Observador 1	**86,4 (65,1 – 97,1)**	**73,2 (63,2 – 81,7)**
Observador 2	**100 (84,6 – 100)**	**65 (54,6 – 74,4)**
Observador 3	**77,3 (54,6 – 92,2)**	**83,5 (74,6 – 90,3)**

Mediante la interpretación visual del ensayo rápido realizada por los 3 observadores se observó que las muestras categorizadas como negativas tenian niveles de alérgenos de soja, determinados mediante ELISA, significativamente inferiores y aquellas muestras categorizadas como doble positivas presentaban niveles significativamente superiores a aquellas categorizadas como negativas o incluso las positivas (Fig. 5).

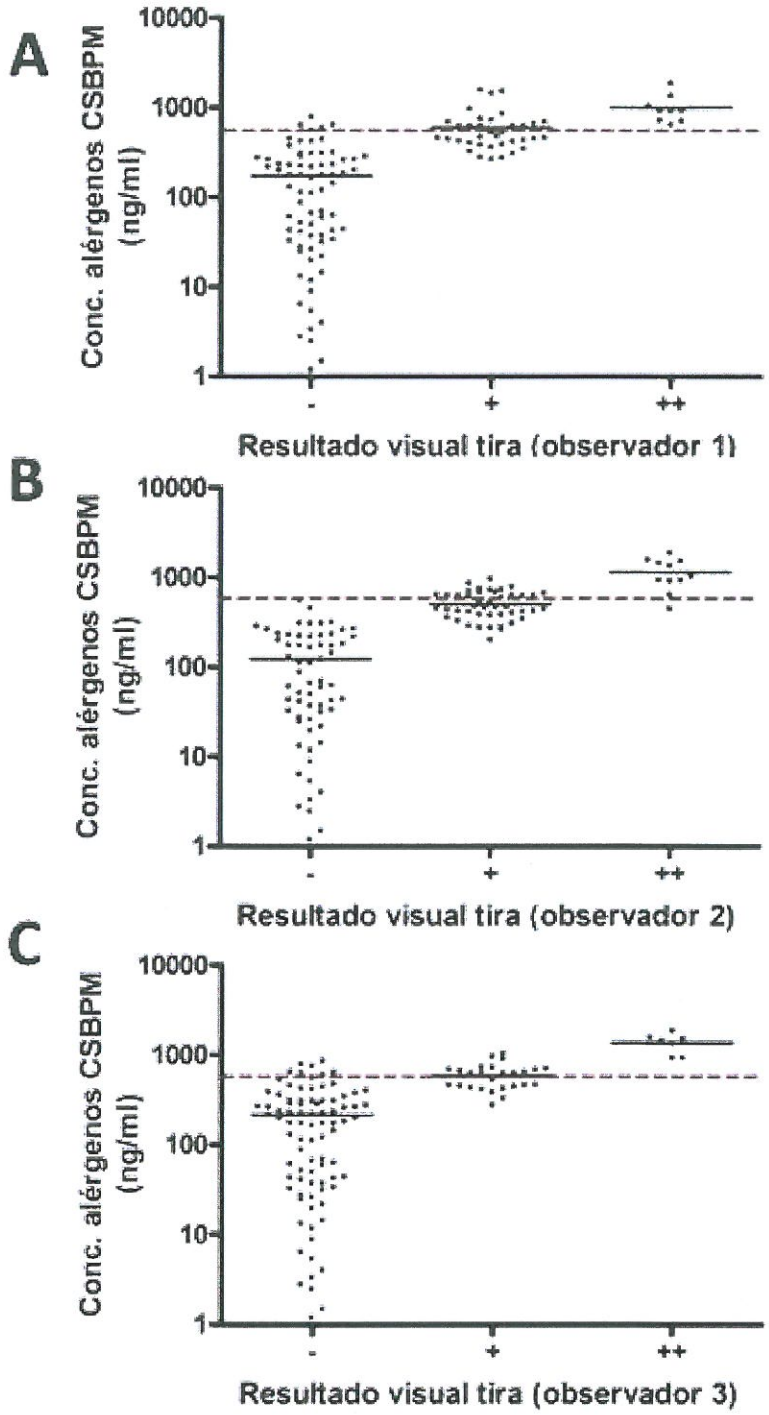

Fig 5. Niveles de aeroalérgenos de soja por categoría de la interpreatación visual del ensayo inmunocromatográfico: 5A) Interpretación visual realizada por el observador 1; 5B) Interpretación visual realizada por el observador 2 y 5C) Interpretación visual realizada por el observador 3.

Objetivo 2: ***Desarrollar y estandarizar un método rápido, inmunocromatográfico, para la determinación de la presencia de proteínas séricas de paloma.***

2.3.3.- METODOLOGÍA OBJETIVO 2

Extracto antigénico
Se ha adquirido suero de paloma (SP) (Rockland Immunochemicals Inc, Gilbertsville, PA, USA). Se determinó la concentración de proteínas del suero mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) y se procedió a su análisis mediante SDS-page utilizando el sistema NuPage de Invitrogen.

Producción anticuerpo policlonal
Se inmunizaron dos conejos machos New Zealand. Para la realización de la primera inmunización el suero de paloma se mezclo a partes iguales con adyuvante completo de Freund y se injectó subcutáneamente. Se realizaron 3 recordatorios siendo el último al día 56 de la primera inmunización. El antisuero policlonal obtenido en cada conejo fue purificado por cromatografía de afinidad con proteína A (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) y desalado con una columna de excelulosa (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) por separado. Los dos anticuerpos purificados se conservaron a -80ºC.

Marcaje anticuerpo policlonal
Uno de los anticuerpos policlonales obtenidos se marcó para su utilización como anticuerpo de detección. Para su uso como anticuerpo detector en el ELISA tipo sandwich se marcó con biotina mediante el kit (EZ link® Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit, Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) y se valoró la biotinización mediante ELISA.

Para el desarrollo del método rápido el anticuerpo policlonal se marcó con oro coloidal de 40nm (British BioCell Internationa, Cardiff, UK) mediante un método pasivo de conjugación. Después de la incubación del anticuerpo policlonal con las partículas de oro coloidal, este fue bloqueado con albúmina bovina sérica. El conjugado resultante fue concentrado y se midió la concentración de partículas mediante la lectura de la densidad óptica a 520nm. El conjugado se caracterizó mediante microscopía electrónica de transmisión.

Desarrollo del ELISA tipo sandwich para la determinación de proteínas séricas de paloma
Como etapa previa al desarrollo del método rápido, hemos desarrollado el ensayo de captura también denominado ELISA tipo sandwich. El anticuerpo policlonal anti-SP se acopló a una concentración de 1µg/ml a la placa de microtitulación (Costar, Cambridge, MA, USA) que posteriormente fue bloqueada con PBS/1% BSA/0,05% Tween-20. Tras 3 lavados con PBS/0,1% tween-20 los pocillos son incubados con la curva patrón que contiene proteínas de suero de paloma en un rango de concentración de 242,2 a 1,9ng/ml o bien con las muestras. Tras previos lavados se incuba con el anticuerpo policlonal anti-SP marcado con biotina a una dilución 1/15000. Tras 3 lavados se adiciona la estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (ThermoFischer) con el fin de amplificar la señal. Se revela la reacción mediante la adición de sustrato TMB y peróxido de hidrógeno y tras 20 minutos se para la reacción mediante la adición de ácido sulfúrico 2M. La absorbancia se mide a 450nm en un espectrofotómetro (Titertek Multiskan Plus MKII). Los resultados se calculan con el programa Genesis software (version 2.16, Life Sciences Ltd, UK) y se expresan en ng/ml frente al estándar de referencia correspondiente.

Evaluación del ELISA tipo sandwich
Sensibilidad: El límite inferior de detección se definio como la concentración del último punto de la curva estándar, teniendo que ser la DO de este punto 0,05 unidades superior a la DO del blanco. El límite inferior de cuantificación se definió com la concentración que corresponde en función de la ecuación de la curva patrón a la DO del último punto de la curva substrayendole la DO del blanco y adicionándole 0,2 unidades. El límite superior de cuantificación fue definido como la concentración que en función de la curva patrón se corresponde con el 80% de la DO del punto más concentrado de la curva patrón substrayéndole la DO del blanco. Bajo estas premisas las determinaciones se limitan a la zona log-lineal de la curva.

Ensayo de inmunocromatografía
Se ha desarrollado un ensayo inmunocromatográfico. En primer lugar se inmovilizó a razón de 3µl/cm el anticuerpo policlonal anti-SP a una concentración de 1mg/ml en la membrana de nitrocelulosa (Unisart CN95 19910 Sartorius stedim Biotech, Goettingen, Germany) (línea T). A 0,3cm por encima de la línea T (ver Fig. 6A) se inmovilizó un anticuerpo de cabra anti-conejo (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA) a una concentración de 500µg/ml (línea C). Esta línea C es la línea de control que sirve como control de calidad e indica que la muestra se ha aplicado y ha migrado por la membrana correctamente. La membrana se seco durante 1 hora a 37ºC. A continuación se

montáron las tiras reactivas usando la membrana anterior tal y como se indica en la figura 6A. Se preparó una curva patrón de diluciones seriadas al medio del SP y se dispensaron 20µl/pocillo de las diferentes concentraciones de SP en una placa de microtitulación. A cada pocillo se añadieron 20µl de anticuerpo policlonal de conejo frente a SP conjugado con oro coloidal y se sumergió la tira reactiva tal y como se muestra en la figura 6B. El complejo SP-anticuerpo policlonal marcado con oro coloidal difunde por capilaridad a lo largo de la membrana (Fig. 6C). Se dejó desarrollar el color y se valoró el resultado tras 30 minutos. La intensidad de las bandas se densitometró mediante el programa informático Image J (NIH).

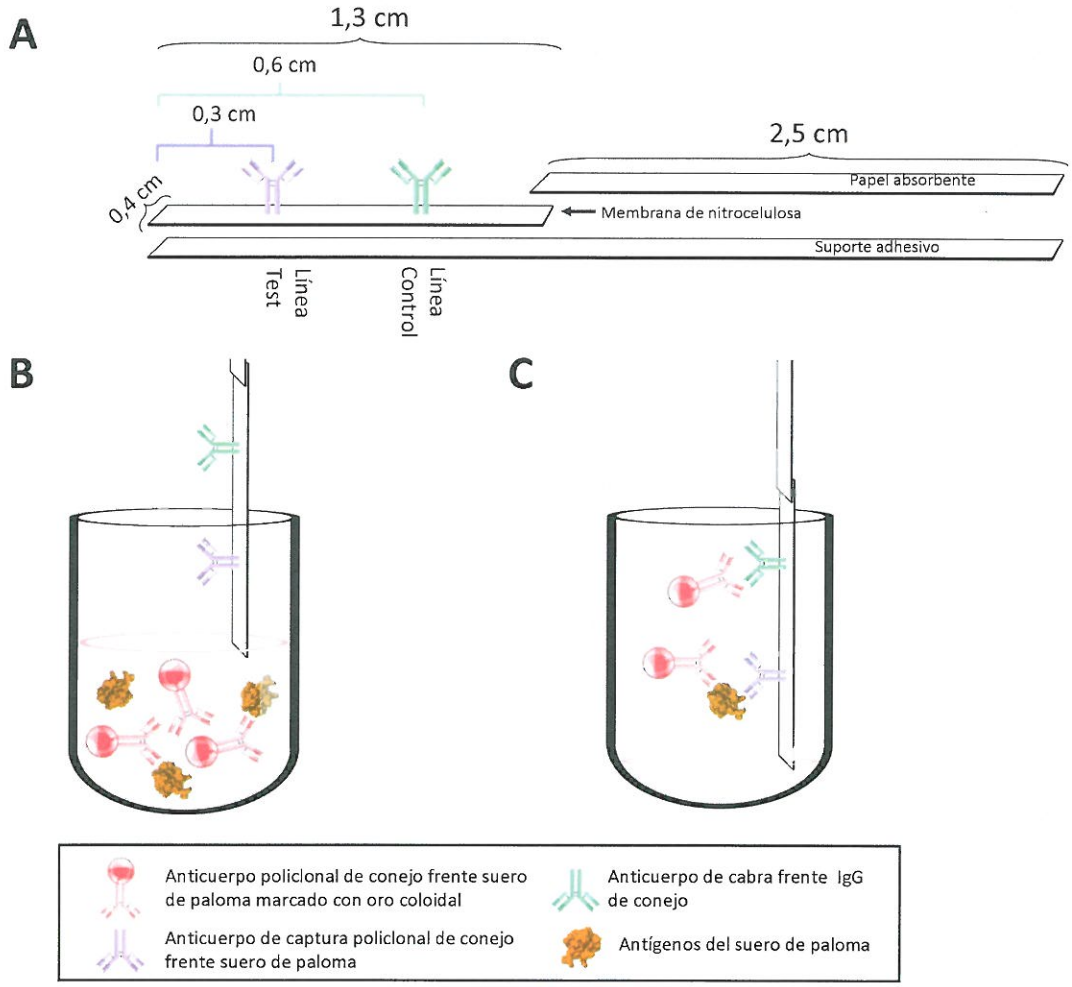

Fig 6. Esquema del ensayo inmunocromatográfico desarrollado: 6A) Esquema de los componentes de la tira y su disposición; 6B) Inmersión en el pocillo de la microplaca de la tira inmunocromatográfica desarrollada y 6C) Unión de los complejos ECSBPM-anticuerpo policlonal marcado con oro coloidal en la línea T y del anticuerpo policlonal marcado con oro coloidal libre en la línea C.

Validación del ensayo de inmunocromatografía

Para su validación se requerirá analizar muestras ambientales. Estamos en el proceso de obtener permisos para poder realizar muestreos en palomares.

2.3.4.- RESULTADOS OBJETIVO 2

ELISA tipo sandwich para la determinación de alérgenos de suero de paloma *(SP)*
Como primera fase para el desarrollo del ensayo de inmunocromatografía, se ha desarrollado un ELISA tipo sándwich para la determinación de alérgenos de suero de paloma. El método desarrollado presenta una sensibilidad de 1,9ng/ml concentración del último punto de la curva. El límite inferior y superior de cuantificación fueron de 5,65 y 33,9 ng/ml, respectivamente. Ver una curva típica del ensayo en la figura 7.

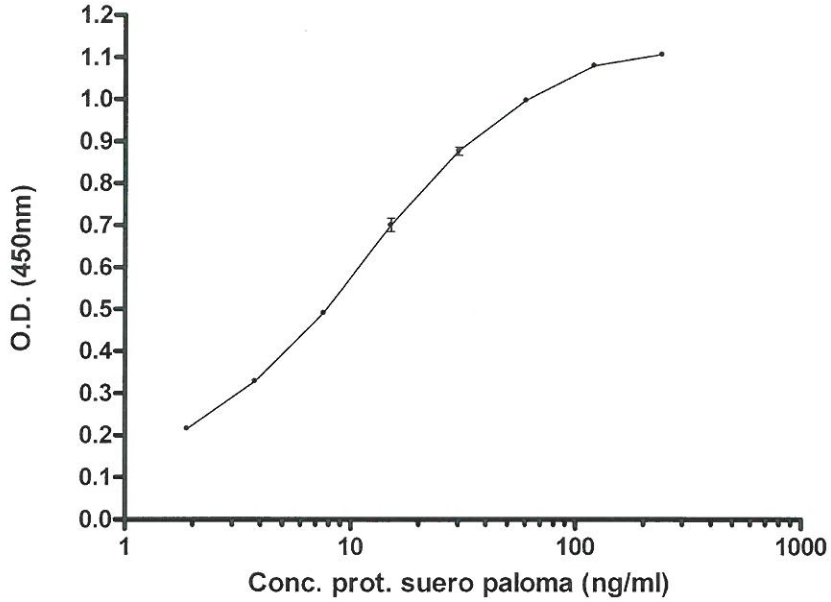

Fig 7. Curva estándar típica del ELISA tipo sandwich para la determinación de alérgenos de suero de paloma estandarizado.

Ensayo de inmunocromatografía para la determinación de alérgenos de suero de paloma *(SP)*
A continuación se muestran los resultados obtenidos tras el análisis con las tiras inmunocromatográficas desarrolladas de la curva patrón elaborada con suero de paloma a concentraciones seriadas al medio con un rango de concentraciones de 30 a 3784 ng/ml (Fig. 8).

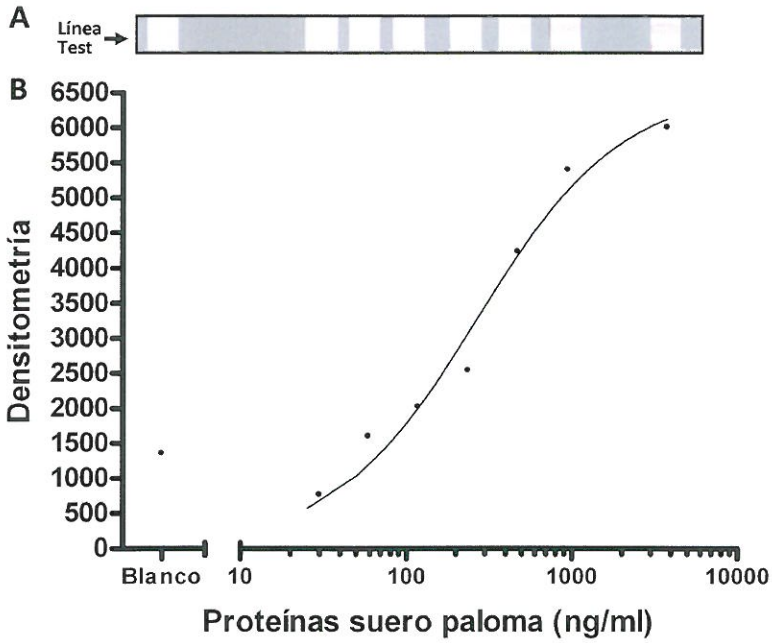

Fig 8. Curva estándar del ensayo inmunocromatográfico: 8A) Imagen de la banda T de las tiras inmunocromatográficas. Las imagenes se muestran alineadas con la concentración a la que corresponden en el gráfico 8B. 8B) Gráfico de los resultados obtenidos mediante densitometría a las concentraciones indicadas.

Objetivo 3: ***Determinar la carga de alérgeno de soja en la fracción de partículas menores de 10 micrómetros en el aire de los alrededores de las empresas que descargan soja en el puerto de Barcelona y compararla con los niveles en los filtros de partículas suspendidas totales.***

2.3.5.- METODOLOGÍA OBJETIVO 3

Muestreo

Durante el año 2009 se realizó un muestreo durante 107 días, en el que se recogieron en paralelo durante periodos de 24 horas filtros de partículas suspendidas totales (PST) y filtros de partículas menores de 10 micrómetros (PM10). Para la obtención de los filtros de PST se utilizó el captador que se utiliza de rutina para la monitorización diaria de los niveles de aeroalérgeno de soja en la ciudad de Barcelona (15,20) mediante un captador automático de alto volumen (CAV-A/HF, MCV, SA Barcelona, España) utilizando filtros de fibra de vidrio de tamaño de poro 1µm, (Whatman International, Ltd., UK) a un flujo de 55m^3/h.

Para la obtención de los filtros PM10 se utilizó el captador CAV-A (MCV) equipado con el cabezal PM1025CAV (MCV) a un flujo de 30m^3/h. Se utilizaron filtros de fibra de vidrio de 15 cm de diámetro calidad GF/A (Whatman).

Elución

Las proteínas de los filtros se extrajeron en 5ml de tampón de elución (PBS/0.2%BSA/0.1%Tween-20) para los filtros PST y con 2ml del mismo tampón para los filtros PM10.

Análisis

Los eluidos de los días en los que se disponía de los dos tipos de filtro, PST y PM10, se han analizado mediante el método de ELISA de inhibición utilizado en la actualidad para la monitorización diaria de los niveles de aeroalérgeno de soja en la ciudad de Barcelona (20) que utiliza como anticuerpo detector un pool de sueros de pacientes alérgicos a la soja.

Datos meteorológicos

En paralelo se recogieron los datos meteorológicos correspondientes a los días muestreados tales como velocidad y dirección del viento, temperatura media, humedad relativa máxima, presión, precipitaciones y radiación solar.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha realizado con el programa GraphPad Prism versión 4.01 para Windows, (GraphPad Software, San Diego, California, USA), excepto para el modelo de regresión, para el cual se utilizó el STATA. A las muestras con niveles no detectables se les asignó el valor del límite de detección inferior. Se calculó el porcentaje de muestras detectables, así como la mediana y el rango de los niveles de aeroalérgeno de soja en ambos tipos de filtro, TSP y PM10. Se calculó y graficó el porcentaje de la carga de alergeno de soja en los filtros PM10 con respecto a los TSP en relación a la media geométrica. Las correlaciones existentes entre los niveles de aeroalérgeno de soja en ambos tipos de filtro, así como sus relaciones con los factores meteorológicos, se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman (rs). El efecto de la descarga de soja en el puerto sobre los niveles de aeroalérgeno de soja se analizó mediante el test de Mann-Whitney. Se construyó un modelo de regresión de los factores meteorológicos y datos de descarga de soja con el fin de intentar elucidar la relación existente entre dichos parámetros y los niveles de aeroalérgeno de soja en ambos tipos de filtro.

2.3.6.- RESULTADOS OBJETIVO 3

Los resultados pertenecientes al objetivo 3 se encuentran actualmente aceptados para publicación: Gómez-Ollés S, Untoria MD, Villalbí JR, Muñoz X, Morell F, Cruz MJ. Soy aeroallergens in thoracic fraction practicles (PM10). J Investig Allergol Clin Immunol 2013;23(3). Se adjunta el artículo en formato pdf. En el artículo se ha hecho constar que ha sido realizado "Amb el suport del Comissionat per a Universitats i Recerca del Departament d'Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya i de la Unió Europea".

Se analizó el nivel de aeroalérgeno de soja en un total de 98 pares de muestras validas TSP y PM10. La mediana (rango) de los niveles fue de 6 (4-80) y 22,5 (10-400) U/m^3 para los filtros PM10 y TSP, respectivamente. Los niveles de aeroalérgeno de soja fueron detectables en 72 (73,5%) filtros PM10 y en 80 (81,6%) filtros TSP.

La variación temporal de la concentración de alergeno de soja en los filtros TSP y PM10 se muestra en la figura 10. La variación de los niveles de alérgeno de soja durante el periodo de estudio fue similar en

ambos tipos de filtros (Fig.9); en la mayoría de los días la carga de alérgeno de soja en los filtros PM10 iba en paralelo a la de los filtros TSP.

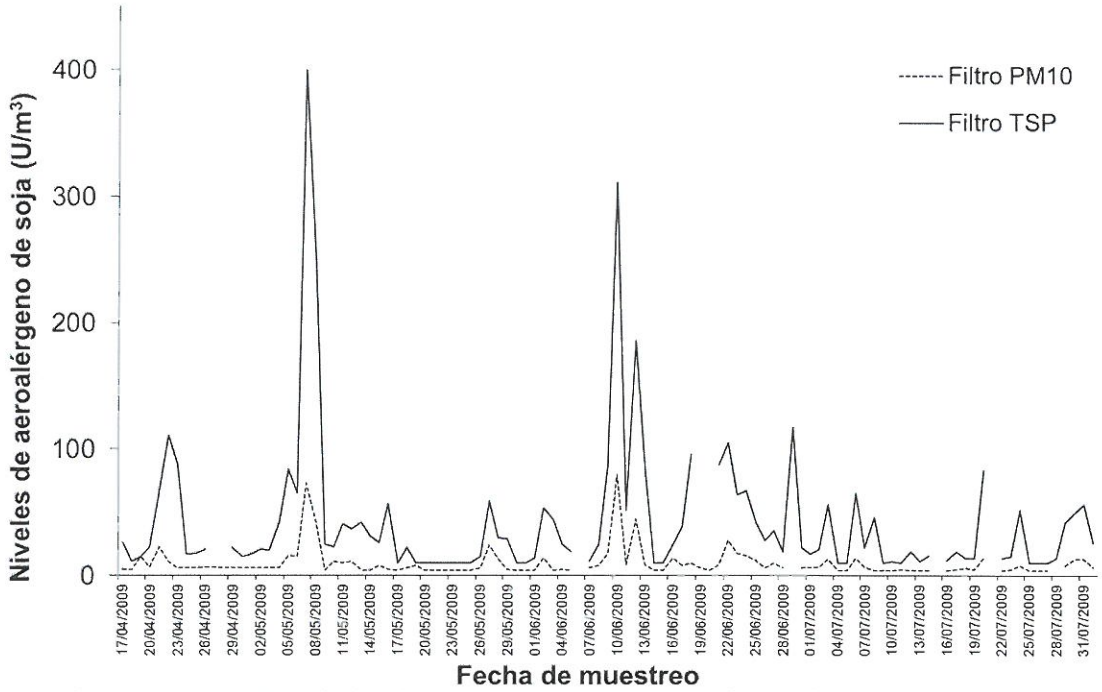

Fig 9. Serie temporal de los niveles de aeroalérgeno de soja en los filtros TSP y PM10.

El coeficiente de correlación de Spearman (rs) calculado para los niveles de alérgeno de soja en los filtros apareados mostró que existía una elevada correlación (rs=0,769, p<0.0001). La mediana del porcentaje de la carga de alérgeno de soja en los filtros PM10 con respecto a la carga observada en los filtros TSP fue del 28,6%, aunque este porcentaje mostraba una amplia dispersión (6,8-100%) sobre todo cuando los niveles de alérgeno eran bajos (Fig.10).

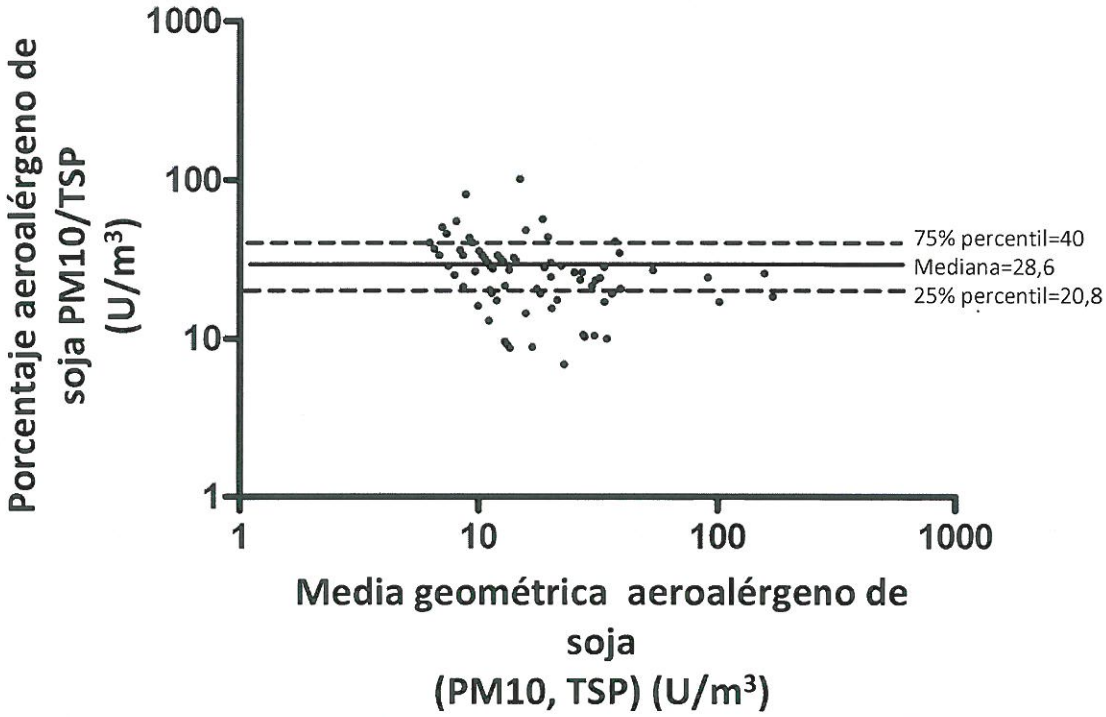

Fig 10. Diferencias relativas (ratios) en porcentaje en relación a la media geométrica de los niveles de aeroalérgeno de soja en los filtros TSP y PM10.

La descarga de soja en el puerto se utilizó como indicador de una mayor emisión de aeroalérgeno a la atmosfera. La diferencia entre las medianas de los niveles de aeroalérgeno de soja en los días con y sin descarga fue estadísticamente no significativa (Fig. 11). Sin embargo los niveles más altos de alérgeno de soja fueron registrados siempre en días de descarga.

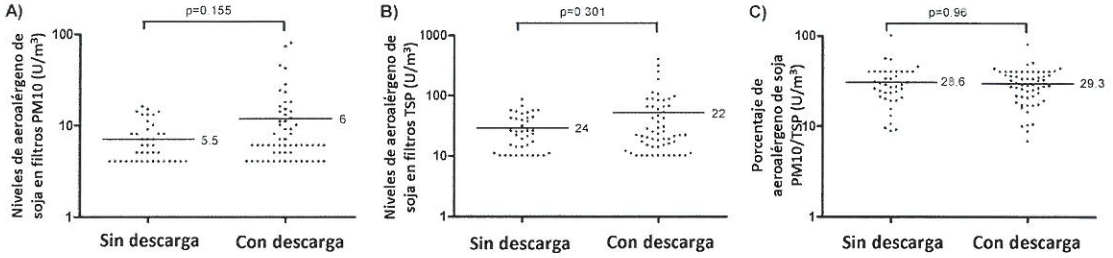

Fig 11. Niveles de aeroalérgeno de soja en los días en los que había descarga de soja en comparación con los días sin descarga: a) en los filtros PM10; b) en los filtros TSP y c) ratio PM10/TSP (en porcentaje).

En la tabla 2 se muestran las medianas y los rangos intercuartílicos de los parámetros meteorológicos. En la tabla 2 también se muestran los coeficiente de correlación entre la media diaria de la concentración de soja en los filtros PM10 o bien los TSP y la media de los parámetros meteorológicos.

Tabla 2. Estadística descriptiva de las variables meteorológicas y correlación de estos factores con los niveles de aeroalérgeno de soja en los filtros TSP y PM10.

Variables meteorologicas	Percentil 25%	Mediana	Percentil 75%	TSP		PM_{10}		$\%PM_{10}/TSP$	
				r_s	p	r_s	p	r_s	p
Velocidad del viento media (m/s)	2,77	3,51	3,96	0,11	0,282	0,079	0,438	-0,053	0,607
Velocidad del viento máxima (m/s)	3,84	4,86	5,6	0,152	0,135	0,09	0,38	-0,098	0,338
Dirección del viento (º)	123,5	189,5	222,5	0,503	**<0,0001**	0,419	**<0,0001**	-0,339	**0,001**
Temperatura (ºC)	18,2	21,7	24,1	-0,032	0,754	-0,056	0,582	-0,042	0,681
Humedad relativa máxima (%)	83,13	89,58	94,59	-0,345	**0,001**	-0,382	**0,0001**	0,127	0,214
Presión (hPa)	1012	1015	1018	0,168	0,097	0,279	**0,005**	0,021	0,841
Radicación solar directa (W/m^2)	246,8	304,5	324,3	0,226	**0,025**	0,26	**0,01**	-0,142	0,164

Los valores p en negrita son estadísticamente significativos con un valor ≤ 0,05.

No se mostró correlación entre los parámetros meteorológicos tales como velocidad del viento y temperatura. Sin embargo, la dirección del viento, la humedad relativa máxima y la radiación solar correlacionaron con la concentración de aeroalérgeno de soja en ambos filtros. La dirección del viento también correlaciono con el ratio de la carga de soja en los filtros PM10 con respecto a la carga en los filtros TSP (r= -0,339, p=0,001). Contrariamente, cuando se analizó mediante el modelo de regresión la asociación entre los niveles de aeroalérgeno de soja, los parámetros meteorológicos y la descarga de soja, solo la velocidad media del viento y la descarga de soja explicaban parte de la varianza en los niveles de aeroalérgeno de soja en los filtros TSP. Aunque solo una pequeña parte, el 15%. En los filtros PM10 el 13% de la varianza fue explicada por la velocidad media del viento y la presión (tabla 3). La velocidad máxima del viento solo explicó un 9% de la varianza del ratio PM10/TSP de los niveles de alérgeno de soja (tabla 3).

Tabla 3. Modelo de regresión lineal para el estudio de la relación entre los niveles de aeroalérgeno de soja en los filtros TSP, PM10 y el ratio PM10/TSP y los datos meteorológicos y de descarga de soja.

Variables independientes	Niveles de aeroalérgeno de soja en filtros TSP (R^2=0,1528; p=0,0018; N=79)			Variables independientes	Niveles de aeroalérgeno de soja en filtros PM_{10} (R^2=0,1344; p=0,0036; N=81)			Variables independientes	% PM_{10}/TSP (R^2=0,0953; p=0,0063; N=77)		
	Coeficiente	t	p		Coeficiente	t	p		Coeficiente	t	p
Velocidad del viento media (m/s)	25,82	2,67	0,009	Velocidad del viento media (m/s)	4,93	2,7	0,009	Velocidad del viento máxima (m/s)	-4,23	-2,81	0,006
Descarga de soja	28,45	2,06	0,043	Presión (hPa)	0,8	2,35	0,021	Intercepto	48,51	6,85	0,000
Intercepto	-50,07	-1,58	0,118	Intercepto	-818,29	-2,36	0,021				

2.4.- CONCLUSIONES

1.- Se ha desarrollado un método rápido, inmunocromatográfico, para la determinación de la presencia de alérgenos de soja con un límite de detección de 6,25ng/ml.

2.- La concordancia de la interpretación visual realizada por 3 observadores independientes del método rápido, inmunocromatográfico, para la determinación de la presencia de alérgenos de soja es substancial.

3.- El método inmunocromatográfico desarrollado para la determinación de la presencia de alérgenos de soja presenta una elevada sensibilidad y especificidad.

4.- Se ha desarrollado un método rápido, inmunocromatográfico, para la determinación de la presencia de proteínas séricas de paloma que requiere ser validado mediante el análisis de muestras ambientales de palomares.

5.- A pesar de la buena correlación entre los niveles de alérgeno de soja en la fracción de partículas menores de 10 micrómetros y en los filtros de partículas suspendidas totales, se observó una amplia variación en la proporción PM10/TSP entre días. Siendo la proporción media de 28,6%.

6.- Las diferencias en la proporción de los niveles de alérgeno de soja en la fracción de partículas menores de 10 micrómetros y en los filtros de partículas suspendidas totales, no pudieron ser totalmente explicadas por los factores meteorológicos.

2.5.- BIBLIOGRAFÍA

1.- Meredith SK, Taylor VM, McDonald JC. Occupational respiratory disease in the United Kingdom 1989: a report to the British Thoracic Society and the Society of Occupational Medicine by the SWORD project group. Br J Ind Med 1991;48(5):292-8.

2.- AsmaPro database. Clinique des Maladies Respiratoires. CHU-Hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France; 2005. http//www.asmanet.com.

3.- Selman M. Hypersensitivity Pneumonitis: a multifaceted deceiving disorder. Clin Chest Med 2004; 25:531-547.

4.- Hanak V, Golbin JM, Ryu JH. Causes and presenting features in 85 consecutive patients with hypersensitivity pneumonitis. Mayo Clin Proc 2007;82:812-816.

5.- Morell F, Reyes L, Doménech G, De Gracia J, Majó J, Ferrer J. Diagnoses and diagnostic procedures in 500 consecutive patients with clinical suspicion of interstitial lung disease. Arch Bronconeumol 2008;44:185-91.

6.- Girard M, Lacasse Y, Cormier Y. Hypersensitivity Pneumonitis. Allergy 2009;64:322-334.

7.-Selman M, Chapela R, Raghu G. Hypersensitivity pneumonitis: clinical, manifestations, pathogenesis, diagnosis, and therapeutic strategies. Semin Respir Med 1993; 14: 353-364.

8.- Morell F, Roger A, Reyes L, Cruz MJ, Murio C, Muñoz X. Bird fancier's lung: a series of 86 patients. Medicine (Baltimore) 2008;87(2):110-30.

9.- Renström A, Larsson PH, Malmberg P, Bayard C. A new amplified monoclonal rat allergen assay used for evaluation of ventilation improvements in animal rooms. J Allergy Clin Immunol 1997; 100(5):649-55.

10.- O'Keeffe M, Crabbe P, Salden M, Wichers J, van Peteghem C, Kohen F, Pieraccini G, Moneti G. Preliminary evaluation of a lateral flow immunoassay device for screening urine samples for the presence of sulphamethazine. J Immunol Methods 2003;278(1-2):117-26.

11.- Bogdanovic J, Koets M, Sander I, Wouters I, Meijster T, Heederick D, Van Amerongen A, Doekes G. Rapid detection of fungal alpha-amylase in the work environment with a lateral flow immunoassay. J Allergy Clin Immunol 2006;118(5):1157-63.

12.- Koets M, Sander I, Bogdanovic J, Doekes G, Van Amerongen A. A rapid lateral flow immunoassay for the detection of fungal alpha-amylase at the workplace. J Environ Monit 2006;8(9):942-6.

13.- Koets M, Renström A, Zahradnik E, Bogdanovic J, Wouters IM, van Amerongen A. Rapid one-step assays for on-site monitoring of mouse and rat urinary allergens. J Environ Monit 2011;13(12):3475-80.

14.- Antó JM, Sunyer J, Rodriguez-Roisin R, Suarez-Cervera M, Vazquez L. Community outbreaks of asthma associated with inhalation of soybean dust. N Engl J Med 1989; 320(17):1097-102.

15.- Rodrigo MJ, Cruz MJ, García MM, Antó JM, Genover T, Morell F. Epidemic asthma in Barcelona: An evaluation of new strategies for the control of soybean dust emission. Int Arch Allergy Immunol 2004; 134:158-64.

16.- Chen Q, Hildemann LM. Size-resolved concentrations of particulate matter and bioaerosols inside versus outside of homes. Aerosol Sci Technol 2009;43(7):699-713.

17.- Morell F, Roger A, Reyes L, Cruz MJ, Murio C, Muñoz X. Bird fancier's lung: a series of 86 patients. Medicine (Baltimore) 2008;87(2):110-30.

18.- Borderías L, Morell F, Vera J, Briz H, Muñoz X, Cruz MJ. Starling-induced hypersensitivity pneumonitis: minimal but persistent antigen exposure. Arch Bronconeumol 2010;46(11):607-9.

19.- Gonzalez R, Valera J, Carreira J, Polo F. Soybean hydrophobic protein and soybean hull allergy. Lancet 1995;346:48-9.

20.- Cruz MJ, Rodrigo MJ, Anto JM, Morell F. An amplified ELISA inhibition method for the measurement of airborne soybean allergens. Int Arch Allergy Immunol 2000;122(1):42-48.

2.6.- PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA AYUDA

2.5.1.- ARTÍCULOS ACEPTADOS PARA PUBLICACIÓN

Título: Soy aeroallergens in thoracic fraction practicles (PM10).

Revista: J Investig Allergol Clin Immunol **Año:** 2013 **Vol.:** 23(3)

Especialidad (ISI): Alergia **Índice de Impacto (ISI):** 2,269

Autores del artículo: Gómez-Ollés S, Untoria MD, Villalbí JR, Muñoz X, Morell F, Cruz MJ.

2.5.2.- POSTERS A CONGRESOS

Título: A rapid test for environmental soy aeroallergens exposure assessment

Autores: Alvarez-Simon D, Cruz MJ, Untoria MD, Muñoz X, Morell F, Gomez-Olles S.

Congreso: European Respiratory Society Annual Congress (ERS) **Año:** 2013

Lugar de Celebración: Barcelona

2.5.3.- MANUSCRITOS EN ELABORACIÓN

Título: A rapid test for soy aeroallergens exposure assessment

Autores del artículo: Alvarez-Simon D, Cruz MJ, Untoria MD, Muñoz X, Villalbí JR, Morell F, Gómez-Ollés S.

Título: A rapid test for pigeon sera aeroallergens exposure assessment

Autores del artículo: Alvarez-Simon D, Cruz MJ, Muñoz X, Morell F, Gómez-Ollés S.

2.7.- MODIFICACIONES DEL PROYECTO ORIGINAL Y SU JUSTIFICACIÓN

La prevalencia de asma ocupacional por látex ha ido disminuyendo en los últimos años gracias a la substitución de los guantes de látex por guantes de otros materiales como nitrilo o polivinilo. Sin embargo, y en gran medida por el hecho de que nuestro hospital es centro de referencia de neumonitis por hipersensibilidad, hemos observado una creciente necesidad de realizar mediciones ambientales a antígenos aviares, en particular a antígenos de suero de paloma, para poder realizar un diagnóstico certero de esta patología. Es por ello que durante el desarrollo de este proyecto consideramos prioritario el desarrollo del método rápido inmunocromatográfico para la detección de alérgenos del suero de paloma.

De todos modos no se ha descartado el desarrollo del método rápido inmunocromatográfico para la detección de alérgenos de látex en un futuro.