



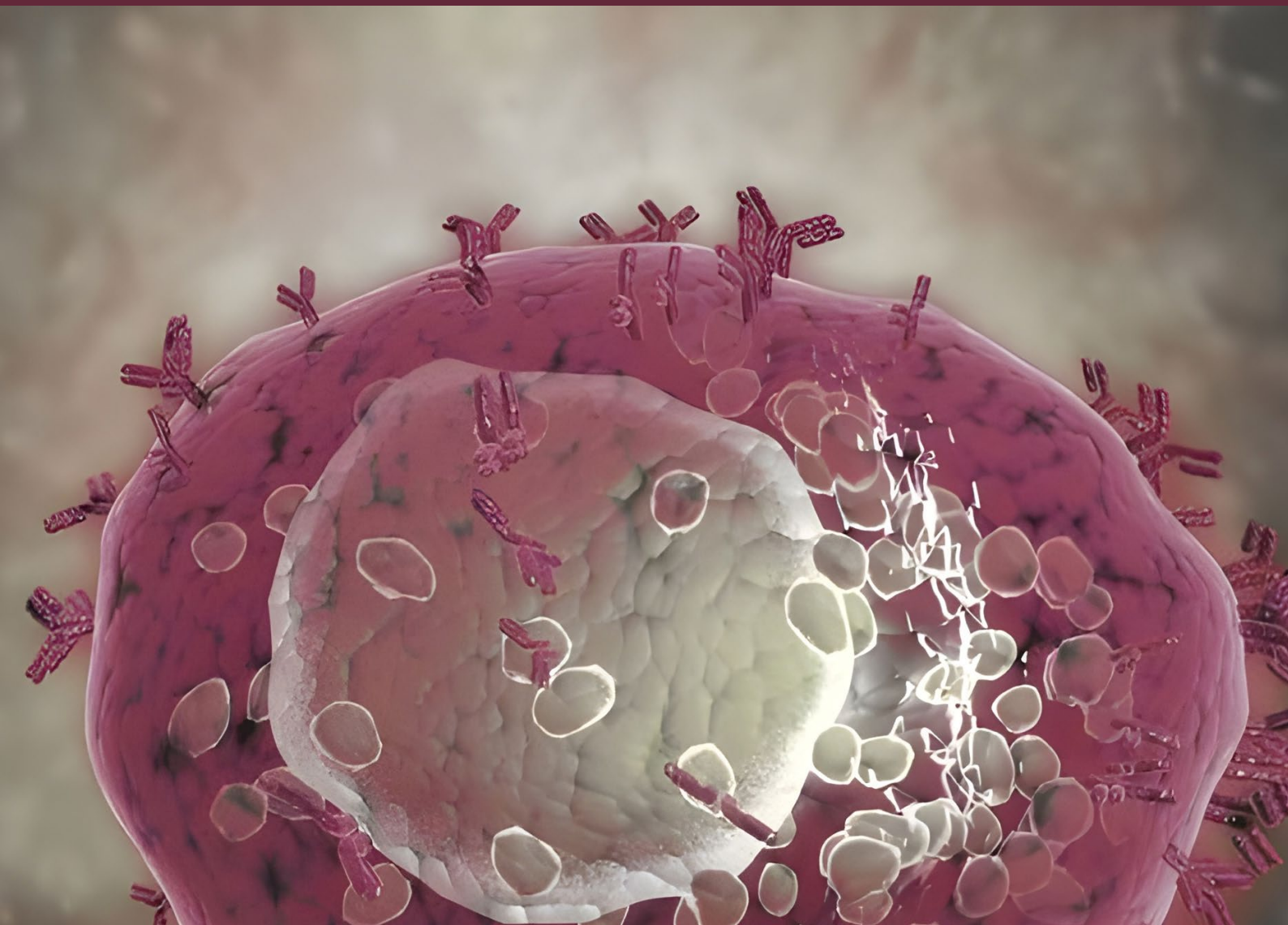
UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

**METODOLOGÍAS BIOANALÍTICAS
PARA EL DIAGNÓSTICO *IN VITRO*
DE ALERGIAS A ANTIBIÓTICOS
 β -LACTÁMICOS**

María José Juárez Rodríguez

Valencia, Junio 2022



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**INSTITUTO DE RECONOCIMIENTO
MOLECULAR Y DESARROLLO TECNOLÓGICO**

Tesis Doctoral



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Metodologías bioanalíticas para el diagnóstico *in vitro* de
alergia a antibióticos β -lactámicos

Presentada por **María José Juárez Rodríguez**
para optar al grado de Doctor en Química
por la Universitat Politècnica de València

Directores:

Dr. Sergi Morais Ezquerro

Dr. Ángel Maquieira Catalá

València, abril 2022



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Sergi Morais Ezquerro

Profesor Titular del Departamento de Química de la
Universitat Politècnica de València.

Ángel Maquieira Catalá

Catedrático de Universidad del Departamento de
Química de la Universitat Politècnica de València.

CERTIFICAN: Que el trabajo que presenta María José Juárez Rodríguez en esta memoria, con título “Metodologías bioanalíticas para el diagnóstico de alergia a antibióticos β -lactámicos” ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) para optar al grado de Doctor en Química por la Universitat Politècnica de València.

Para que así conste, firman el presente certificado en Valencia, a 6 de abril de 2022.

Dr. Sergi Morais Ezquerro

Dr. Ángel Maquieira Catalá

AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis. A Ángel Maquieira por abrirme las puertas de su grupo de investigación y dejarme aprender y desarrollarme como investigadora. Quisiera agradecer tu dedicación, sabiduría, visión analítica y consejos, me queda mucho que aprender de ti.

A Sergi Morais, por apostar por mí y luchar por que mi beca predoctoral y esta tesis saliesen adelante. A nivel profesional gracias por enseñarme gran parte de lo que sé, me has enseñado cómo enfrentar un reto científico, y siempre has estado disponible para ponerte la bata y trabajar codo con codo. Gracias por confiar en mis capacidades y recuerda siempre: ni los ensayos de cuatro etapas son tan malos, ni el oro-plata tan bueno. Sobre todo, a nivel personal gracias por ayudarme a crecer y confiar en mí misma, por las largas charlas en el laboratorio sobre batallitas, la complicidad, las risas, tu apoyo constante y algún que otro consejo; también, por qué no, por las peleas, las lágrimas, las contradicciones, porque gracias a ellas nos hemos llegado a conocer de verdad y a querernos y aceptarnos tal como somos. Me siento muy orgullosa de haberte tenido como director.

Quisiera agradecer también a los demás profesores y profesionales que conforman el grupo. A Luis por su visión crítica, valorar y hacerme ver mi crecimiento científico y ofrecerse siempre a ayudarme cuando lo he necesitado. A María José por tener siempre una palabra amable capaz de endulzar los días. A Miguel Ángel por ser la alegría y locura del departamento. A Nuria, por su cariño, sus charlas y consejos, incluso sus riñas. A Pilar por ayudarme a crecer como docente. A David, por su energía contagiosa y su manera de ver el mundo y la ciencia. A Javi Carrascosa, por su paciencia. A Julia por estar siempre disponible para los demás. A Rosa, Marichu, Patricia Noguera y Patricia Esteve por su profesionalidad, amabilidad y enseñanzas. Enhorabuena a todos, ya que gracias a vuestro esfuerzo constante habéis conseguido construir un grupo con un alto nivel científico, pero sobre todo rico en valores humanos.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a Pedro, por ser el mayor apoyo que he tenido durante estos años. Gracias por aguantar mis dramas, por los audios que parecen podcast desahogándonos, por alegrarte, tanto como yo, de mis éxitos y sufrir conmigo los fracasos, por tener siempre la habilidad de hacerme sentir mejor, por ir de la mano y

crecer juntos en este difícil camino que a veces se hace muy cuesta arriba, pero que por gente como tu merece la pena andarlo. Gracias por demostrar que los mejores resultados se consiguen trabajando en equipo. Gracias por todas las risas que hemos compartido, la complicidad, la paciencia, las listas de reproducción, los stickers, pero sobre todo gracias por ser más que un compañero, ser un amigo de los de para siempre.

Gracias a Gabi, por ser mi compi de bromas y trastadas, por tus consejos de hermano mayor y las meriendas “pre-entrene”, hiciste del laboratorio un hogar para mí. A Salva, por ser el cascarrabias necesario del laboratorio, por tu visión “alentadora” de la ciencia, pero, sobre todo, por estar ahí para escucharme y ayudarme siempre. A Miquel, por tu humor absurdo con el que tanto me identifico, y por ser ese perro delfín que me integró en el grupo. A Augustico, por las caminatas a casa donde hemos solucionado y visto el mundo arder algunas veces, por tus abrazos consoladores, por ser mi primer mejor amigo y compi de mesa del laboratorio. A William, por ver más allá de la rancia Mala José del inicio, por tu profesionalidad y tus ganas de ayudar a los demás, por escucharme y entenderme mientras imprimo en el Biodot, te has hecho un huequito en mi corazón. A Maribel, la mejor compañera que se puede tener, tu trayectoria, fuerza y lucha constante para hacerte un hueco en la ciencia, es un ejemplo a seguir para mí, gracias por todo tu entusiasmo y cariño, y perdona por todas las veces que no te he dejado trabajar o he retrasado tu salida del lab. A Nuria F. por ser la mejor Lulumpa que se puede tener, hay personas que llegan a tu vida para quedarse, y sin duda tú eres una de ellas, gracias por todos los momentos compartidos. A Amadeo por los piques constantes y esa conexión especial que hemos tenido. A Aitor, por demostrarme que a veces las apariencias engañan y que tienes un corazón enorme. A Sara, por darme una diferente visión de las cosas y por ponerme en valor. A Ana por su cariño y por ser mi compañera de reggaetón. A Dani, por su buen humor, chistes malos y juegos de palabras. A Estrella, por los sabios consejos que siempre ofrece. A Yeray por valorar mi profesionalidad y ver esa inocencia en mí. A Julieth por la empatía que demuestra constantemente. A Vicky por la claridad y franqueza con la que habla. A Zeneida, por estar disponible a echarme una mano siempre que lo necesites. A Cynthia por hacer del laboratorio un lugar más organizado. A Andy por su generosidad y ganas de ayudar a los demás. A Rafa, Álvaro (Patrick), Pilar, Paola, Noelle, Eric, Edurne, Ahmed, Sofía, Ana Pilar, Cris y a todos los estudiantes que han pasado por el laboratorio, porque he aprendido algo de cada uno de vosotros y habéis contribuido en cierta medida a esta tesis.A

Desde otra perspectiva, deseo agradecer a la Dra. Dolores Hernández Fernández de Rojas y por extensión al personal del Servicio de Alergia del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, su apoyo y asistencia tanto en la provisión de muestras, en el empleo de los equipos de referencia y de otros medios, así como en la interpretación clínica de resultados. Así mismo agradecer a la profesora Patricia Casino, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su profesionalidad y el amor que pone a la ciencia y todas las cosas que hace, gracias a ti se un poco más de proteínas. También agradecer al profesor Pedro Nieto por ofrecerse a colaborar con la investigación desarrollada en esta tesis.

A mis amigos de siempre, Patri, Inma, Pablo y Lore, por preocuparse por mí y esta tesis, aunque la mayoría del tiempo fuese mi tema tabú. Gracias por los cafés en el Jabeque, las vivencias en el zulo, las mañanas en el parque, en definitiva, gracias por crecer conmigo y compartir todos los momentos importantes de mi vida. A Rafa y Noe, por acompañarme durante toda esta etapa, desde Granada a Valencia, desde los exámenes de Parody en primero hasta el estrés de las semanas antes del depósito. Gracias por todas las bromas, vinos, quemazones de Noe, bailes, gymkhanas, durante estos 13 años, pero sobre todo por aceptar que sois una pareja de tres.

Gracias a Rubén, por ese amor incondicional que me demuestras cada día, por estar ahí en mis días malos y tener ese abrazo cuando todo se venía encima y este camino parecía no tener fin, por apoyarme, cuidarme, creer en mí y no cortarme las alas. Gracias por tu esfuerzo en la etapa final de la tesis. Y sobre todo gracias por querer compartir un futuro conmigo, donde y como sea.

Y por último y más importante quería dar las gracias a mi familia, en especial a mis padres y hermano. Gracias por todas las enseñanzas que me habéis dado. Por luchar diariamente por darme un futuro y hacer que me convierta en la persona que soy hoy en día. Por apoyarme y hacer que luche por mis sueños. Por hacerme ver que siempre vais a estar ahí cuando más lo necesite. Espero algún día poder devolveros un poco de lo mucho que me habéis dado.

RESUMEN

Los fármacos pertenecientes a la familia de los β -lactámicos son los antibióticos más usados en todo el mundo con un consumo global estimado de decenas de miles de millones de dosis diarias definidas. En España, estos fármacos son los antibióticos más prescritos, por su eficacia, seguridad y precio, siendo de primera elección para las infecciones bacterianas más frecuentes. Estudios recientes revelan que hasta un 10 % de la población refiere haber presentado síntomas alérgicos derivados de la administración de antibióticos β -lactámicos. En consecuencia, esta población se considera “alérgica” a estos antibióticos, obligando en caso necesario a la utilización de antibióticos de segunda línea, en ocasiones menos eficaces, seguros y de mayor precio.

En el diagnóstico de la alergia a antibióticos β -lactámicos existen varios tipos de pruebas que sirven para orientar y confirmar la presencia de una alergia, clasificadas como ensayos *in vivo* e *in vitro*. En lo que se refiere a los ensayos *in vivo*, la detección de los procesos alérgicos más comunes se realiza mediante pruebas de exposición oral controladas, y pruebas intraepidérmicas e intradérmicas, observando la reacción que producen los diferentes antibióticos β -lactámicos en el paciente. No obstante, a pesar de su amplia utilización, estas pruebas tienen sus limitaciones como es el riesgo de inducir reacciones alérgicas sistémicas graves. Por todo ello, su práctica requiere personal entrenado para su indicación, realización e interpretación, así como para el tratamiento de cualquier efecto adverso que se produzca. Estos requisitos limitan la realización de este tipo de pruebas a centros hospitalarios especializados y requieren el desplazamiento del paciente.

La aplicación y desarrollo de técnicas de diagnóstico *in vitro* puede salvar estos inconvenientes, teniendo como objetivo llegar a un diagnóstico de la alergia sin que ello suponga riesgos e inconvenientes para el paciente y el sistema de salud. Estas pruebas, al ser mínimamente invasivas no suponen riesgo de reacciones adversas ni requieren preparación previa del paciente. Entre las distintas pruebas serológicas y celulares que se pueden emplear, la detección de IgE específica es una de las más extendidas debido a que, dada su sensibilidad y especificidad, complementa el diagnóstico clínico de la enfermedad alérgica, ofrece seguridad, y proporciona resultados cuantitativos.

Los sistemas de diagnóstico *in vitro* actuales utilizan instrumentación analítica cara y aparatosa, así como materiales desechables caros, manejados por personal cualificado, por lo que este tipo de pruebas se realizan únicamente por servicios de alergia y/o análisis clínicos de grandes centros sanitarios o por compañías especializadas. En consecuencia, hay una necesidad de desarrollar nuevos métodos de diagnóstico que cumplan los requisitos de sensibilidad, rapidez, sencillez, multiplexado y portabilidad, a un precio reducido para su implantación en todo tipo de laboratorios clínicos de los diferentes niveles de atención sanitaria.

Por este motivo, en esta tesis doctoral se plantea como objetivo principal la puesta a punto de un inmunoensayo múltiple, utilizando la tecnología de disco compacto para la detección y cuantificación *in vitro* de niveles de IgE específica a un amplio espectro de antibióticos β -lactámicos en muestras de suero humano.

Las limitaciones más críticas para la determinación de IgE específica multianálito mediante métodos inmunoquímicos son las relacionadas con la sensibilidad y selectividad. Por lo tanto, una parte importante de la tesis se ha centrado en la preparación y caracterización de un panel de antígenos β -lactámicos, selección de inmunoreactivos, formato y estudio de diferentes parámetros claves del inmunoensayo.

Otra parte importante de la tesis se ha enfocado en abordar la mejora de la reproducibilidad de los resultados. La estrategia ha consistido en estudiar diferentes modos de calibración con el objetivo de estandarizar la cuantificación de los métodos de diagnóstico *in vitro* de este tipo de alergias. Para ello, se han evaluado las prestaciones de la calibración homóloga, heteróloga y el uso de un patrón interno, comparado sus prestaciones analíticas (relación señal ruido, sensibilidad, reproducibilidad, etc.) con el sistema de referencia.

Finalmente, se llevó a cabo la validación del inmunoensayo con un conjunto de 101 muestras de suero de pacientes y controles. Los resultados obtenidos han sido comparados con los obtenidos mediante las técnicas de referencia, mostrando una mejor sensibilidad, especificidad, precisión, y linealidad.

La capacidad múltiple de la tecnología de disco compacto permitió llevar a cabo paralelamente estudios de reactividad cruzada frente a diferentes antibióticos β -lactámicos tanto de la familia de las penicilinas, como de otras familias, esclareciendo el

patrón de reconocimiento. En esta línea de trabajo, el uso de otras estrategias de conjugación de haptenos ha resultado en la mejora de la sensibilidad clínica del ensayo, identificando nuevos epítomos. Este estudio permitió clasificar los pacientes en cuatro perfiles en función del patrón de reconocimiento, lo que podría ser de gran utilidad a la hora de establecer tratamientos clínicos alternativos.

En resumen, las investigaciones realizadas han permitido desarrollar nuevos formatos de ensayo y conocimientos inmunoquímicos aplicados a la tecnología de disco compacto, aportando nuevas y mejores herramientas de diagnóstico clínico que permiten la determinación simultánea de IgE específica de un amplio espectro de antibióticos β -lactámicos en suero humano por debajo de los niveles alcanzados por los métodos *in vitro* de referencia. A partir de todo ello, se ha desarrollado un sistema de análisis multiplex, microfluídico y semiautomatizado.

RESUM

Els fàrmacs pertanyents a la família dels β -lactàmics són els antibiòtics més usats al món amb un consum global estimat de desenes de milers de milions de dosis diàries definides. A Espanya, aquests fàrmacs són els antibiòtics més prescrits, per la seua eficàcia, seguretat i preu, i són de primera elecció per a les infeccions bacterianes més freqüents. Tot i això, fins a un 10 % de la població reconeix haver patit símptomes al·lèrgics derivats de l'administració d'antibiòtics β -lactàmics. En conseqüència, aquesta porció de la població es considera "al·lèrgica" a aquests fàrmacs, el que deriva en la utilització d'altres antibiòtics, de vegades insegurs i menys eficaços.

En el diagnòstic de l'al·lèrgia a antibiòtics β -lactàmics hi ha diversos tipus de proves que serveixen per orientar i confirmar la presència d'una al·lèrgia, classificades com a assaigs *in vivo* i *in vitro*. Pel que fa als assaigs *in vivo*, la detecció dels processos al·lèrgics més habituals es realitza mitjançant proves d'exposició oral controlada, i proves intraepidèrmiques i intradèrmiques, observant la reacció que produeixen els diferents β -lactàmics al pacient. Tot i la seua àmplia utilització, aquestes proves tenen limitacions com els falsos positius, la falta de selectivitat, i el més important, el risc d'induir reaccions al·lèrgiques sistèmiques greus. Per tot això, cal personal format per a la indicació, realització i interpretació, així com per a tractar qualsevol efecte advers que es produísca derivat d'aquestes proves. Aquests requisits limiten la realització d'aquest tipus de proves a centres hospitalaris especialitzats i impliquen la necessitat de desplaçament del pacient.

L'aplicació i el desenvolupament de tècniques de diagnòstic *in vitro* pot vèncer aquests inconvenients, i té com a objectiu l'obtenció d'un diagnòstic de l'al·lèrgia sense riscos i inconvenients ni per al pacient ni per al sistema nacional de salut. Aquestes proves, per ser mínimament invasives, no suposen risc de reaccions adverses ni requereixen preparació prèvia del pacient. Entre les diferents proves serològiques i cel·lulars que es poden emprar, la detecció d'IgE específica és una de les més esteses pel fet que, considerant la seua sensibilitat i especificitat, ajuda al diagnòstic precís de la malaltia al·lèrgica, ofereix seguretat i proporciona resultats quantitius.

Els sistemes de diagnòstic *in vitro* en ús utilitzen una instrumentació analítica important, emprada per personal qualificat, així com materials d'un sol ús que són cars, per la qual cosa aquest tipus de proves es realitzen únicament per serveis d'al·lèrgia i/o

d'anàlisis clíniques de grans centres sanitaris o bé per companyies especialitzades en diagnòstic clínic. D'altra banda, cap d'aquests assaigs està validat, el que dóna una idea de la dificultat per a desenvolupar assajos de diagnòstic d'al·lèrgies, a fàrmacs en general i a β -lactàmics en particular, i de les debilitats que tenen els que són utilitzats. En conseqüència, hi ha una necessitat que justifica el desenvolupament de nous mètodes de diagnòstic que acomplisquen els requisits de sensibilitat, rapidesa, senzillesa, multiplexat i portabilitat, a un preu reduït, per a la seua implantació en tot tipus de laboratoris clínics dels diferents nivells d'atenció sanitària.

Per aquest motiu, en la present tesi doctoral es planteja com a objectiu principal la posada a punt d'un immunoassaig múltiple, basat en tecnologia de disc compacte per a la detecció i quantificació *in vitro* de nivells d'IgEs específiques d'un ampli espectre d'antibiòtics β -lactàmics a mostres de sèrum.

Les limitacions més crítiques per a la determinació d'IgE específica multianalit mitjançant mètodes immunoquímics són les relacionades amb la sensibilitat, selectivitat i processament simultani de diversos assaigs i diferents analits a concentracions molt baixes. Per tant, una part important de la tesi s'ha centrat en la selecció d'antígens, immunoreactius i format i en la optimització de diferents paràmetres clau en l'immunoassaig.

Una altra part important de la tesi s'ha centrat en assolir la sensibilitat i la selectivitat requerides per a determinar els nivells d'IgE específica presents en sèrum. D'altra banda, la millora de la reproductibilitat dels resultats també ha estat un objectiu crític abordat. L'estratègia ha consistit en estudiar diferents sistemes de calibratge amb l'objectiu d'estandarditzar la quantificació dels mètodes de diagnòstic *in vitro* d'aquest tipus d'al·lèrgies.

Finalment, la validació de l'assaig desenvolupat es va fer amb un conjunt de 101 mostres de sèrum de pacients i controls. Els resultats obtinguts han sigut comparats amb els obtinguts mitjançant les tècniques de referència, mostrant una millor sensibilitat, especificitat, precisió i linealitat.

La capacitat múltiple de la tecnologia de disc compacte va permetre dur a terme paral·lelament estudis de reactivitat creuada davant de diferents antibiòtics β -lactàmics tant de la família de les penicil·lines, com d'altres famílies, aclarint el patró de

reconeixement. En aquesta línia de treball, l'ús d'altres estratègies de conjugació d'haptens ha suposat la millora de la sensibilitat clínica de l'assaig, identificant nous epítops. Aquest estudi va permetre classificar els pacients en quatre tipus en funció del patró de reconeixement, cosa que podria ser molt útil a l'hora d'establir tractaments clínics alternatius.

En resum, les investigacions realitzades han permès desenvolupar nous formats d'assaig i coneixements immunoquímics, i han aportat noves i millors eines de diagnòstic clínic *in vitro* que permeten la determinació simultània d'IgE específica d'un ampli espectre d'antibiòtics β -lactàmics en sèrum humà, per baix dels nivells aconseguits pels mètodes *in vitro* de referència. Aquesta informació s'ha fet servir per al desenvolupament final d'un assaig multianalit i multimostra d'un sistema semi automatitzat.

ABSTRACT

β -lactam antibiotics are one of the most widely used antimicrobials worldwide. It has been estimated that at least tens of billions of doses are consumed daily. In Spain, these drugs are the most prescribed antibiotics, due to their efficacy, safety and price. These advantages make beta lactam antibiotics the first choice for the most frequent bacterial infections. However, up to 10 % of the population reports having presented allergic symptoms derived from their consumption. Consequently, this portion of the population is considered "allergic" to these antibiotics, forcing the use of less effective, safer and more expensive second-line antibiotics.

In the diagnosis of allergy to β -lactam antibiotics there are several types of tests that serve to orient and confirm the presence of an allergy. These diagnostic methods are classified as *in vivo* and *in vitro* assays. Regarding *in vivo* tests, the most standardized tests are the provocation, prick and intradermal test. The aim of these assays is to observe the response produced by the different beta-lactam antibiotics in the patient after oral or cutaneous administration. Despite their wide use, these tests have their limitations, such as the risk of inducing severe systemic allergic reactions. Therefore, their practice requires specialized professionals for their indication, performance and interpretation, as well as for the treatment of any adverse effects that may occur. These requirements limit the performance of this type of test to specialized hospitals and require the displacement of the patient.

The use and development of *in vitro* diagnostic techniques can overcome these disadvantages and allow the diagnosis of allergy without risks and inconveniences for the patient and the health system. *In vitro* assays are less invasive and therefore neither pose a risk of adverse reactions nor require prior preparation of the patient. Among the different serological and cellular tests that can be used, the detection of specific IgE is one of the most widespread due to its sensitivity and specificity. This technique aids in the accurate diagnosis of allergic disease, offers safety and provides quantitative results.

Current *in vitro* diagnostic systems use expensive and bulky analytical instrumentation and high-cost single-use materials, handled by qualified professionals. Therefore, such tests are performed only by allergy and/or clinical analysis services of hospitals or by companies specialized in clinical diagnostics. Consequently, there is a

need to develop new diagnostic methods that can be implemented in all types of clinical laboratories at diverse levels of health care, meeting the requirements of sensitivity, speed, simplicity, multiplexing and portability at a reduced price.

For this reason, the main objective of this doctoral thesis is the development of a multiplex immunoassay using compact disc technology for the detection and quantification of specific IgE levels to a wide variety of β -lactam antibiotics in human serum samples.

The most crucial limitations for the determination of multianalyte specific IgE by immunochemical methods are those related to sensitivity and selectivity. Hence, an important part of the thesis has been focused on the preparation and characterization of a pool of beta-lactam antigens, selection of immunoreagents, format and optimization of different critical parameters of the immunoassay.

Another important aspect of the thesis has been focused on improving the reproducibility of the results. The strategy consisted of studying different calibration systems with the aim of standardizing the quantification of *in vitro* diagnostic tests for this type of allergy. To achieve that goal, the performance of homologous and heterologous calibration and the use of an internal standard have been evaluated, comparing their analytical performance (signal-to-noise ratio, sensitivity, reproducibility, etc.) with the reference system.

Finally, the validation of the immunoassay was performed with a total of 101 serum samples from patients and controls. The results obtained have been compared with those obtained using the reference techniques, showing improved sensitivity, specificity, precision, and linearity.

The multiplex capability of the compact disc technology allowed carrying out parallel cross-reactivity studies against different beta-lactam antibiotics both from the penicillin family and from other families, elucidating the recognition profile. Following this working line, the use of other hapten conjugation strategies improved clinical sensitivity of the assay by identifying new epitopes. This study has allowed the classification of patients into four classes according to the recognition profile, which could be of interest to establish alternative clinical treatments.

In summary, the performed research has allowed the development of new assay formats and immunochemical knowledge applied to compact disc technology, providing new and improved clinical diagnostic tools that allow the simultaneous determination of specific IgE of a broad spectrum of β -lactam antibiotics in human serum below the levels achieved by reference *in vitro* methods. This information has been used for the final development of a microfluidic, semi-automated system

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

Juárez, M. J., Morais, S., & Maquieira, A. (2021). Digitized microimmunoassays with nuclear antigens for multiplex quantification of human specific IgE to β -lactam antibiotics. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 328, 129060.

Juárez, M. J., Ibañez-Echevarria, E., Hernández-Fernández de Rojas, D., Maquieira, A., & Morais, S. (2021). Multiplexed analytical approaches to beta-lactam allergy *in vitro* testing standardization. *Analytical chemical acta*, 1173, 338656.

Juárez, M. J., Ibañez-Echevarria, E., Hernández-Fernández de Rojas, D., Nieto, P., Maquieira, A., & Morais, S. Screening of the sensitization profile of β -lactam antibiotic allergy by *in vitro* test. (*En redacción*)

PUBLICACIONES DERIVADAS DE RESULTADOS Y REACTIVOS DE ESTA TESIS

Quintero-Campos, P., **Juárez, M. J.**, Morais, S., & Maquieira, A. (2020). Multiparametric Highly Sensitive Chemiluminescence Immunoassay for Quantification of β -Lactam-Specific Immunoglobulin E. *Analytical Chemistry*, 92(21), 14608-14615.

Mas, S., Badran, A. A., **Juárez, M. J.**, de Rojas, D. H. F., Morais, S., & Maquieira, Á. (2020). Highly sensitive optoelectrical biosensor for multiplex allergy diagnosis. *Biosens. Bioelectron*, 166, 112438.

Peña-Mendizabal, E., Morais, S., & Maquieira, Á. (2020). Boosting the sensitivity of *in vitro* β -lactam allergy diagnostic tests. *Chemical Communications*, 56(80), 11973-11976.

Peña-Mendizabal, E., Morais, S., & Maquieira, Á. (2020). Neo-antigens for the serological diagnosis of IgE-mediated drug allergic reactions to antibiotics cephalosporin, carbapenem and monobactam. *Scientific reports*, 10(1), 1-12.

COMUNICACIONES EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

Título: Chemical strategies for designing structural determinants for β -lactam allergy.

Autores: Sergi Morais, María José Juárez, Edurne Peña, Salvador Mas, Luis Antonio Tortajada, María Estrella Fernández, Ángel Maquieira.

Congreso: XXXVI Reunión Bienal de la Real Sociedad Española De Química (RSEQ)

Fecha:29/06/2016

Título: Diagnóstico *in vitro* de alergia a antibióticos beta-lactámicos

Autores: María José Juárez, Sergi Morais, Luis Antonio Tortajada, Rosa Puchades, Ángel Maquieira.

Congreso: X International Workshop on Sensors and Molecular Recognition

Fecha:08/07/2016

Título: Estrategias químicas de anclaje covalente de alérgenos a superficies de policarbonato.

Autores: María José Juárez, Sergi Morais, Ángel Maquieira.

Congreso: XI International Workshop on Sensors and Molecular Recognition

Fecha:07/07/2017

Título: Covalent anchoring of beta-lactam determinants on digital surface for developing *in vitro* test for the diagnosis of allergy.

Autores: Sergi Morais, María José Juárez, Edurne Peña, Salvador Mas, Luis Antonio Tortajada, Ángel Maquieira.

Congreso: 8th Drug Hypersensitivity Meeting (DHM 2018)

Fecha:21/04/2018

Título: Desarrollo de microarrays para la determinación de IgE específica para aztreonam.

Autores: María José Juárez, Ana Julia Oto, Ethel Ibáñez, Dolores Hernández, Sergi Morais, Ángel Maquieira.

Congreso: XII International Workshop on Sensors and Molecular Recognition

Fecha:06/07/2018

Título: Diagnóstico *in vitro* de reactividad cruzada en la alergia a antibióticos β -lactámicos.

Autores: María José Juárez, Sergi Morais, Ángel Maquieira.

Congreso: XIII International Workshop on Sensors and Molecular Recognition

Fecha:05/07/2019

Título: Microinmunoensayos para la determinación multiplex de IgE específica de antibióticos beta-lactámicos en suero humano.

Autores: María José Juárez, Sergi Morais, Ángel Maquieira.

Congreso: XIII International Workshop on Sensors and Molecular Recognition

Fecha:05/07/2019

Título: Aproximaciones analíticas para el diagnóstico *in vitro* de reacciones alérgicas.

Autores: Cristina Serrano, María José Juárez, Sergi Morais, Ángel Maquieira.

Congreso: XIII International Workshop on Sensors and Molecular Recognition

Fecha:08/07/2019

Título: Highly improved sensitive *in vitro* drug allergy test using a collection of new beta-lactam protein antigens.

Autores: María José Juárez, Pedro Quintero, Sergi Morais, Ángel Maquieira.

Congreso: European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress (EAACI)

Fecha:08/06/2020

Título: *In vitro* detection of amoxicillin allergy by luminescent immunoassay

Autores: Pedro Quintero, María José Juárez, Sergi Morais, Ángel Maquieira.

Congreso: European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress (EAACI)

Fecha:08/06/2020

Título: Moving towards advanced *in vitro* diagnostics for drug allergy

Autores: Sergi Morais, María José Juárez, Salvador Mas, Pedro Quintero, Edurne Peña, María Estrella Fernández, Luis Antonio Tortajada, Ángel Maquieira.

Congreso: Rapid Methods Europe 2021

Fecha:03/02/2021

ÍNDICE

ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS	I
GLOSARIO DE TÉRMINOS	III
ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hipersensibilidad provocada por fármacos	3
1.2. Mecanismo de interacción fármaco-sistema inmunitario.....	8
1.3. Alergia a antibióticos β -lactámicos	10
1.4. Diagnóstico de alergia a antibióticos β -lactámicos	33
1.5. Ensayos bioanalíticos basados en tecnología de disco compacto.	50
2. OBJETIVOS.....	59
3. MATERIALES Y MÉTODOS	63
3.1. Reactivos y disoluciones	65
3.2. Instrumentación	66
3.3. Preparación de reactivos.....	67
3.4. Cuantificación y caracterización de reactivos	71
3.5. RMN-STD	74
3.6. Protocolos de ensayo	75
3.7. Estrategias de calibración	81
3.8. Muestras de suero sanguíneo.....	83
3.9. Lectura y adquisición de datos	83
4. RESULTADOS	87
4.1. Puesta a punto del ensayo de detección de IgE específica a fármacos.....	90
4.2. Puesta a punto del ensayo de IgE total	112
4.3. Preparación de antígenos β -lactámicos.	116

4.4. Evaluación y validación de las prestaciones analíticas del ensayo con los antígenos de HSA y H1.	132
4.5. Mejora de las prestaciones analíticas del sistema a través de la calibración del método	136
4.6. Prestaciones clínicas del ensayo.....	156
4.7. Patrones de sensibilización.....	158
4.8. Comparación de los resultados obtenidos en un inmunoensayo <i>in vitro</i> multianalito simultaneo mediante tecnología de disco compacto en dos formatos: manual y semiautomatizado.....	172
5. CONCLUSIONES.....	179
6. BIBLIOGRAFIA.....	185
7. ANEXO 1 Caracterización clínica de los pacientes alérgicos y controles	203
8. ANEXO 2 Concentración de sIgE de pacientes y controles	213

ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
AMP	Ampicilina
AMX	Amoxicilina
AZT	Aztreonam
BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
BP	Hemocianina de <i>Concholepas concholepas</i>
CEF	Cefalosporinas
CFC	Cefaclor
CFL	Cefalexina
CFN	Cefoxitina
CFO	Cefotaxima
CFR	Cefuroxima
CFT	Ceftriaxona
CLIA	Inmunoensayo quimioluminiscente
CRB	Carbenicilina
CVL	Ácido clavulánico
DVD-R	Disco versátil digital grabable
EC50	Concentración media máxima eficaz
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ERP	Ertapenem
Fab	Región variable del anticuerpo
FcεR1	Receptor de la fracción constante de la IgE
GAM	IgG de cabra anti-IgG de ratón
H1	Histona H1 de timo de ternero
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HSA	Albúmina de suero humano
IMP	Imipenem
KLH	Hemocianina de <i>Megathura crenulata</i>

LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
mAb	Anticuerpo monoclonal
MB	Monobactamas
MDM	Mezcla de determinantes menores
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MRGPRX2	Miembro receptor acoplado a la proteína G relacionado con MAS
MRP	Meropenem
NHS	N-hidroxisuccinimida
NMBA	Agente bloqueante neuromuscular
pAb	Anticuerpo policlonal
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Policarbonato
PG	Penicilina G
PLL	Poli-L-lisina
PPD	4-metoxi-4-(3-fosfatofenil)-spiro-(1,2-dioxetano-3,2'-adamantano)
PPR	Piperacilina
RAST	Prueba de radioalergosorbencia
RCM	Medio de radio contraste
ROC	Característica Operativa del Receptor
RSD	Desviación estándar relativa
rIgE	IgE recombinante
S/N	Relación señal/ruido
sIgE	IgE Específica
TCL	Ticarcilina
tIgE	IgE total
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbencidina
STV	Estreptavidina
UI	Unidad internacional
αIgE	IgG anti-IgE humana

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Antígeno: Cualquier sustancia capaz de activar una respuesta inmunitaria, especialmente la activación de linfocitos y generación de anticuerpos.

Alérgeno: Antígeno que induce una reacción de hipersensibilidad o alergia.

Determinante antigénico o epítipo: Parte específica de un antígeno que es reconocida por el sistema inmunitario.

Hapteno: Molécula de masa molecular inferior a 1000 Da, que por sí misma es incapaz de activar la respuesta inmunitaria, pero puede unirse a transportadores como proteínas para dar lugar a antígenos.

Sensibilidad clínica: Probabilidad de un método de clasificar correctamente a un sujeto enfermo. Este parámetro clínico se calcula como:

$$\text{Sensibilidad clínica} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Total de pacientes positivos}} \times 100$$

Especificidad clínica: Probabilidad de que un sujeto sano de un resultado negativo tras la realización del ensayo. Este parámetro clínico se calcula como:

$$\text{Especificidad clínica} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Total de controles negativos}} \times 100$$

Sensibilidad analítica: Capacidad de un sistema para discriminar entre pequeñas diferencias de concentración del analito.

Límite de detección (LOD): Cantidad mínima de analito que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico. El límite de detección es calculado interpolando en la curva de calibrado, el valor medio de la señal de 10 medidas del blanco más tres veces la desviación estándar.

$$LOD = \text{Blanco} + 3 \cdot SD_{\text{blanco}}$$

Límite de cuantificación (LOQ): Mínima cantidad de analito que puede ser cuantificada con fiabilidad por un método analítico. Se calcula interpolando en la curva de calibrado el valor medio de la señal de 10 medidas del blanco más 10 veces la desviación estándar.

$$LOQ = \text{Blanco} + 10 \cdot SD_{\text{blanco}}$$

EC50: Concentración de analito que produce el 50 % de la señal máxima del sistema.

Selectividad: Habilidad de un método para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes con un comportamiento similar.

Desviación estándar relativa (RSD): Es un valor estadístico que describe la propagación de los datos con respecto a una media. Este valor se expresa en porcentaje y se calcula:

$$RSD (\%) = \frac{\text{desviación estandar}}{\text{media}} \times 100$$

Precisión intradisco: Grado de concordancia entre los resultados obtenidos de réplicas de un ensayo en un mismo disco expresado en términos de RSD.

Precisión interdisco: Grado de concordancia entre los resultados obtenidos de réplicas de un ensayo en diferentes discos expresado en términos de RSD.

Robustez: Capacidad de un sistema de mantener una respuesta inalterada tras modificar algún parámetro característico del método.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fármacos causantes de hipersensibilidad.	3
Tabla 2. Clasificación de reacciones inmunogénicas según Gell-Coombs.	4
Tabla 3. Similitud entre las cadenas R ₁ y R ₂ de los diferentes antibióticos β-lactámicos.	30
Tabla 4. Estructura química de las cadenas laterales de los antibióticos β-lactámicos.	32
Tabla 5. Ventajas y desventajas del ensayo de provocación. ¹⁵⁹	36
Tabla 6. Clasificación de pacientes alérgicos de acuerdo con la concentración de IgE específica presente en suero.	40
Tabla 7. Características analíticas y clínicas de ensayos in vitro comerciales para la determinación de IgE específica en suero.	42
Tabla 8. Resumen de los resultados de sensibilidad y especificidad clínica de la prueba ImmunoCAP obtenidos en los diferentes estudios realizados hasta la fecha.	45
Tabla 9. Ventajas e inconvenientes del formato de micromatriz.	52
Tabla 10. Aplicaciones analíticas de la tecnología de disco compacto integrado.	56
Tabla 11. Ángulos de contacto obtenidos en la activación química del DVD (n=3). ...	95
Tabla 12. Prestaciones analíticas obtenidas para los dos tipos de inmovilización.	99
Tabla 13. Características analíticas de los ensayos desarrollados para la determinación de IgE específica.	112
Tabla 14. Características de los compuestos utilizados como transportador.	117
Tabla 15. Resumen de las prestaciones analíticas de los ensayos desarrollados utilizando los cinco antígenos estudiados.	120
Tabla 16. Valores del pI de los antígenos de HSA y H1.	126
Tabla 17. Relación molar hapteno/HSA de los antígenos β-lactámicos calculada por MALDI-TOF	128
Tabla 18. Composición elemental (N, C, H, S) de la proteína H1 y los antígenos H1-PG y H1-AMX-4x.	130
Tabla 19. Límite de detección obtenido para cada una de las diluciones de la matriz.	138
Tabla 20. Resultados de la cuantificación de IgE específica de PG mediante calibración homóloga externa y con patrón interno.	152
Tabla 21. Resultados de la cuantificación de IgE específica de AMX mediante calibración homóloga externa y con patrón interno.	152

Tabla 22. Comparación de las prestaciones analíticas obtenidas con cada uno de los métodos de calibración estudiados.	156
Tabla 23. Datos de reactividad cruzada mostrada por anticuerpos derivados de diferentes β -lactámicos.	160
Tabla 24. Concentración de sIgE frente a diversos β -lactámicos en muestras de pacientes con IgE específica frente a PG y AMX.	166
Tabla 25. Reactividad de las muestras de pacientes alérgicos a los determinantes menores de PG, CRB y TCC.	169
Tabla 26. Clasificación de pacientes siguiendo el criterio del patrón de reconocimiento.	171
Tabla 27. Características y prestaciones clínicas obtenidas para los sistemas de detección de IgE específica a β -lactámicos basados en disco compacto, manual (DVD) y semiautomatizado (COBIOPHAD), e ImmunoCAP.	178

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de actuación de la hipersensibilidad mediada por IgE (tipo I).	5
Figura 2. Esquema de los modos de activación de mastocitos mediados por fármacos.	6
Figura 3. Esquema del tipo de anafilaxis generada en función de la relación de antígenos y anticuerpos (adaptada). ¹⁴	7
Figura 4. Representación de las cuatro hipótesis del mecanismo de interacción fármaco-sistema inmunitario.	8
Figura 5. Estructura química de las familias de antibióticos β -lactámicos.	12
Figura 6. Estructura de los determinantes antigénicos de la PG.	15
Figura 7. Mecanismo de degradación de la AMX. ⁴²	15
Figura 8. Mecanismo de conjugación de cefalosporinas (A) y cefalosporinas aminadas (B) a proteínas mediante la ruptura del anillo β -lactámico. ⁵⁶	17
Figura 9. Mecanismo de conjugación y degradación del CVL (adaptada). ⁶⁷	19
Figura 10. Residuos de lisina modificados por la PG en la HSA.	21
Figura 11. Estructura química de los determinantes antigénicos sintetizados con octa-lisina.	24
Figura 12. Estructura química tridimensional de los dendrímeros.	25
Figura 13. Protocolo de actuación para el diagnóstico de alergia a β -lactámicos.	33
Figura 14. Métodos in vivo de diagnóstico de la alergia a antibióticos β -lactámicos: prick test (A) y prueba intradérmica (B).	34
Figura 15. Inmunoensayo más frecuente para la determinación de IgE específica (A). Sistemas de calibración actuales para la cuantificación de IgE en los ensayos in vitro (B).	40
Figura 16. Esquema de los principales ensayos comerciales de diagnóstico in vitro de reacciones alérgicas a antibióticos β -lactámicos.	41
Figura 17. Ejemplo de dispositivos lab-on-a-disc.	51
Figura 18. Funcionalización química de policarbonato.	53
Figura 19. Principio de detección de la tecnología de disco compacto. Diagrama del cabezal óptico (A). Intensidad del haz reflejado en un blanco (B) y una muestra positiva(C).	54
Figura 20. Esquema de la formación del antígeno mediante hidrólisis básica del anillo β -lactámico.	68

Figura 21. Esquema de la formación del antígeno mediante la química de las carbodiimidas.	69
Figura 22. Esquema de la formación del antígeno mediante la reacción de Mannich. .	70
Figura 23. Esquema de una de las 20 micromatrices impresas en la superficie del DVD.	76
Figura 24. Esquema del inmunoensayo de determinación de sIgE de tres etapas.	76
Figura 25. Esquema del inmunoensayo multiplex de determinación de IgE específica de cuatro etapas utilizando GAM-HRP (A) y STV-HRP (B) como especies detectoras....	77
Figura 26. Esquema del inmunoensayo reverso de determinación de sIgE.	78
Figura 27. Esquema del inmunoensayo de evaluación de reactividad cruzada con IgG específica frente a β -lactámicos.....	79
Figura 28. Esquema de modificación química de la superficie del disco para el anclaje de antibióticos β -lactámicos.	80
Figura 29. Esquema de las rutas de anclaje covalente de antibióticos β -lactámicos a la superficie de policarbonato aminada.	80
Figura 30. Representación esquemática de las cuatro estrategias de calibración evaluados.	81
Figura 31. Matriz del ensayo con las distintas estrategias de calibración (panel I). Los paneles II-V muestran los resultados de la evaluación de diluciones 1/4 del patrón de IgE total (calibración (1) y (3)). Los paneles VII-XI muestran los resultados de la evaluación de diluciones 1/4 de un conjunto de muestras de concentración conocida de IgE dopada con 4.5 UI/mL de patrón interno (calibración (2), (3) y (4))......	82
Figura 32. Esquema electrónico del lector de discos.	85
Figura 33. Estudio de la concentración de impresión del antígeno utilizando qIgE anti-PG.	91
Figura 34. Efecto del pH del tampón de impresión en la sensibilidad del ensayo de determinación de IgE.....	92
Figura 35. Estudio de selectividad del ensayo con antígenos de diferentes familias de antibióticos BL.	93
Figura 36. Variación de la señal con la concentración de inmovilización para el anclaje del antibiótico siguiendo la lisis básica del anillo β -lactámico (ruta A) y la química de la carbodiimida (ruta B).....	96

Figura 37. Evaluación del reconocimiento obtenido de la sIgE anti-PG frente a diferentes β -lactámicos inmovilizados sobre la superficie del disco mediante anclaje covalente. .	97
Figura 38. Esquema del diseño de impresión de antibióticos inmovilizados covalentemente sobre la superficie (I), imagen de los resultados obtenidos con 25 UI/mL de qIgE anti-PG (II) y 17 UI/mL de qIgE anti-AZT(III).....	98
Figura 39. Curvas de calibrado del ensayo para la determinación de IgE específica anti-PG mediante en anclaje covalente de PG (n=3) e inmovilización pasiva de C1-PG (n=10).	98
Figura 40. Efecto del tiempo de incubación de la muestra de suero en el reconocimiento de la IgE específica.....	100
Figura 41. Titulación de la especie detectora, anticuerpo detector pAb-HRP (A) y mAb-HRP(B), en un ensayo de determinación de IgE específica de tres etapas.	101
Figura 42. Estudio comparativo de la sensibilidad del ensayo indirecto de tres etapas de detección de IgE específica frente a PG utilizando pAb-HRP y mAb-HRP como especie detectora.....	102
Figura 43. Titulación de la concentración de Ab-biot (A) y la STV-HRP (B) en un ensayo indirecto de 4 etapas.	103
Figura 44. Respuesta de los anticuerpos biotinilados en un ensayo de 4 etapas (A). Curvas de calibrado de qIgE-PG utilizando diferentes anticuerpos de detección (B).	105
Figura 45. Titulación de la concentración anticuerpo primario (mAb (A) y pAb (C)) y secundario (GAM-HRP (B) y RAG-HRP (D) en un ensayo de determinación de IgE de cuatro etapas.	106
Figura 46. Curvas de calibrado obtenidas en un ensayo indirecto de cuatro etapas con los diferentes anticuerpos de detección.	107
Figura 47. Resultados del análisis de muestras de pacientes alérgicos (P) y controles (C) con el ensayo indirecto de cuatro etapas.	108
Figura 48. Titulación de la concentración de antígeno biotinilado (A) y STV-HRP (B) de un ensayo reverso de determinación de IgE.	110
Figura 49. Sensibilidad obtenida en el ensayo reverso de detección de IgE específica con cada uno de los cuatro anticuerpos de captura utilizados.	110
Figura 50. Evaluación del efecto de la concentración de IgE total en la determinación de IgE específica.	111
Figura 51. Variación de señal con la concentración de anticuerpo de captura.....	113

Figura 52. Evaluación del pH del tampón de impresión en la inmovilización del anticuerpo de captura.....	114
Figura 53. Evaluación de las especies de captura en un ensayo de determinación de IgE total de cuatro etapas.	115
Figura 54. Curva de calibrado heteróloga para la cuantificación de IgE ($R^2=0.999$). Las líneas horizontales delimitan el LOD y LOQ.....	116
Figura 55. Efecto de la relación molar (β -lactámico/proteína) en el reconocimiento de la IgE específica para los antígenos derivados.	118
Figura 56. Curva de calibrado para los 5 antígenos de PG seleccionados.	119
Figura 57. Comparativa del reconocimiento de la IgE por los antígenos de PG y AMX con las proteínas HSA (A) y H1 (B).....	121
Figura 58. Reacción de la AMX tras la apertura del anillo β -lactámico.	121
Figura 59. Resultado de la determinación del porcentaje de conjugación para los antígenos de PG utilizando el método del TNBS.	123
Figura 60. Imagen del gel de electroforesis de los antígenos de HSA-PG y H1-PG preparados a diferentes relaciones molares.	124
Figura 61. Imagen del gel de electroforesis de los antígenos de HSA-AMX y H1-AMX.	125
Figura 62. Cromatograma de intercambio iónico de los antígenos H1-PG y HSA-PG por la columna de cromatografía de intercambio iónico.	127
Figura 63. Estudio de la sensibilidad alcanzada con los antígenos purificados.	127
Figura 64. Espectro MALDI-TOF de los antígenos HSA-PG, HSA-AMX y la proteína HSA.	129
Figura 65. Espectro MALDI-TOF del antígeno H1-AMX y la proteína H1.	130
Figura 66. Evaluación de la reproducibilidad de la conjugación de tres lotes de antígenos de PG(A) y AMX(B).....	131
Figura 67. Estudio de linealidad utilizando una muestra positiva de concentración conocida y un conjunto de controles negativos como diluyente. El porcentaje de recuperación para cada dilución representado en la gráfica insertada fue calculado como la relación entre el valor experimental y el valor esperado de acuerdo a la dilución...	134
Figura 68. Estudio de correlación entre el ensayo en DVD utilizando calibración heteróloga en PBST e ImmunoCAP para los antígenos H1-PG, H1-AMX, HSA-PG y HSA-AMX.	135

Figura 69. Curva de calibración heteróloga utilizando PBST o suero sin IgE como diluyentes del patrón de IgE total (OMS).....	136
Figura 70. Efecto de la dilución del suero en el ensayo de determinación de IgE total.	137
Figura 71. Ángulos de contacto de la superficie tras la incubación de una muestra de suero acondicionada con diferentes concentraciones de Tween 20.	139
Figura 72. Efecto de la concentración de Tween 20 en el reconocimiento de IgE en muestras de suero sanguíneo.	140
Figura 73. Estudio de correlación entre el sistema en DVD utilizando calibración heteróloga en suero sanguíneo e ImmunoCAP para los antígenos de PG y AMX.	141
Figura 74. Curvas de calibrado heteróloga (n=15) y homóloga (n=30).	143
Figura 75. Estudio de correlación entre el sistema en DVD utilizando calibración homóloga e ImmunoCAP para los antígenos H1-PG y H1-AMX.	144
Figura 76. Variabilidad de la respuesta de los controles positivos en el rango lineal.	145
Figura 77. Correlación entre el ensayo en DVD utilizando la calibración homóloga interna en suero sanguíneo e ImmunoCAP para los antígenos H1-PG y H1-AMX.....	146
Figura 78. Respuesta analítica del patrón interno frente al antígeno de AZT.....	148
Figura 79. Evaluación de la selectividad del patrón interno.	149
Figura 80. Evaluación de la estabilidad de la IgE quimérica en suero sanguíneo.....	150
Figura 81. Curvas de calibrado para la cuantificación de IgE específica frente a PG y AMX usando el método del patrón interno.	151
Figura 82. Efecto de la matriz de la muestra de suero en el reconocimiento de la sIgE anti-PG (A) Efecto de la matriz de la muestra de suero en el reconocimiento de la sIgE anti-PG tras la normalización con patrón interno (B).	153
Figura 83. Estudio de correlación entre el ensayo en DVD utilizando calibración con patrón interno e ImmunoCAP para los antígenos H1-PG y H1-AMX.....	154
Figura 84. Diagrama de cajas de la RSD obtenida en los estudios de precisión de las diferentes estrategias de calibración estudiadas para la determinación de sIgE de PG (A) y de AMX (B).....	155
Figura 85. Característica Operativa del Receptor (ROC) de los resultados de determinación de IgE específica frente a PG y AMX de un conjunto de 101 muestras mediante el sistema en DVD e ImmunoCAP.	157
Figura 86. Titulación de los anticuerpos obtenidos tras inmunización.	159

Figura 87. Comparativa entre las cadenas laterales de los antibióticos aztreonam y ceftazidima.....	161
Figura 88. Estructura química de la PG y otros β -lactámicos.....	162
Figura 89. Diagrama del proceso de RMN-STD en la identificación de ligandos.....	163
Figura 90. Intensidad relativa obtenida mediante RMN STD entre el anticuerpo IgG anti-PG y los antibióticos β -lactámicos.	165
Figura 91. Evaluación de muestras de pacientes alérgicos con antígenos formados por distintas rutas de conjugación.....	168
Figura 92. Mecanismo de unión de CRB a los grupos amino de la proteína mediante la química de la carbodiimida.....	170
Figura 93. Componentes del ensayo <i>in vitro</i> de determinación de IgE específica a β -lactámicos enmarcado en el proyecto COBIOPHAD. Disco microfluídico semiautomatizado (A), esquema del microarray de antígenos (B) y analizador (C)....	173
Figura 94. Curva de calibración heteróloga obtenida con el sistema semiautomatizado (n=10).	174
Figura 95. Estudio de correlación entre los resultados de concentración de IgE obtenidos por el sistema semiautomatizado (COBIOPHAD) basado en la tecnología de disco compacto e ImmunoCAP, para los antígenos H1-PG y H1-AMX.....	175
Figura 96. Estudio de correlación entre los resultados de concentración de IgE obtenidos por los sistemas basados en la tecnología de disco compacto manual (DVD) y semiautomatizado (COBIOPHAD), para los antígenos H1-PG y H1-AMX.	176
Figura 97. Estudio de la capacidad de adsorción de los antígenos sobre dos superficies plásticas diferentes.....	177
Figura 98. Curva ROC comparativa entre los sistemas basados en disco compacto, manual (DVD) y semiautomatizado (COBIOPHAD), e ImmunoCAP para los antígenos de PG y AMX.....	178

INTRODUCCIÓN

1.1. Hipersensibilidad provocada por fármacos

Los fármacos son sustancias naturales o sintéticas utilizados para el tratamiento de enfermedades e infecciones. Su ingesta genera en ciertos individuos reacciones adversas que van de leves a graves, llegando incluso a la hospitalización del sujeto y en ocasiones a su muerte. Una de estas reacciones adversas es la hipersensibilidad que representa el 10 % de todas las reacciones a fármacos.¹

La hipersensibilidad a fármacos es una afección cada vez más común y con elevada prevalencia, especialmente en medicamentos como los antibióticos β -lactámicos, los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), las quinolonas, las sulfonamidas, las tetraciclinas, entre otros. Aunque estos son los compuestos que muestran mayor incidencia, son muchos los fármacos que provocan reacciones de hipersensibilidad. En la Tabla 1 se muestran los fármacos causantes de las reacciones de hipersensibilidad más frecuentes.

Tabla 1. Fármacos causantes de hipersensibilidad.

Clase	Fármaco
• Antibióticos	β -lactámicos, quinolonas, sulfonamidas, glucopéptidos, macrólidos
• Antiinflamatorios	AINES, ácido acetil salicílico
• Anticuerpos	Trastuzumab, ibritumomab
• Quimioterapéuticos	Sales de platino
• Radio contraste (RCM)	Medios de contraste iodados
• Anestésicos	<ul style="list-style-type: none"> ○ Locales: novocaina, lidocaína ○ Generales: propofol, thiopentone, etomidate
• Anticonvulsivos	Carbacepina
• Tratamiento VIH	Abacavir
• Anticoagulantes	Heparina
• Agentes bloqueantes neuromusculares	Succinilcolina, atracurio, mivacurio, pancuronio, rapacuronio

Las reacciones de hipersensibilidad a fármacos pueden dividirse como no inmunogénicas e inmunogénicas, y estas últimas se clasifican siguiendo el sistema propuesto por Gell-Coombs (Tabla 2).^{2,3}

Tabla 2. Clasificación de reacciones inmunogénicas según Gell-Coombs.

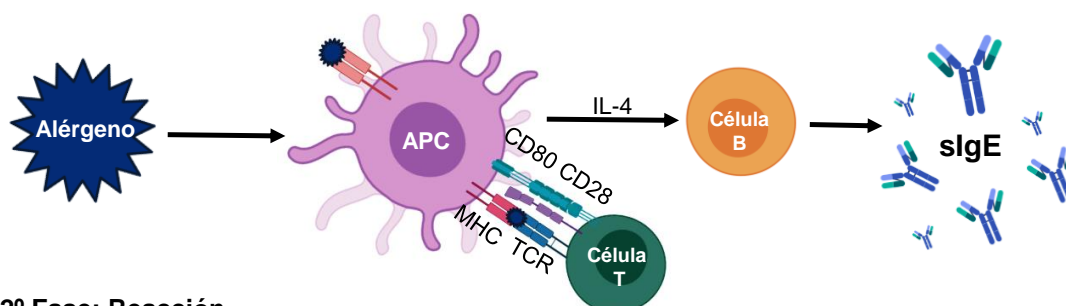
Tipo	Mecanismo inmunológico	Respuesta	Manifestaciones clínicas
I	IgE-dependiente	< 60 min	Anafilaxis, angioedema, palpitaciones, paro cardíaco, etc.
II	Citotóxico - mediado por IgG	7-14 días	Anemia hemolítica, trombocitopenia, neutropenia.
III	Inmunocomplejo (IgG -Complemento)	7-14 días	Vasculitis
IV	Células – T:	Tardía (>1h)	-
	a) Inflamación monocítica	10-15 días	Dermatitis de contacto
	b) mediada por TH2 inflamación eosinofílica	2-8 semanas	Erupción farmacológica con eosinofilia (DRESS)
	c) mediada por célula T-CD8 citotóxica	4-28 días	Síndrome de Steve Johnson (SJS), Necrólisis epidémica tóxica (TEN)
	d) mediada por células T inflamación neutrofílica	24-48 h	Pustulosis exantemática aguda generalizada (AGEP)

Los fármacos pueden inducir los cuatro tipos de hipersensibilidad inmunogénica, siendo los más frecuentes el I y el IV.

La **hipersensibilidad tipo I**, mediada por inmunoglobulina E (IgE), conocida comúnmente como alergia. Este tipo de hipersensibilidad necesita un proceso previo de sensibilización, en el que se produce la activación de los linfocitos T cooperadores (TH2) que generan anticuerpos específicos frente al fármaco. La IgE específica se une rápidamente a los receptores Fc ϵ RI localizados en la membrana de mastocitos o basófilos. Cuando el organismo se vuelve a poner en contacto con el fármaco, las IgE específicas reconocen el alérgeno y se inicia la cascada que dirige la degranulación de los mastocitos y basófilos, liberando histamina, citoquinas y triptasa.⁴ Estos compuestos activan otras células implicadas en las reacciones inflamatorias y provocan los síntomas típicos de las reacciones alérgicas, como urticaria y anafilaxis (Figura 1). Este tipo de respuesta se le conoce como respuesta inmediata ya que los síntomas se producen en menos de 60

minutos de la ingesta o contacto con el fármaco. Las reacciones alérgicas a los antibióticos β -lactámicos son las reacciones mediadas por IgE mejor definidas.⁵

1º Fase: Sensibilización



2º Fase: Reacción

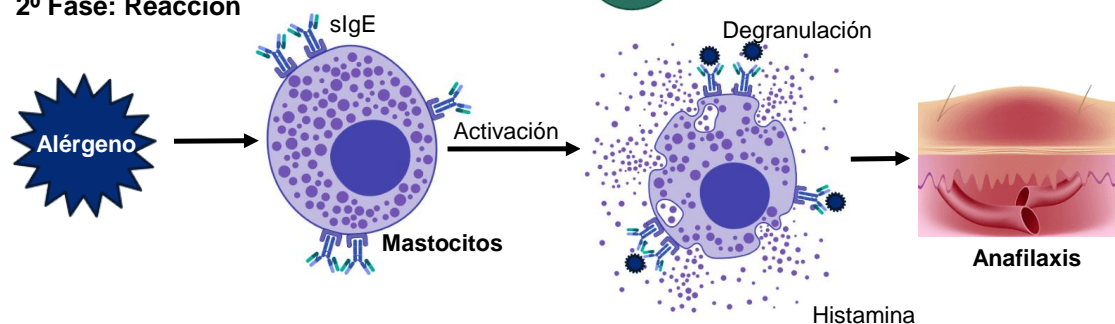


Figura 1. Mecanismo de actuación de la hipersensibilidad mediada por IgE (tipo I).

A pesar de que el sistema más común de activación de estas células es mediante este mecanismo de acción, los mastocitos y basófilos también pueden activarse mediante otros mecanismos generando anafilaxis. Este otro tipo de anafilaxis puede ser confundida con la generada mediante la hipersensibilidad mediada por IgE.

Los otros mecanismos de activación pueden ser, por un lado, la anafilaxis no inmunogénica (pseudo-alérgica), que no precisa de la activación del sistema inmunitario, sino que los fármacos son directamente los responsables de activar la degranulación de los mastocitos.⁶ Este proceso suele estar mediado por receptores como MRGPRX2, que al interaccionar con ciertos fármacos, activan la liberación de histamina, factor de necrosis tumoral α (TNF), prostaglandina D2 y β -hexosaminidasas, entre otras, provocando reacciones anafilácticas (Figura 2).⁷⁻⁹ La respuesta es inmediata, generando la reacción en menos de 60 minutos, siendo los síntomas más frecuentes cutáneos y respiratorios. Este tipo de respuesta es comúnmente producido por sustancias como las quinolonas, opiáceos, vancomicina, RCM, y NMBA y no requiere de una etapa de sensibilización, pero es dependiente de la dosis del fármaco.

La anafilaxis inmunogénica también puede ser mediada por inmunoglobulina G (IgG) o por el inmunocomplejo IgG-complemento a través de la activación del receptor Fc γ RIII, (Figura 2).¹⁰ La anafilaxis mediada por IgG ha sido demostrada en modelos animales, observándose una liberación del factor activador de plaquetas (PAF) de basófilos, macrófagos o neutrófilos, tras la interacción con el fármaco. La anafilaxis IgG dependiente es común en pacientes tratados con anticuerpos o en aquellos que han recibido una transfusión de inmunoglobulina A (IgA).^{11,12} Por otro lado, se puede realizar la activación del complemento, a través de inmunocomplejos. Esta activación conlleva la liberación de pequeños fragmentos que resultan de la rotura de componentes del complemento (C3a, C5a y C5b-9) que desencadena la degranulación de mastocitos y basófilos.¹³

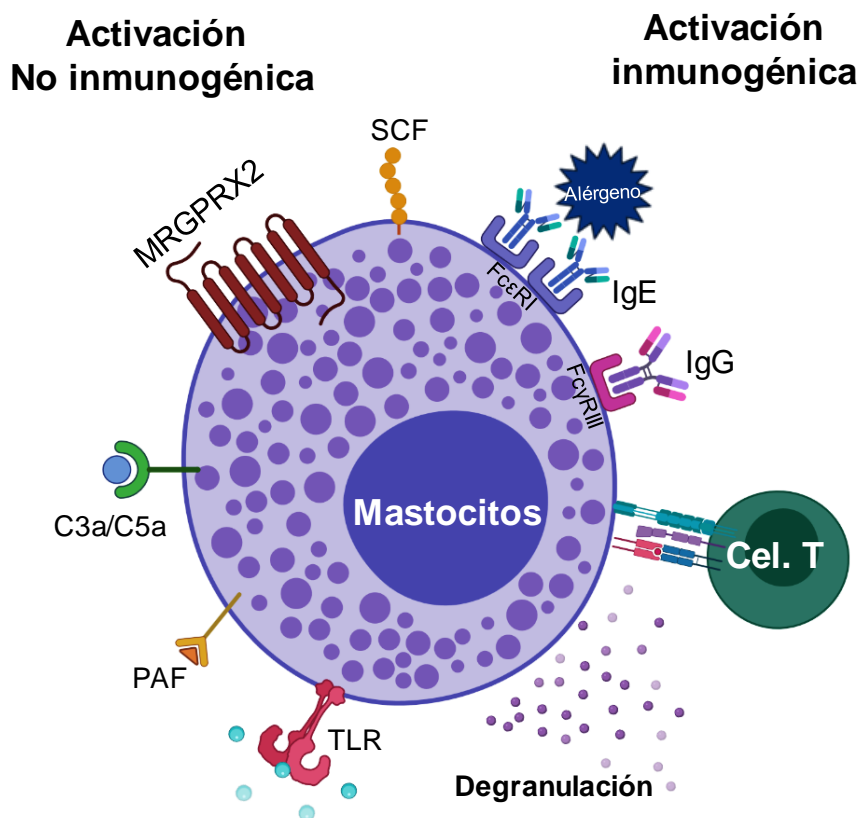


Figura 2. Esquema de los modos de activación de mastocitos mediados por fármacos.

La activación de mastocitos y basófilos mediada por IgG o por el sistema del complemento requiere una elevada concentración de antígeno, mayor que la necesaria para la activación IgE dependiente. Esta diferencia, permite que la IgG actúe como mediador y también como bloqueante de la anafilaxis mediada por IgE. Así pues, se ha

observado que bajas concentraciones de IgG específica conllevan anafilaxis dependiente de IgE (Figura 3A), mientras que bajas concentraciones de antígeno y altas concentraciones de IgG, producen un bloqueo de los anticuerpos evitándola (Figura 3C). Por otra parte, altas concentraciones de antígeno y de IgG provocan que la anafilaxis sea mediada por IgG, si la concentración de IgG es mayor que la de antígeno (Figura 3B). Por el contrario, si la concentración de antígenos es mayor que la de IgG, se produce anafilaxis mediada tanto por IgG como por IgE (Figura 3D).¹⁴ El mecanismo de las reacciones anafilácticas IgE independiente, es clínicamente indistinguible del mediado por IgE, y es promovido por RCM, dextrano y algunos AINES.^{15,16}

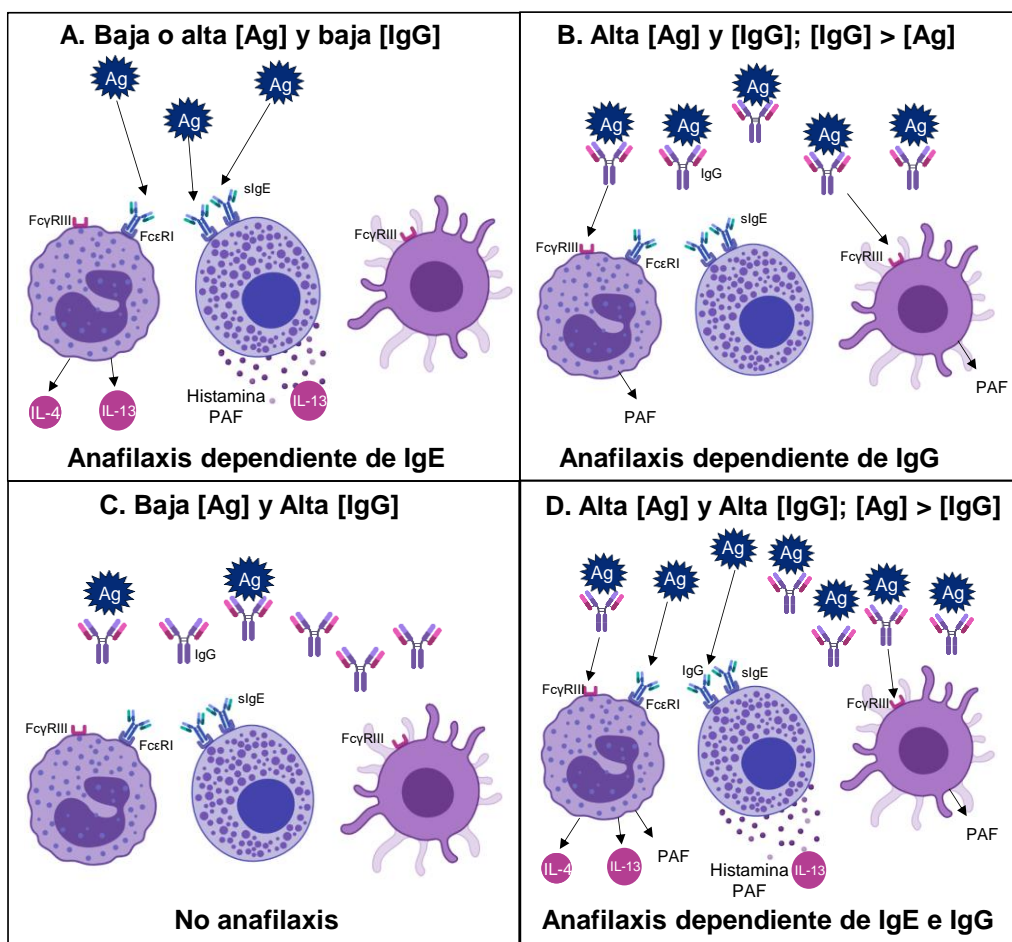


Figura 3. Esquema del tipo de anafilaxis generada en función de la relación de antígenos y anticuerpos (adaptada).¹⁴

La hipersensibilidad de tipo IV, mediada por las células T, también denominada hipersensibilidad no inmediata, se clasifica en 4 subcategorías en función del mecanismo de actuación. Su principal manifestación clínica es el exantema maculopapular.

1.2. Mecanismo de interacción fármaco-sistema inmunitario

El estudio del mecanismo de interacción entre un fármaco y el sistema inmunitario se ha abordado planteando las siguientes hipótesis: a) hipótesis del hapteno, b) prohapteno, c) interacción farmacológica y d) daño celular.^{17,18}

En la Figura 4 se muestran los esquemas de las cuatro hipótesis de respuesta inmunológica que generan hipersensibilidad.

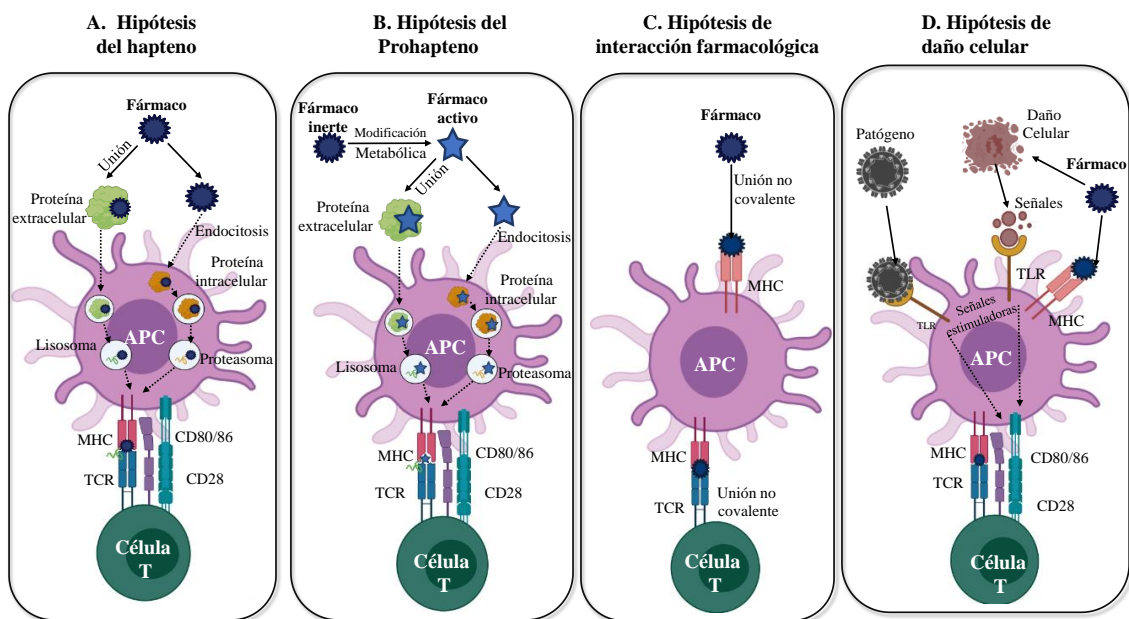


Figura 4. Representación de las cuatro hipótesis del mecanismo de interacción fármaco-sistema inmunitario.

1.2.1. Hipótesis del hapteno

Los fármacos generalmente son compuestos de masa molecular inferior a 800-1000 Da, que son metabolizados, degradados y eliminados sin implicación del sistema inmunitario.⁴ Debido a su baja masa molecular, los fármacos son considerados haptenos. Los haptenos son incapaces de inducir una respuesta del sistema inmunitario. Para ello es necesario su unión a una proteína o a ADN formando un aducto o conjugado antigénico y así poder activar la producción de anticuerpos. Esta conjugación puede afectar a cualquier proteína, como proteínas transportadoras (HSA), proteínas de membrana

(integrinas), proteínas intracelulares (enzimas) e incluso péptidos unidos al complejo principal de histocompatibilidad (MHC).¹⁸

Tras la formación del complejo hapteno-proteína, éste es reconocido por el sistema inmunitario como agente extraño o antígeno, estimulando la inmunidad innata. Las células presentadoras de antígeno (APC) lo fagocitan y procesan en los lisosomas o proteasomas, generando péptidos, que se expresan en la superficie celular mediante el MHC, también llamado HLA en humanos. Estos péptidos son denominados determinantes antigénicos y son reconocidos por los linfocitos T (CD4). Tras este reconocimiento, los linfocitos T se activan y estimulan la producción de anticuerpos, conociéndose este proceso como sensibilización (Figura 4A).

1.2.2. Hipótesis del prohapteno

Los haptenos deben ser moléculas químicamente activas para dar lugar a antígenos. Sin embargo, algunos fármacos no presentan esta propiedad, y aun así son capaces de activar el sistema inmunitario. Esto es debido a la generación de prohaptenos.¹⁹ Estos son moléculas que, siendo inicialmente químicamente inertes, se vuelven reactivas tras su modificación metabólica (Figura 4B). Un ejemplo es el sulfametoxazol, que es metabolizado en el hígado como hidroxilamina-sulfametoxazol por el citocromo P450 y transformado por oxidación en nitroso-sulfametoxazol, siendo esta especie química muy reactiva y por lo tanto capaz de conjugarse a proteínas intracelulares.²⁰

1.2.3. Hipótesis de interacción farmacológica

Los fármacos, además de estimular el sistema inmunitario mediante la formación de un complejo hapteno-transportador como sugieren las dos hipótesis anteriores, pueden por sí mismos, interactuar con los receptores de las células T y activar el sistema inmunitario, sin necesidad de un anclaje covalente.²¹ Este tipo de activación del sistema inmunitario se denomina hipótesis de interacción farmacológica²² y justifica el hecho de que fármacos inertes puedan activar las células T (Figura 4C). Al igual que ocurre con la pseudo alergia, este proceso no requiere de una sensibilización previa, pero es dependiente de la concentración y de la afinidad del fármaco por el receptor. La

interacción fármaco-receptor tiene lugar mediante interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals o puentes de hidrogeno.

Esta hipótesis fue planteada tras observar ciertos comportamientos que no eran propios de la hipótesis clásica del hapteno. Así, las células presentadoras de antígeno fijadas seguían siendo capaces de ser activadas específicamente por el fármaco, activando directamente las células T sin necesidad de procesamiento o unión a un transportador. Además, el lavado de la célula anula la acción del fármaco, demostrando la inestabilidad de la unión. También se observó que la activación de la célula presentadora de antígeno tras la exposición al fármaco se realiza en pocos segundos, un tiempo demasiado corto para permitir la captación, metabolismo, procesado de las proteínas modificadas a péptidos inmunogénicos y la presentación de los péptidos modificados. Así mismo, el bloqueo del metabolismo y procesamiento del fármaco no afectaba a la activación específica de las células T.¹⁹

1.2.4. Modelo de daño celular

La hipótesis del modelo de daño celular establece que no es el antígeno directamente el que provoca la respuesta inmunitaria, sino que son algunos fármacos o proteasas alérgicas las responsables de provocar el daño celular. Como consecuencia, se producen señales químicas que activan las células presentadoras de antígeno, generando respuesta frente a aquellas moléculas causantes del daño (Figura 4D).^{21,23}

1.3. Alergia a antibióticos β -lactámicos

La utilización generalizada de la penicilina es una de las causas que ha llevado a la sensibilización de los individuos y por consiguiente a la aparición de reacciones alérgicas. A lo largo de los años se han desarrollado nuevos β -lactámicos modificando la estructura original de éstos, mejorando el espectro de actuación y disminuyendo su toxicidad. La utilización de nuevos antibióticos hace más complejo el estudio del mecanismo de generación de alergia.

En la actualidad, los antibióticos β -lactámicos son los fármacos que causan el mayor número de reacciones de hipersensibilidad, principalmente debido a dos motivos. Por un lado, son compuestos químicamente activos y pueden reaccionar con biomoléculas, generando antígenos que activan el sistema inmunitario, como sugiere la

hipótesis del hapteno. Y por otro lado, estos fármacos son los antibióticos más consumidos en la actualidad.¹ De hecho, el Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) informó que el consumo de antibióticos en 2018 fue de 18.4 dosis diarias por 1000 habitantes, de los cuales el 48 % eran antibióticos β -lactámicos.

Las diferencias en la estructura química de estos fármacos han contribuido a la selectividad de las respuestas por parte de las células T y a la producción de IgE específica en pacientes alérgicos. Por lo tanto, es importante entender con mayor profundidad el efecto de la estructura química de los antibióticos β -lactámicos en la reacción de hipersensibilidad.²⁴

1.3.1. Clasificación de los antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos presentan en su estructura un anillo característico formado por cuatro átomos (3C y 1N) denominado anillo β -lactámico. Dada su diferencia estructural se clasifican en 5 subfamilias: penicilinas, cefalosporinas, monobactamas, carbapenemas e inhibidores de la β -lactamasa (Figura 5).

Esta clasificación depende principalmente de la naturaleza química del anillo fusionado con la β -lactama. En el caso de la familia de las penicilinas, el anillo β -lactámico se encuentra fusionado con un anillo tiolado de 5 miembros, anillo tiazolidínico. Además, esta subfamilia presenta en la posición 6 del anillo β -lactámico una cadena lateral (R_1) que varía de unas penicilinas a otras.

En el caso de las cefalosporinas, el anillo β -lactámico se condensa con un anillo tiolado de 6 miembros, anillo dihidrotiazona. Además, al igual que en las penicilinas presenta una cadena lateral en la posición 6 del anillo β -lactama (R_1) y otra cadena lateral en la posición 3 del anillo dihidrotiazona (R_2).

La familia de las carbapenemas presenta un ciclopenteno como parte de esa estructura bicíclica. En algunos casos, uno de los carbonos de este anillo es sustituido por un átomo de azufre u oxígeno, generando tiopenemas o oxipenemas, respectivamente. Esta familia de fármacos suele presentar hasta tres cadenas laterales distintas (R_1 , R_2 y R_3) que los diferencian entre sí.

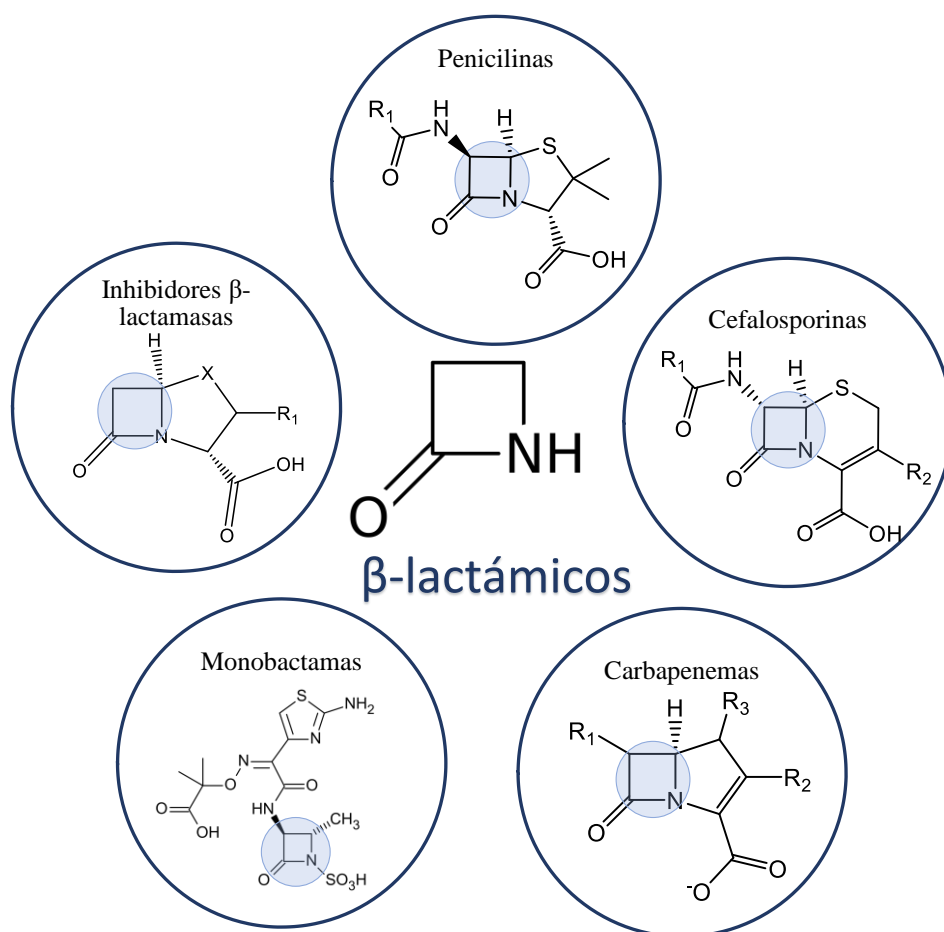


Figura 5. Estructura química de las familias de antibióticos β -lactámicos.

Las monobactamas no presentan ningún anillo fusionado al β -lactámico, exhibiendo por lo tanto una estructura monocíclica. Aunque se ha llegado a sintetizar más de un antibiótico de esta subclase, actualmente solo aztreonam (AZT) está disponible comercialmente.

Por último, los inhibidores de las β -lactamasas presentan en su estructura, aparte de la β -lactama, un anillo de 5 miembros, que difiere del anillo tiazolidínico de las penicilinas, en que el átomo de azufre se sustituye por uno de oxígeno o un grupo sulfona. Estas sustituciones aumentan la reactividad de la molécula, permitiendo la inactivación de las β -lactamasas mediante su unión covalente al sitio activo de esta enzima.²⁵

Las diferencias estructurales de los β -lactámicos influyen en el espectro de acción antimicrobiana. Generalmente, las estructuras hidrofílicas favorecen la acción de estos

antibióticos frente a bacterias Gram negativas, mientras que estructuras más lipofílicas actúan más eficientemente frente a bacterias Gram positivas. En este contexto, modificar la estructura química de un antibiótico β -lactámico mediante la incorporación de grupos hidrofílicos/lipofílicos, amplía el espectro de actuación y mejora su actividad antimicrobiana. En este sentido, las aminopenicilinas actúan eficazmente tanto frente a bacterias Gram negativas como Gram positivas. Sin embargo, aquellas penicilinas que presentan en su estructura un grupo carboxilo, en lugar de un grupo amino, como ocurren con la carbenicilina (CRB) o ticarcilina (TCC), sólo actúan frente a bacterias Gram negativas. La modificación química de estas estructuras también ha sido empleada para aumentar la estabilidad y la absorción gástrica de estos antibióticos. La adición de grupos amino en la cadena lateral, como es el caso de la amoxicilina (AMX) o la ampicilina (AMP), además de incrementar el espectro de actuación, confiere estabilidad estructural en medio ácido, ya que la amina protonada actúa desestabilizando el ion imino formado durante la ruptura catalítica del anillo β -lactámico, lo que favorece su absorción.²⁶

1.3.2. Determinantes antigénicos

Un determinante antigénico o epítipo es la parte específica de un antígeno que es reconocida por el sistema inmunitario. De acuerdo con lo establecido en la hipótesis del hapteno, los antibióticos β -lactámicos son incapaces de generar por sí mismos una respuesta inmunológica. Estos compuestos necesitan anclarse a macromoléculas como proteínas para generar un antígeno que active al sistema inmunológico. Así pues, el determinante antigénico está compuesto tanto por un metabolito del fármaco como por parte de la molécula transportadora a la que se encuentra conjugado.

A continuación, se presenta una revisión de las estructuras de los haptenos β -lactámicos conocidos, así como de las macromoléculas implicadas en la generación de antígenos y su implicación en la formación del determinante antigénico.

1.3.2.1. β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos, como se ha comentado, poseen una estructura altamente inmunogénica, es decir, contienen grupos muy reactivos capaces de unirse a diferentes proteínas del suero humano y generar respuesta inmunitaria. A pesar de que estos fármacos presentan estructuras muy similares, los grupos reactivos de las cadenas

laterales, o la diferencia estructural de los anillos, les confieren diferente estabilidad y reactividad, por lo que hay gran variedad de determinantes antigénicos en esta familia de fármacos.

La identificación de los determinantes antigénicos ayuda a establecer patrones de reconocimiento, esclarecer el mecanismo de acción de estos fármacos, y su metabolismo, y por lo tanto a prescribir nuevos tratamientos y mejorar el diagnóstico de alergia a antibióticos.

- ***Penicilinas***

El mecanismo principal para la formación de determinantes antigénicos de las penicilinas ocurre mediante reacción entre el grupo carbonilo del anillo β -lactámico, y las aminas primarias de las lisinas de las proteínas, en condiciones fisiológicas.²⁷ La unión del fármaco a proteínas mediante este mecanismo ha sido ampliamente estudiado, concluyendo que genera un aducto estable el cual ha sido aislado y caracterizado.²⁸⁻³⁰ A este aducto proteína-antibiótico, se le conoce como determinante mayor o principal, y a los antibióticos conjugados según este mecanismo se les conoce con el sufijo, lloyl. Este determinante es considerado el epítipo inmuno-dominante en la respuesta inmunogénica a la penicilina G (PG) ya que representa aproximadamente 95 % de las estructuras antigénicas en condiciones fisiológicas.^{31,32} El 5 % restante ha sido atribuido a estructuras antigénicas menos comunes denominadas determinantes menores o minoritarios (MDM), y su capacidad inmunogénica ha sido poco estudiada. No obstante, varios estudios revelan que estos determinantes son clave para la mejora del diagnóstico de alergia a penicilinas (Figura 6).³³⁻³⁹

Otras penicilinas, como es el caso de AMX y AMP, presentan en su cadena lateral un grupo electrófilo, NH_2 . Este grupo funcional puede reaccionar con el grupo carbonilo del anillo β -lactámico de otras moléculas de AMX generando dímeros o estructuras poliméricas muy inmunogénicas. Por otro lado, la amina primaria puede interaccionar con grupos carbonilo del anillo β -lactámico de su propia estructura generando una ciclación intramolecular (dicetopiperacina)⁴⁰⁻⁴² como puede observarse en la Figura 7. Este compuesto no tiene la capacidad de unirse a proteínas y se ha demostrado mediante

diferentes pruebas *in vitro* que no es reconocido por la IgE de pacientes alérgicos, por lo que no es considerado como determinante antigénico.⁴¹

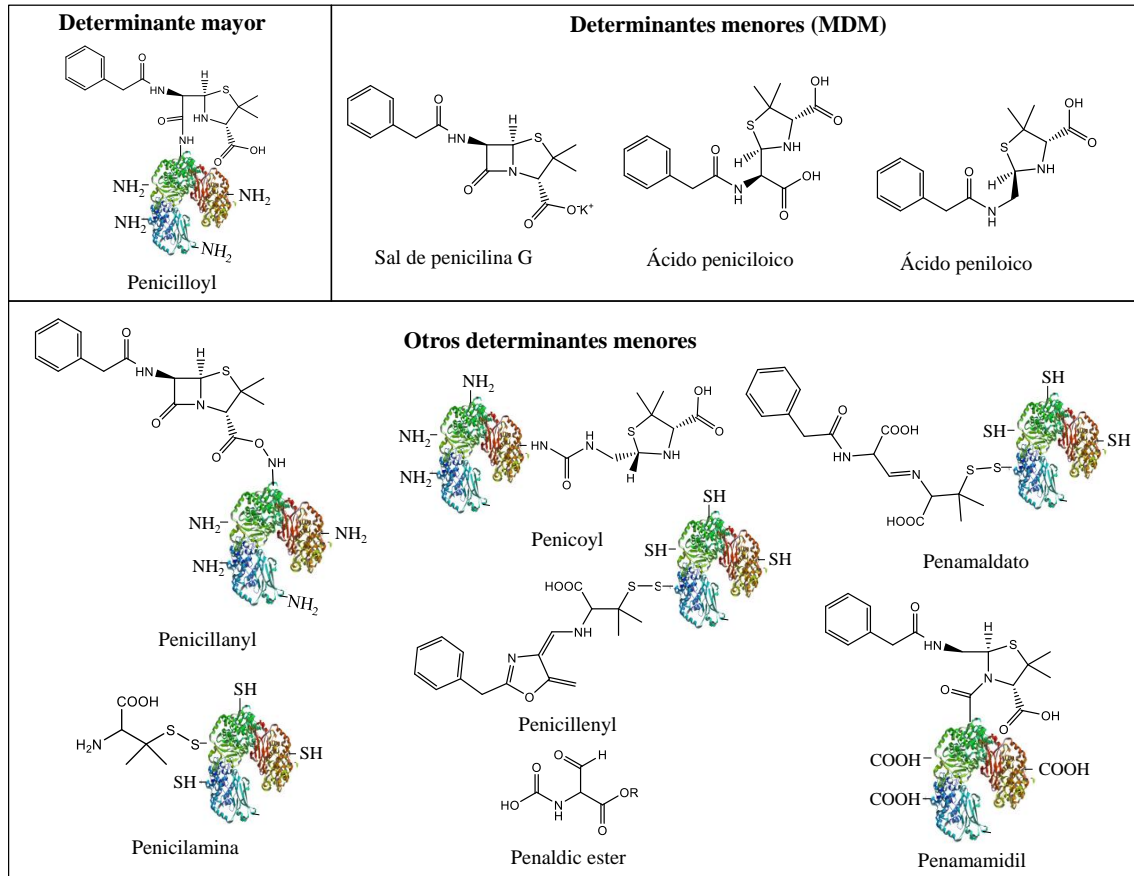


Figura 6. Estructura de los determinantes antigénicos de la PG.

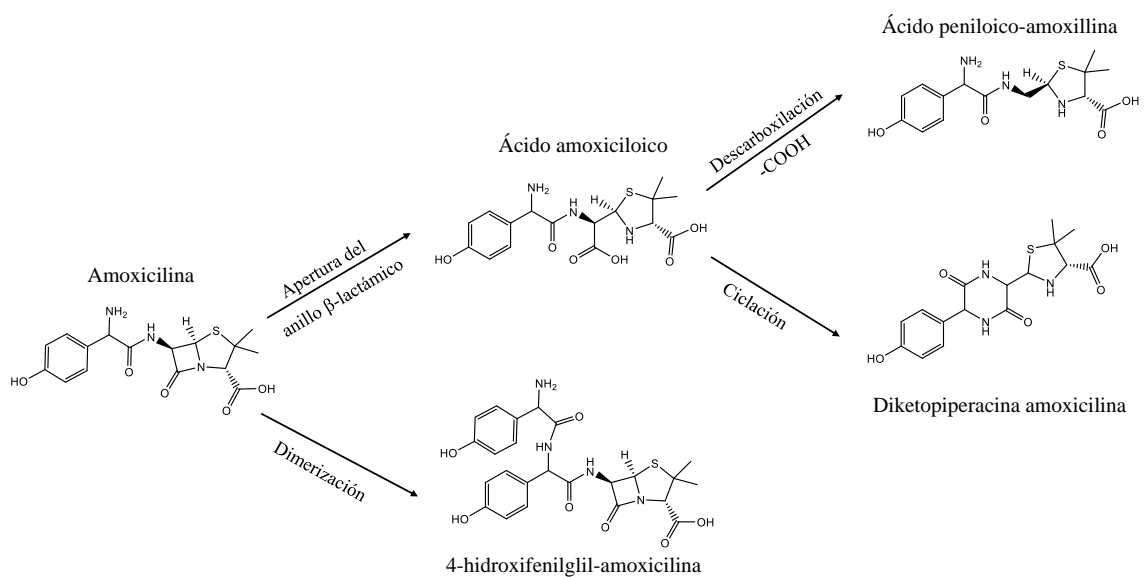


Figura 7. Mecanismo de degradación de la AMX.⁴²

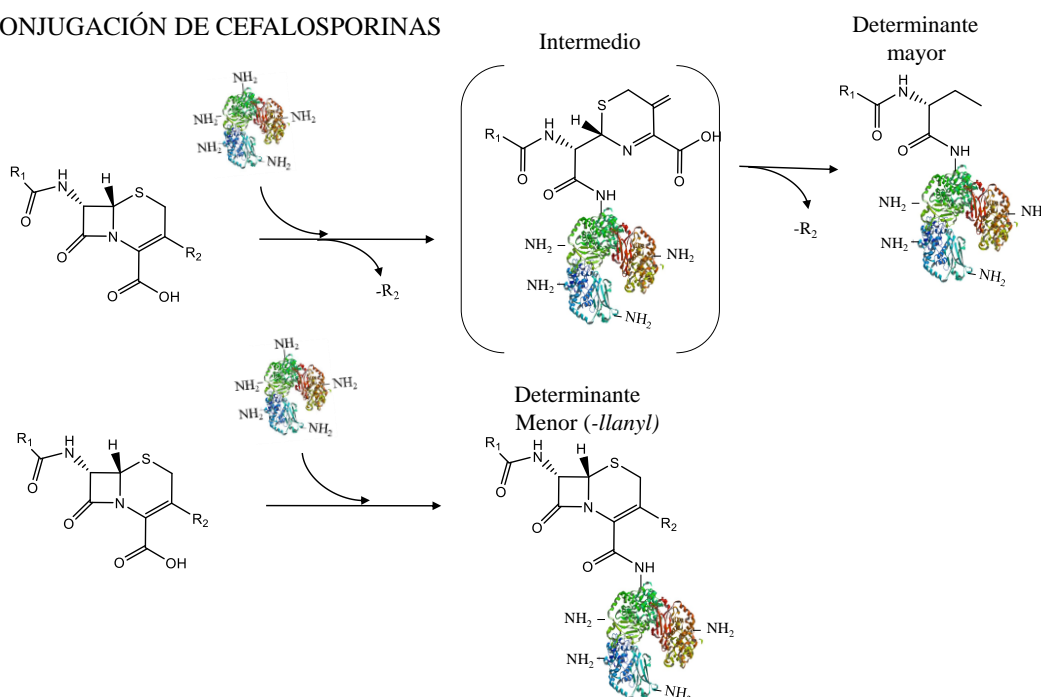
Varios estudios con anticuerpos monoclonales han identificado tres epítopos en la estructura de las penicilinas, el anillo β -lactámico, el anillo tiazolidínico y la cadena lateral.⁴³⁻⁴⁵ A pesar de que todas las penicilinas, presentan estos tres epítopos, no muestran la misma inmunogenicidad. Así para la penicilina, la mayor respuesta se encuentra frente al anillo β -lactámico abierto, en el caso de la AMX la cadena lateral es el epítipo principal. Esto es debido a la disposición espacial que exhiben estas estructuras tras la unión con las proteínas. Un estudio con un nano-transportador sintético, demostró que mientras la PG orientaba su cadena lateral hacia el interior de la estructura del transportador, la AMX orientaba su estructura hacia el exterior, lo cual la hace más accesible a la IgE.⁴⁶ Esto explicaría que gran parte de la población alérgica a AMX tolere la penicilina.

- ***Cefalosporinas***

En condiciones fisiológicas, al igual que ocurre entre las penicilinas, el grupo carbonilo del anillo β -lactámico, interacciona con las aminas primarias de las proteínas, generando un grupo amida. Sin embargo, este compuesto es muy inestable, y provoca la fragmentación del anillo dihidrotiazina y la eliminación de la cadena lateral R_2 , dando lugar a distintas estructuras que no han sido aún estudiadas (Figura 8A).^{47,48} En aquellas cefalosporinas que no presentan cadena lateral en la posición 3' (R_2), sino que en su lugar tienen un sustituyente como es el caso del cefaclor o cefadroxil, la eliminación de esta cadena no ha sido confirmada.⁴⁷ A pesar de la eliminación de la cadena lateral R_2 , se ha observado que, aunque con menos frecuencia que la R_1 , juega un papel importante en el proceso de sensibilización de algunos pacientes.⁴⁹⁻⁵¹ Con respecto a la cadena R_1 , se ha demostrado es uno de los principales determinantes antigénicos de estos fármacos.^{50,52-54}

Los resultados de un estudio reciente revelaron que el determinante menor *llanyl* permite una mejora en el diagnóstico de pacientes a esta familia de β -lactámicos.⁵⁵

A. CONJUGACIÓN DE CEFALOSPORINAS



B. CONJUGACIÓN DE AMINOCEFALOSPORINAS

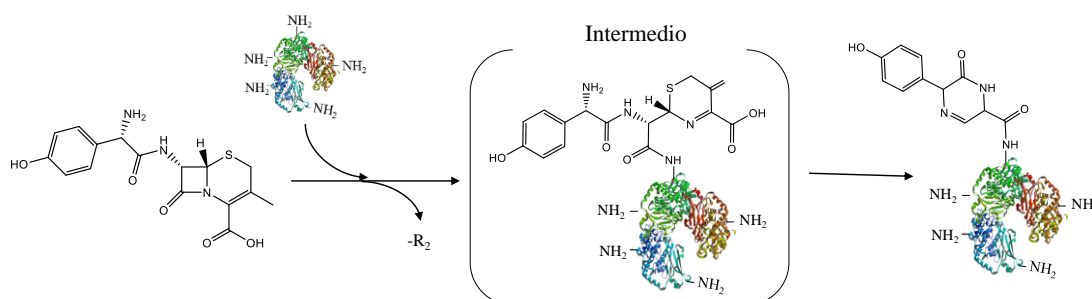


Figura 8. Mecanismo de conjugación de cefalosporinas (A) y cefalosporinas aminadas (B) a proteínas mediante la ruptura del anillo β-lactámico.⁵⁶

En el caso de las amino-cefalosporinas, la amina primaria de la cadena R₁ interacciona con el carbono 6, generando el determinante piracinona (Figura 8B). Este determinante antigénico, ha mostrado tener una mayor reactividad en pacientes alérgicos a las amino-cefalosporinas que la cadena R₁.⁵⁶

- **Carbapenemas y monobactamas**

Al igual que ocurre con las penicilinas, el ataque nucleofílico del grupo carboxilo del anillo β-lactámico de las carbapenemas y monobactamas (MB) con el grupo amino de las proteínas, generan un enlace amida muy estable, actuando como determinante antigénico.⁵⁷

La producción de anticuerpos monoclonales específicos frente a AZT ha ayudado a esclarecer los epítomos causantes de la respuesta inmune. Así, se han identificado tres epítomos diferentes, la cadena lateral, el núcleo del antibiótico, y la estructura completa.⁵⁸ No obstante, al tratarse de fármacos poco utilizados en el tratamiento de infecciones bacterianas, hay pocos estudios sobre la generación de otros determinantes antigénicos tras su degradación y metabolismo.

- ***Inhibidores de las β -lactamasas***

El ácido clavulánico (CVL) es el inhibidor de β -lactamasas más estudiado, ya que es el más consumido. Este compuesto se administra junto con la AMX para mejorar su acción, y de ahí su elevado consumo. Presenta una química más compleja que los anteriores β -lactámicos. Su capacidad inmunogénica no ha sido muy estudiada a pesar de que se han identificado y diagnosticado pacientes alérgicos a este fármaco^{59,60}, llegándose a considerar en la actualidad que es el compuesto causante del 30 % de las reacciones alérgicas al augmentine.^{60,61}

Al igual que ocurre con el resto de antibióticos β -lactámicos, el determinante antigénico se genera mediante un ataque nucleofílico de las aminas primarias de las lisinas de las proteínas séricas con el grupo carbonilo electrófilo del anillo β -lactámico. La estructura química resultante es muy inestable y rápidamente se produce la degradación, dando lugar a múltiples fragmentos químicamente activos capaces de unirse a grupos activos de proteínas (Figura 9).^{62,63}

La hidrólisis de este fármaco es diez veces más rápida que la de la PG. Además, altas concentraciones favorecen su descomposición ya que tanto el clavulánico como sus metabolitos actúan como catalizadores en la reacción de degradación.⁶⁴⁻⁶⁶ De los fragmentos propuestos como posibles determinantes antigénicos, se ha demostrado que sólo uno de ellos (AD-I) presenta la capacidad de ser reconocido por las IgE que se expresan en la superficie de los basófilos.⁶⁷

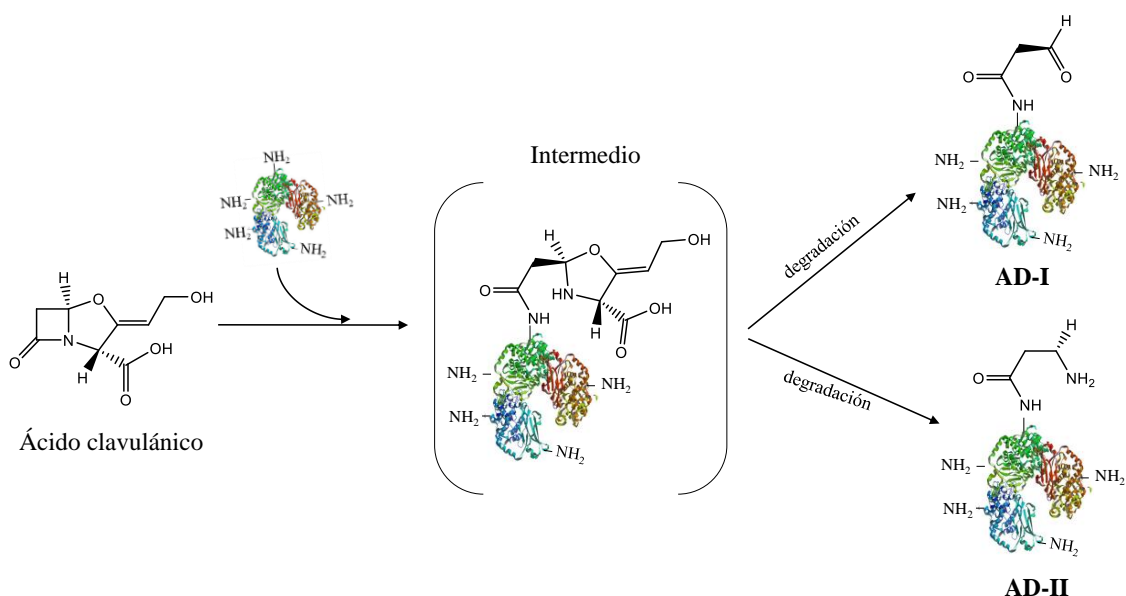


Figura 9. Mecanismo de conjugación y degradación del CVL (adaptada).⁶⁷

1.3.2.2. Proteína transportadora o transportador

Como se ha comentado en la sección 1.3.2, el determinante antigénico está formado tanto por parte de la estructura del fármaco como por parte de la proteína transportadora. Este hecho se confirmó tras detectar que los anticuerpos presentes en suero de pacientes reconocían con diferente grado al fármaco cuando se unía covalentemente a diferentes tipos de proteínas transportadoras o estructuras similares.^{62,68,69} Como prueba concluyente de este hecho, Ariza y colaboradores, llevaron a cabo la evaluación de 4 estructuras derivadas de la AMX. Dos de ellas no se encontraban unidas a ninguna molécula transportadora, AMX sin tratar y ácido amoxiciloico, y las otras dos se conjugaron a butilamina y a albúmina de suero humano (HSA). Tras la evaluación de estos determinantes antigénicos con suero de pacientes alérgicos a AMX mediante el ensayo *in vitro* de inhibición RAST, se observó que existían dos grupos de pacientes. Un grupo mostró que la IgE reconocía mejor a la AMX sin conjugar. Sin embargo, las IgE del otro grupo de pacientes reconocen de modo similar AMX no conjugada y conjugada. Además, en este segundo grupo se observó que, el ácido amoxiciloico, que presenta una estructura similar al amoxicilloyl, pero sin la unión al transportador, generó una baja interacción a diferencia de su análogo conjugado. Este hecho reforzó la idea de que la proteína transportadora juega un papel esencial en el reconocimiento antígeno-IgE.⁶³

En base a estas evidencias, diversos estudios se han centrado en identificar tanto la proteína a la que se une el antibiótico, como los residuos modificados y el tipo de unión, generando información relevante de la disposición y exposición del fármaco.

- ***Albumina de suero humano***

La HSA ha sido postulada como la principal proteína para la conjugación de los derivados β -lactámicos en condiciones fisiológicas y generación de determinantes antigénicos.⁷⁰ Esta proteína es una de las mayoritarias del suero humano y su función principal es la de transportar hormonas o diversos fármacos a través del suero, por lo que posee diversos sitios de unión y una alta capacidad de unión de ligandos.⁷¹ Se compone de 585 aminoácidos, de los cuales 59 son residuos de lisina, principal aminoácido implicado en la conjugación de β -lactámicos.

Uno de los primeros trabajos *in vivo* que estudió la HSA como proteína transportadora unida a la PG concluyó que suministrar este antibiótico generaba conjugados HSA-PG, siendo el grado de conjugación proporcional a la concentración del fármaco.⁷² Además, en este trabajo se demostró que 19 de los 34 pacientes tratados con penicilina presentaban anticuerpos específicos, principalmente IgG, frente al antígeno, HSA-penicilloyl. También, este estudio reveló que la presencia de una serina próxima a las regiones de unión y la estructura terciaria de la proteína favorece la unión del fármaco al residuo de lisina.

Otros estudios identificaron *in vitro* los sitios de unión de estos fármacos a HSA.^{28,29} Los resultados obtenidos indicaron que el enlace hapteno-proteína se encontraba en las lisinas 190, 195 y 199 y la serina 193 que se localizan en una pequeña región que une el dominio 1 y 2 de la HSA. Otro estudio reveló que además de estos sitios de unión, los derivados de la penicilina se encontraron en los residuos lisina 432, 541, 545.

La utilización de la espectrometría de masas permitió definir con mayor precisión tanto las estructuras hapténicas que se unen a las proteínas, como los residuos modificados por dichos haptenos, y así poder establecer perfiles de conjugación teniendo en cuenta el fármaco utilizado, su dosis y el tiempo de incubación. Sin embargo, la mayoría de estos estudios fueron realizados *in vitro*, partiendo de que la HSA era la

principal proteína involucrada en la formación del determinante antigénico que reconocían los pacientes alérgicos.⁷³⁻⁷⁶

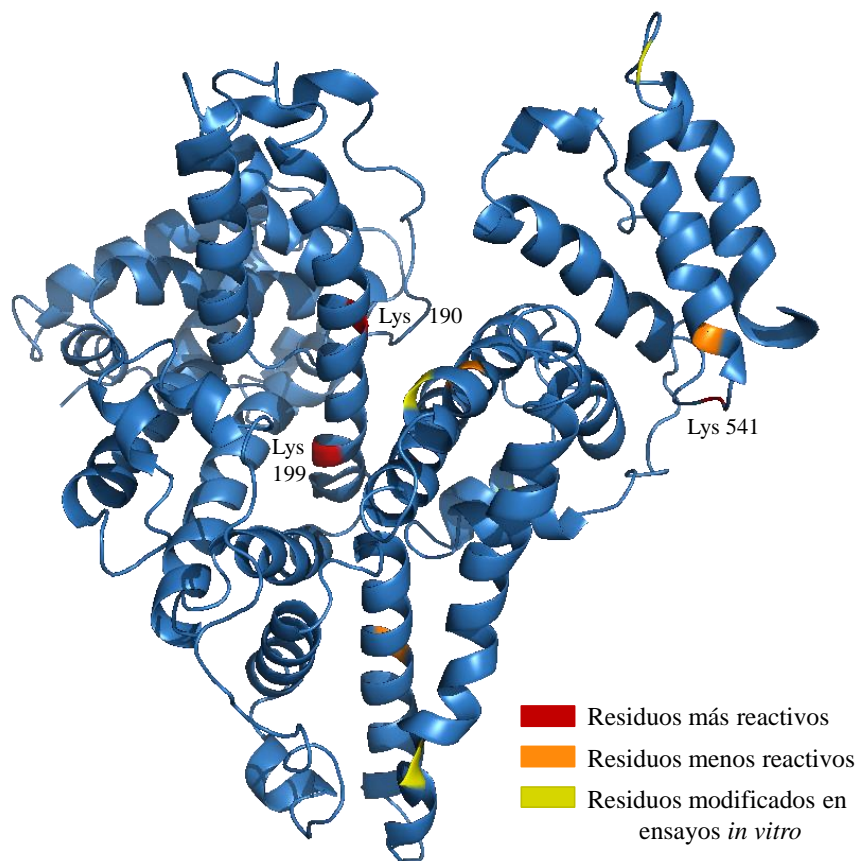


Figura 10. Residuos de lisina modificados por la PG en la HSA.

Estudios *in vivo* con pacientes que han sido tratados con antibióticos β -lactámicos durante un periodo prolongado de tiempo han confirmado la presencia de haptenos en la mayoría de los residuos encontrados *in vitro*, excepto en el caso del flucoxacilina y el CVL en el que sólo el 45 % y 25 % de los residuos *in vitro* se encontraban modificados, respectivamente.⁷⁷ La lisina 190 ha sido hallada modificada en todos los estudios realizados, tanto *in vitro* como *in vivo*, y la lisina 199 también se ve modificada en la mayoría de los estudios realizados.^{21,70,73,74,76,78-80} La lisina 541 es otro de los aminoácidos modificados en la mayoría de los casos. Sin embargo, para la piperacilina (PPR) se observó que tras evaluar una población de conjugados HSA-PPR, este residuo se encontraba conjugado en una mayor proporción de HSA que el residuo 190, que suele ser el mayoritario. Además, fue uno de los pocos residuos modificados por AZT.⁸¹ Por lo tanto, en base a estos estudios se puede concluir que las lisinas 190, 199 y 541 son las

más reactivas en esta proteína y que las 372, 436, 475 y 560 sólo han sido modificadas en estudios *in vitro* (Figura 10).^{70,76,78,82} Además es importante destacar que aunque la HSA presenta 59 residuos de lisina en su estructura primaria, sólo el 10 – 20 % de estos residuos se han encontrado modificados en los estudios realizados hasta ahora, indicando un bajo rendimiento de conjugación.

- **Otros transportadores de naturaleza proteica.**

Uno de los primeros estudios que demostró que las moléculas de PG se conjugaban a HSA para formar el antígeno, también reveló que otras proteínas del suero humano formaban conjugados antigénicos, aunque en menor proporción.^{72,83} Sin embargo, estas proteínas no fueron identificadas hasta 1995, cuando Magi y colaboradores señalaron a la transferrina como segunda proteína implicada en estos procesos de conjugación.⁸³ Posteriormente, se observó que la AMX⁸⁴ y el CVL⁸⁵ formaban enlaces con las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas y con la haptoglobina y la apolipoproteína A1. Sin embargo, no se encontraron conjugados con otras proteínas mayoritarias del suero humano, por lo que se concluyó que la disposición espacial de los aminoácidos era clave en la formación del determinante antigénico.^{21,84,86}

Por otro lado, los antibióticos β -lactámicos no sólo se han observado en proteínas séricas circulantes. Un estudio de microscopía confocal de fluorescencia reveló la presencia de conjugados β -lactámico/proteína en el interior celular, pero las proteínas no fueron identificadas. Se postuló que estos conjugados podrían haberse formado en el interior celular o creados extracelularmente y ser internalizados por las células tras su conjugación.⁸⁴ Posteriormente se confirmó que los β -lactámicos presentaban la capacidad de internalizarse y formar antígenos con proteínas intracelulares.⁸⁷

A pesar de estos estudios de identificación de proteínas transportadoras tanto extra como intracelulares, son pocos los trabajos que han evaluado antígenos preparados a partir de diferentes proteínas transportadoras, a pesar de que un estudio de Ariza y colaboradores demostrara que la naturaleza del transportador influía considerablemente en la sensibilidad de las pruebas *in vitro* realizadas a pacientes alérgicos.⁶³

- **Estructuras poliméricas**

La HSA ha sido considerada, hasta el momento, como la proteína responsable en la formación de los determinantes antigénicos de los β -lactámicos, sin embargo, no es el transportador más usado en la preparación de los antígenos de las pruebas *in vitro* comerciales para el diagnóstico de alergias a β -lactámicos. Como se ha comentado, generalmente, en condiciones fisiológicas el anillo β -lactámico se abre de forma que el grupo carbonilo reacciona uniéndose a aminas primarias de los residuos de lisina. Además, algunos estudios han concluido que el número de β -lactámicos conjugados a la proteína es vital para que el reconocimiento molecular β -lactámico-IgE tenga lugar, por lo que aumentar la relación molar de β -lactámico en el conjugado conduce a un incremento en la sensibilidad de los ensayos.⁸⁸⁻⁹⁰ En este contexto, varios autores introdujeron el uso de un polímero de lisina, la Poli-L-Lisina (PLL) como transportador para la formación de antígenos y su posterior evaluación con suero de pacientes alérgicos en ensayos *in vivo* e *in vitro*.^{91,92}

Con el objetivo de demostrar esta hipótesis, Mayorga y colaboradores, compararon conjugados de HSA y PLL en un estudio basado en la determinación de IgE específica presente en suero de 50 pacientes, alérgicos y controles, y observaron que los mejores resultados se obtuvieron utilizando conjugados de PLL.⁶² Esta mejora en el reconocimiento se postuló que era debido a una mayor densidad de haptenos por molécula y probablemente a que estos haptenos se encuentran más expuestos.⁹³ Este comportamiento fue corroborado por García y colaboradores⁶⁸ y por Zhenjun Zhao y colaboradores en 2000.⁹⁴ En este último estudio, se determinó que, además de la naturaleza del transportador, el reconocimiento se ve afectado por la superficie a la que se encuentra unido el antígeno. Además, el efecto de la longitud del polímero de lisina fue también evaluada, concluyendo que un aumento en la longitud del polímero no mejoraba la capacidad de unión de IgE específica, si bien reducía la relación señal/ruido.⁶²

Todos estos resultados han conducido a que muchas de las pruebas de diagnóstico en uso empleen PLL como transportador para la preparación de los antígenos. Actualmente uno de los antígenos más utilizados en el diagnóstico de estas alergias es la octa-L-lisina unido a penicilloyl (Figura 11).⁹⁵

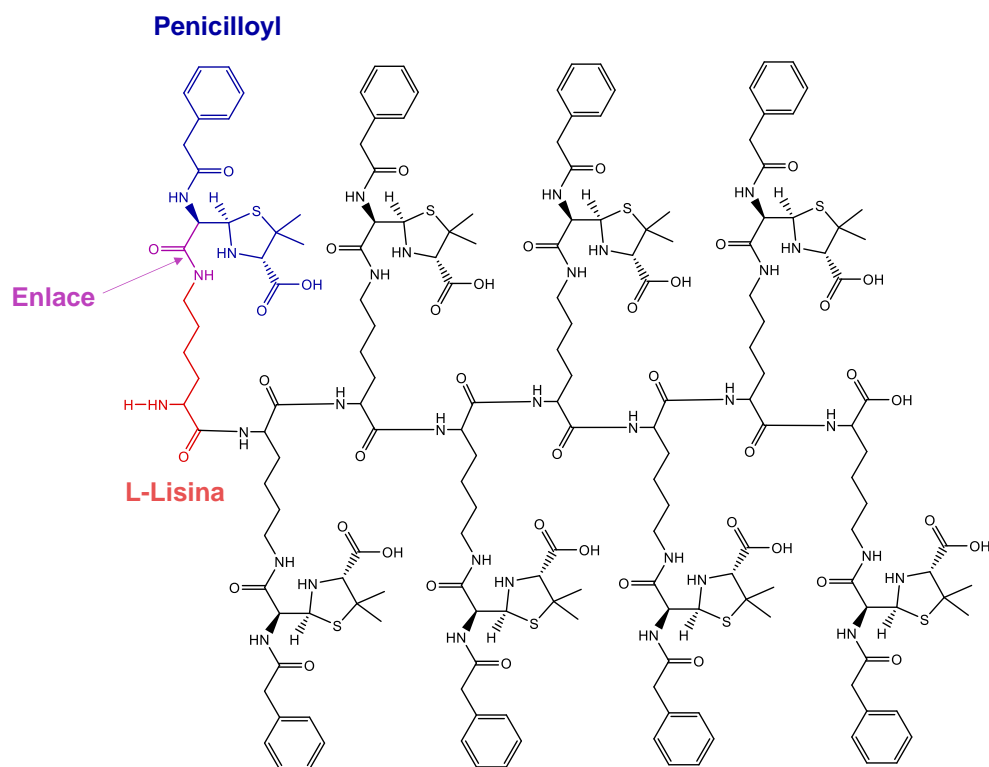


Figura 11. Estructura química de los determinantes antigénicos sintetizados con octa-l-lisina.

A pesar de las ventajas presentadas por la PLL, como su multivalencia, su accesibilidad, y la sencilla modificación química, la utilización de PLL como transportador dificulta la caracterización del determinante antigénico debido a la distribución aleatoria de los haptenos.⁴⁶ Así mismo, el plegamiento aleatorio de la estructura polimérica hace difícil predecir su estructura tridimensional.

Alternativamente, se han utilizado otras estructuras poliméricas como los dendrímeros a modo de transportador. Los dendrímeros son macromoléculas muy ramificadas con una estructura tridimensional de árbol bien definida, y son sintetizados mediante la adición de monómeros en capas ramificadas concéntricas, llamadas generaciones, alrededor de un núcleo central (Figura 12).^{102,103}

Los dendrímeros presentan múltiples ligandos idénticos muy reactivos que pueden reaccionar con haptenos aumentando la densidad de conjugación, y por ende, la sensibilidad del ensayo. Además, presentan una estructura química más estable y más fáciles de caracterizar que los transportadores ya existentes.^{46,96-101}

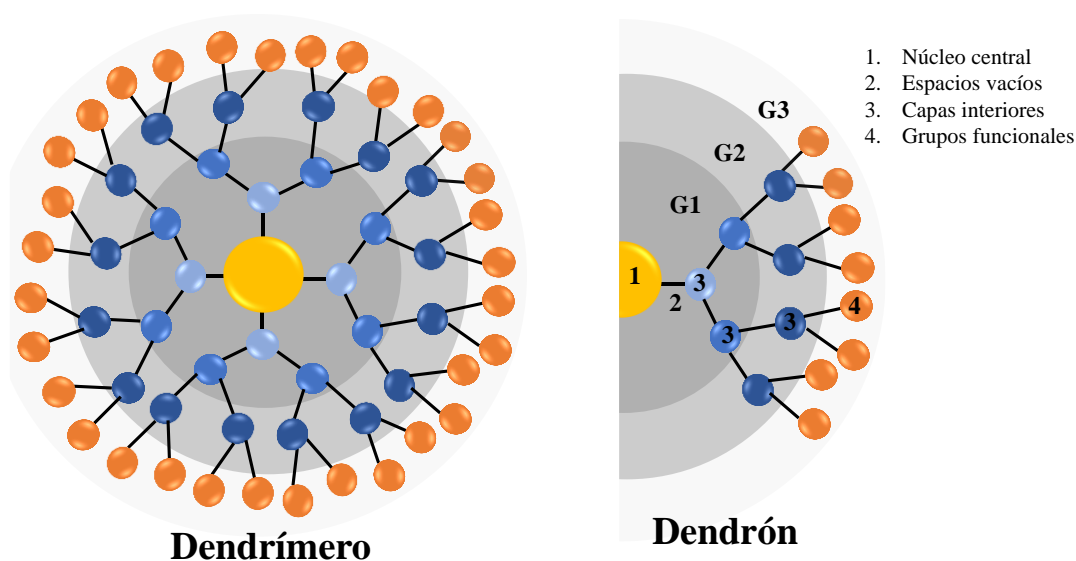


Figura 12. Representación de la estructura tridimensional de dendrímeros y dendrones.

El primer trabajo que describe el empleo dendrímeros como transportador para la formación de determinantes antigénicos de fármacos fue llevado a cabo en 2002, utilizando dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM) de tres generaciones diferentes (G_0 , G_1 , G_2).⁹⁹ La evaluación de su actividad en el reconocimiento de IgE fue realizada con sueros de pacientes alérgicos, mostrando mayor capacidad de reconocimiento que un monómero de penicilloyl. En este mismo estudio se observó que esta capacidad de reconocimiento era dependiente de la generación del dendrímero y la densidad de hapteno.

El uso de estos compuestos como transportadores en la preparación de antígenos ha mejorado la accesibilidad de la IgE, gracias a su estructura ramificada flexible.^{96-98,101}

Posteriormente se confirmó que la generación del dendrímero y la química de anclaje sobre superficies condicionaba el reconocimiento de la IgE, obteniéndose mejores resultados para la generación 4.¹⁰⁰ Un aumento en la ramificación química del dendrímero (G_5 y G_6) reduce el reconocimiento debido a fenómenos relacionados con impedimentos estéricos, disminuyendo el número de aminos expuestos.⁹⁶ Con el fin de reducir el impedimento estérico, otras aproximaciones han consistido en emplear brazos espaciadores que incrementan la hidrofilia de la superficie, la flexibilidad y distancia de estas estructuras. El uso de estos brazos espaciadores incrementó el número de dendrímeros anclados en la superficie y mejoró el reconocimiento de IgE, aumentando la sensibilidad clínica del ensayo.^{104,105}

Los dendrímeros, además de aumentar la capacidad de inmovilización y mejorar el reconocimiento de IgE, pueden conjugarse con dos o más haptenos diferentes (dendrímeros híbridos) para detectar simultáneamente IgE específica de pacientes con diferentes patrones de reconocimiento, incluyendo pacientes con una respuesta selectiva a PG y a AMX. Además, al ser estructuralmente más simples que las proteínas es posible su caracterización mediante técnicas de RMN (1D y 2D) y simulaciones moleculares dinámicas. Estas técnicas permiten conocer la diferente disposición espacial de los haptenos, y pueden ayudar a esclarecer el patrón de reconocimiento de la IgE, información muy valiosa para establecer la reactividad cruzada con otros fármacos.⁴⁶

Por lo tanto, se confirmó que estos compuestos sintéticos pueden ser utilizados como transportador de haptenos abriendo un campo nuevo en la preparación de conjugados para el diagnóstico de alergias a fármacos.

1.3.3. Reactividad cruzada

La reactividad cruzada entendida como la capacidad de la IgE de reconocer un fármaco diferente al que generó la respuesta inmunitaria es muy frecuente para esta familia de antibióticos. Esta propiedad se debe a que, como ya se ha comentado en la sección 1.3.2.1, los antibióticos β -lactámicos presentan una estructura química muy similar, llegando incluso a compartir la cadena lateral. La reactividad cruzada ha sido estudiada principalmente mediante pruebas cutáneas y es expresada en tanto por cien.

1.3.3.1. Reactividad cruzada entre penicilinas

Actualmente, se pueden identificar dos grupos de pacientes alérgicos a las penicilinas. Aquellos que presentan una respuesta no selectiva, es decir, sensibilizados a cualquier penicilina, reconociendo los determinantes comunes (penicilloyl, MDM), y aquellos pacientes que presentan una respuesta selectiva.⁹⁵ En un estudio de Torres y colaboradores¹⁰⁶ en el que se evaluaron 290 pacientes alérgicos a las penicilinas, se observó que el 57.9 % presentaron una respuesta no selectiva, generando reacción a diferentes determinantes de PG, tanto mayores como menores. El 42.1 % restante presentaban una respuesta selectiva, mostrando reactividad frente a AMX y tolerando la PG. Este estudio reveló que la IgE selectiva a AMX reconoce principalmente la cadena lateral,²⁷ justificando que exista una elevada reactividad cruzada entre las penicilinas

semisintéticas que presentan en su cadena lateral un grupo amino, como la AMX, AMP, bacampicilina y pivampicilina.¹⁰⁷ El porcentaje de respuesta selectiva varía entre diferentes estudios, además el aumento en el consumo de AMX, ha llevado a variar este porcentaje de un 40 a un 80 %.⁶¹

En el caso de la hipersensibilidad tipo IV, se observó que el 96.3 % y 95.1 % de los pacientes evaluados presentaban reactividad frente a la AMX y AMP, respectivamente. Por el contrario, sólo el 40.7 % de estos pacientes presentaban respuesta frente a PG¹⁰⁸, resultando pacientes no selectivos. Estos resultados fueron similares a los que se obtuvieron en el caso de la hipersensibilidad tipo I mediada por IgE.

La alergia a otras penicilinas semisintéticas como la PPR¹⁰⁹, penicilina V (PV)¹¹⁰⁻¹¹² y cloxacilina¹¹³ también ha sido observada, mostrando respuestas selectivas. Sin embargo, este comportamiento se ha dado en muy pocos casos, por lo que estos resultados no son concluyentes.¹¹⁴

1.3.3.2. Reactividad cruzada entre penicilinas y cefalosporinas

La reactividad cruzada entre las subfamilias de las penicilinas y cefalosporinas oscila entre 0 y 40 %, dependiendo de la estructura química del antibiótico que esté implicado en la reacción de hipersensibilidad. La cadena R₁ de las cefalosporinas es considerada factor clave para producir reactividad cruzada entre las penicilinas y las cefalosporinas.

Los primeros estudios de reactividad cruzada entre penicilinas y cefalosporinas establecieron que los pacientes alérgicos a PG mostraban un 10 % de reactividad frente a cefalosporinas de primera y segunda generación y un 2 – 3 % con las de tercera generación.¹⁰⁷ Estudios posteriores establecieron que en pacientes alérgicos a las penicilinas se incrementaba la reactividad a las cefalosporinas de primera generación, como cefalotina y cefalexina (CFL). Sin embargo, la reactividad era baja en las cefalosporinas de segunda y tercera generación.¹¹⁵ Esto es debido a que la cadena lateral de las penicilinas y las cefalosporinas de primera generación presenta una estructura química similar, por lo que ésta podría formar parte del epítipo responsable de la respuesta alérgica.

En base a este hecho, diversos estudios han evaluado la reactividad cruzada entre las aminopenicilinas, como la AMX y AMP, y las aminocefalosporinas, como cefadroxilo y CFL. Estos estudios mostraron un elevado grado de reactividad cruzada entre las aminocefalosporinas que compartían cadena lateral (14 – 38 %) (Tabla 3 y Tabla 4), mientras que no mostraron reactividad frente a otras cefalosporinas como cefamandol, CFZ o CFD, confirmando la hipótesis de que esta cadena forma parte del epítipo que reconocen las IgE presentes en suero de parte de los pacientes alérgicos.¹¹⁶⁻¹¹⁹

La reactividad cruzada entre antibióticos de la familia de las penicilinas y las cefalosporinas que no comparten la cadena lateral son poco frecuentes. Sin embargo, en un estudio de 124 pacientes alérgicos a las penicilinas, 14 dieron resultados positivos a las cefalosporinas de los cuales 4 presentaban reacción a cefalosporinas que no compartían similitud con la cadena lateral del antibiótico causante de la alergia, estableciendo que, aunque en la mayoría de los casos suministrar este tipo de cefalosporinas es seguro¹¹⁹⁻¹²³, puede ser un riesgo hacerlo sin realizar pruebas previas.¹²⁴ En el caso de la hipersensibilidad de tipo IV, la frecuencia de la reactividad cruzada entre pacientes alérgicos a las penicilinas y las cefalosporinas varía del 2.8 % al 31 %.^{125,126}

1.3.3.3. Reactividad cruzada entre las cefalosporinas

Estudios de reactividad cruzada de pacientes alérgicos a las cefalosporinas han mostrado tres patrones diferentes de reconocimiento: a) reactividad cruzada entre la cefalosporina implicada en el reconocimiento y la familia de las penicilinas (descrito en el apartado anterior), b) respuesta selectiva a la cefalosporina responsable de la reacción de hipersensibilidad, y c) reactividad cruzada con otras cefalosporinas.

Algunos estudios han establecido que entre el 50 y 60 % de los pacientes alérgicos presentan una respuesta selectiva.^{127,128} Sin embargo, el resto muestran reacción a diferentes cefalosporinas, principalmente aquellas que contienen en su estructura una cadena R₁ idéntica o similar a la que causó la hipersensibilidad, como es el caso de la cefuroxima (CFR), la cefotaxima (CFO), la ceftriaxona (CFT), y la ceftazidima (CFD) (Tabla 3 y Tabla 4). Todas estas cefalosporinas poseen en su cadena R₁ un grupo metoxiimino, implicado en el epítipo reconocido por los pacientes.^{51,52,54}

En pocas ocasiones se ha observado que la cadena R₂ esté implicada en el reconocimiento, ya que, como explicamos en la generación de los determinantes

antigénicos, esta cadena lateral se elimina en el proceso de degradación y anclaje a la proteína o transportador. A pesar de este hecho, hay evidencias de reactividad cruzada entre la cefoperazona y el cefamandol, los cuales presentan idéntica cadena R₂. Por lo que se puede concluir que, aunque en menor medida, esta cadena también puede estar implicada en la formación del epítipo (Tabla 3 y Tabla 4).⁵¹

Por último, un estudio más reciente concluyó que algunos pacientes presentaban reactividad cruzada a cefalosporinas que no compartían similitudes en sus cadenas laterales, como, por ejemplo, la CFT y la CFL o la CFZ y la CFL. Además, estos pacientes, no mostraron sensibilidad a otras cefalosporinas o penicilinas por lo que la estructura química central no podía estar implicada en el reconocimiento. Por lo tanto, como sugirieron los autores, la reactividad cruzada podría deberse a un proceso de co-sensibilización.¹²⁹









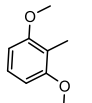

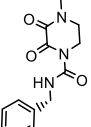


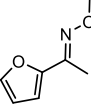




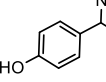
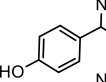

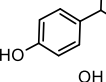

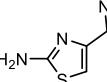
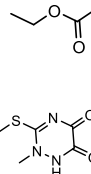

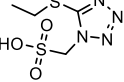
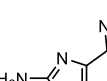


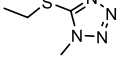
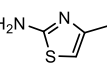

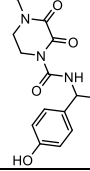
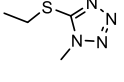

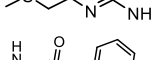

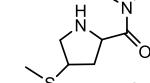

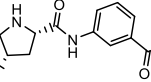

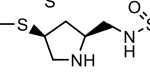
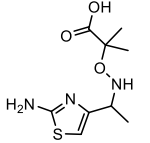
1.3.3.4. Reactividad cruzada con las carbapenemas

La reactividad cruzada entre diferentes carbapenemas está poco estudiada, ya que, estos antibióticos son menos prescritos y pocos pacientes presentan hipersensibilidad a estos fármacos. A pesar de la similitud de la estructura química de las penicilinas y las carbapenemas, la reactividad cruzada entre estas dos familias es poco frecuente. Algunos estudios con más de 100 pacientes alérgicos a las penicilinas han sido evaluados con distintas carbapenemas como el imipenem (IMP) y el meropenem (MRP), mostrando una reactividad cruzada por debajo del 1 %.¹³⁰⁻¹³⁴ Esta baja reactividad cruzada entre estas dos familias de fármacos, se ha confirmado en estudios clínicos en los que a pacientes alérgicos a las penicilinas se le administraban carbapenemas, mostrando una alta tolerancia. En el caso de las cefalosporinas, se observó que la reactividad también era baja, 1 % para MRP y un 2 % para IMP.¹³⁵ En un estudio de Nogueraldo y colaboradores¹³⁶, en el que se evaluó la reactividad cruzada entre carbapenemas en pacientes alérgicos se observó que los pacientes alérgicos a IMP no mostraban reactividad con MRP, pudiendo tolerarlo, y los pacientes alérgicos a MRP no mostraban reactividad con IMP. Por lo tanto, concluyeron que no existe reactividad cruzada entre fármacos de esta familia, debido en gran parte a que la cadena lateral es muy diferente y juega un papel esencial en la formación del epítipo.

1.3.3.5. Reactividad cruzada con las monobactamas

En el caso de las monobactamas, el hecho de que el anillo β -lactámico no esté condensado al anillo tiazolidina, hace de AZT un antibiótico que sólo produce hipersensibilidad de tipo I a un 0.2 % de las personas a las que se ha administrado.¹³⁷ La estructura de este fármaco apenas provoca reactividad con la familia de las penicilinas, sin embargo, en el caso de las cefalosporinas esta reactividad es ligeramente superior al 3 %. Probablemente, es debido a que este antibiótico comparte cadena lateral con CFD (Tabla 3 y Tabla 4).^{138,139} A pesar de estos datos de reactividad cruzada, un estudio con pacientes alérgicos a CFD que dieron positivo mediante *prick test* a AZT, toleraban su administración.¹⁴⁰ Sin embargo, estos resultados son poco concluyentes ya que el número de pacientes implicados en estos estudios es reducido y por tanto no representativo.

Tabla 4. Estructura química de las cadenas laterales de los antibióticos β-lactámicos.

	R ₁ Nombre		R ₁ Nombre		R ₁ Nombre		R ₁ Nombre				
	Penicilinas		Penicilina G		Ampicilina		Carbenicilina		Cloxacilina		
		Penicilina V		Amoxicilina		Tircacilina		Flucloxacilina			
		Meticillin		Pivampicilina		Piperacilina		Oxacilina			
	R₁	R₂	Nombre	R₁	R₂	Nombre	R₁	R₂	Nombre		
Cefalosporinas		-Cl	Cefaclor			Cefuroxima			Cefoxitina		
		-H	Cefalexina								
		-H	Cefadroxil								
			Cefprozil								
			Cefatrizina			Ceftriaxona					
			Cefonicid			Ceftazidima					
			Cefamandola			Cefazolina					
			Cefoperazona								
	R₁	R₂	R₃	Nombre	R₁	R₂	R₃	Nombre	R₁	R₂	Nombre
		-H		Imipenem		-CH ₃		Meropenem			
	-CH ₃		Ertapenem		-CH ₃		Doripenem				
MomoBactam	R₁		Nombre	R₁		Nombre					
				Aztreonam							

1.4. Diagnóstico de alergia a antibióticos β -lactámicos

Aproximadamente 108 millones de personas de países de occidente están etiquetadas como alérgicas a antibióticos β -lactámicos.¹⁴¹ Sin embargo, el 90 % de éstas no son realmente alérgicas y toleran su administración.¹⁴² Este mal etiquetado es un importante problema de salud pública ya que se relaciona con la resistencia bacteriana y restringe el uso de sustancias activas frente a bacterias condicionando la administración de otros fármacos.

En general, los pacientes considerados como alérgicos a los antibióticos β -lactámicos son tratados con fluoroquinolonas, vancomicina, glucopéptidos, aminoglucósidos entre otros antibióticos alternativos. Estos fármacos son menos efectivos, más tóxicos, más caros y de menor espectro de actuación que los β -lactámicos, lo que conlleva tiempos más largos de hospitalización y resistencia bacteriana.¹⁴³⁻¹⁴⁶ Como consecuencia se hace imprescindible el desarrollo de sistemas de diagnóstico que permitan el correcto etiquetado de pacientes, mejorando la seguridad en la administración de fármacos y disminuyendo los costes sanitarios relacionados con esta práctica. Actualmente, el protocolo de actuación para el diagnóstico de la hipersensibilidad a antibióticos β -lactámicos es complejo e incluye, el historial clínico del paciente y ensayos *in vivo* e *in vitro* (Figura 13).

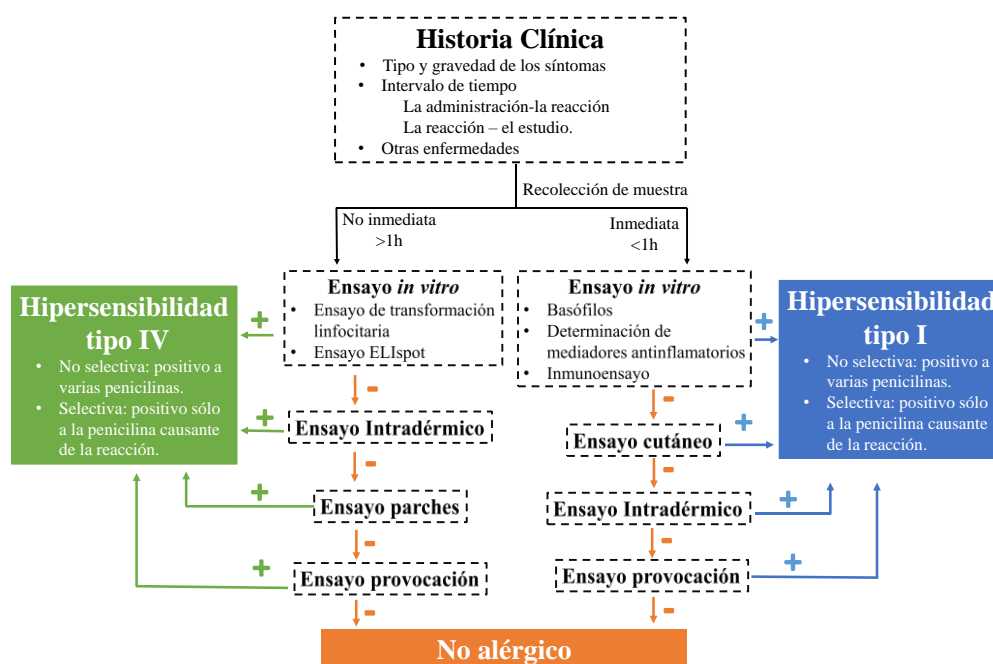


Figura 13. Protocolo de actuación para el diagnóstico de alergia a β -lactámicos.

No obstante, aunque la historia clínica del paciente revela información importante, a menudo no es concluyente por lo que es necesario el uso de ensayos *in vivo* e *in vitro* para complementar y establecer un diagnóstico correcto.¹⁴⁷

1.4.1. Ensayos *in vivo*

Las pruebas *in vivo* que se utilizan en la actualidad para el diagnóstico de alergia a antibióticos β -lactámicos son ensayos dermatológicos y de provocación.

1.4.1.1. Ensayos dermatológicos

Las pruebas cutáneas más utilizados para el diagnóstico *in vivo* de alergia a fármacos son el *prick test* y la prueba de intradermorreacción (Figura 14). Estas han sido consideradas los métodos más válidos para el diagnóstico de alergia a β -lactámicos tanto en Europa como en EE.UU.⁵

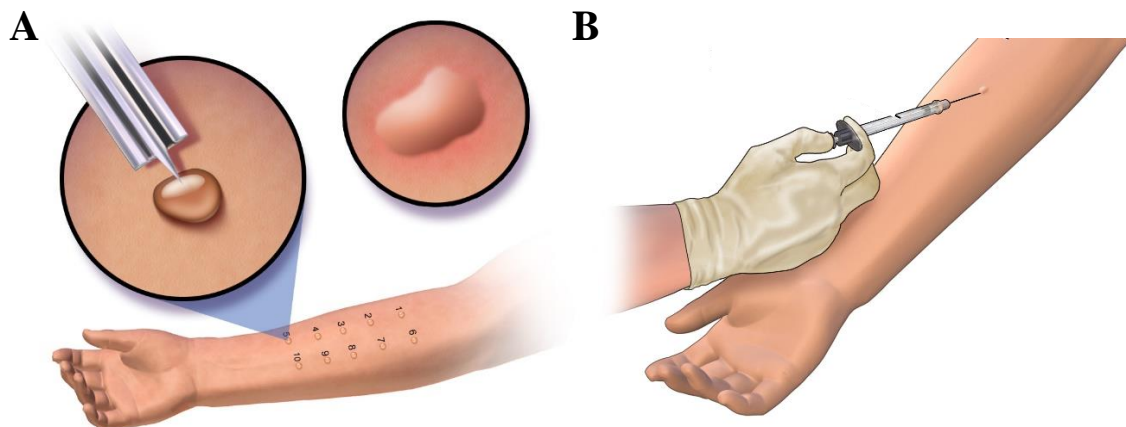


Figura 14. Representación de los métodos *in vivo* de diagnóstico de la alergia a antibióticos β -lactámicos: *prick test* (A) y prueba intradérmica (B).

El *prick test* consiste en colocar una gota de una disolución de antibiótico β -lactámico sobre el antebrazo y pincharlo con una lanceta de forma perpendicular de manera que la gota penetre en la capa superficial de la piel. La concentración del alérgeno va a depender del riesgo que pueda conllevar la prueba para el paciente. En pacientes que presentan reacciones alérgicas severas la concentración del fármaco es mil veces menor a la concentración más alta no irritante, que suele variar entre 0.5 y 25 mg/mL en función del hapteno utilizado.¹⁴⁸ En el caso de un resultado positivo se reproduce la reacción alérgica generando eritema y una pápula en la zona de punción de un tamaño superior a

3 mm. Esta reacción aparece a los 15 - 20 minutos de la punción. El resultado siempre debe compararse con el de los controles que se aplican, tanto positivo (control de histamina), como negativo (suero fisiológico) ya que tener respuesta no es necesariamente síntoma de alergia.

Si el *prick test* es negativo, se realiza la prueba intradérmica que consiste en inyectar en la dermis 20 - 50 μ L del fármaco a una concentración 10 veces inferior a la aplicada en el *prick test*. En este caso, el resultado es positivo cuando se genera una ampolla de al menos 5 mm de diámetro.¹⁴⁹

Los primeros estudios que utilizaron este sistema como metodología para el diagnóstico, utilizaban los determinantes mayores y menores de PG. Estos estudios obtuvieron diferentes grados de respuesta siendo positivos por encima del 50 % de los casos.¹⁵⁰

El porcentaje de respuesta positiva de los ensayos dérmicos usando los determinantes mayores y menores de penicilina ha ido variando en el tiempo con el cambio de la prescripción médica y el aumento del consumo de penicilinas sintéticas y cefalosporinas.^{1,5} Entre 1990 y 2000 el porcentaje de positivos que se obtuvo fue del 26 al 47.5 % de los casos.^{118,151} Más tarde se observó que la incorporación de AMX y AMP mejoraba la sensibilidad clínica en un rango que oscila entre el 50 y 80 %.¹⁵²⁻¹⁵⁴ A pesar de estos resultados los determinantes mayores y menores siguen jugando un papel importante en el diagnóstico de la hipersensibilidad inmediata a fármacos (IDH).³⁷ El aumento de la reacción de hipersensibilidad a los inhibidores de las β -lactamasas como el CVL ha obligado a incluir este compuesto al panel de ensayos dérmicos, obteniendo una sensibilidad del 19 % en *prick test* y 81.2 % en ensayos intradérmicos.^{59,60}

En términos económicos, el diagnóstico mediante ensayos dermatológicos oscila alrededor de 300 € por paciente, incluyendo tanto los gastos directos como los indirectos.¹⁵⁵

Con la incorporación de nuevos antibióticos, la sensibilidad clínica de los ensayos dérmicos ha mejorado, aunque en muchas ocasiones es necesario confirmar el diagnóstico con otro tipo de prueba como el ensayo de provocación.

1.4.1.2. Ensayo de provocación

El ensayo de provocación es considerado la prueba *in vivo* de referencia para el diagnóstico correcto de alergias a fármacos ya que permite reproducir los síntomas de la alergia y clasificarla. Por lo tanto, este ensayo permite tanto diagnosticar el tipo de hipersensibilidad como establecer la reactividad cruzada entre fármacos y la tolerancia a los mismos.¹⁵⁶ Esta prueba consiste en la administración controlada de dosis crecientes del fármaco, bajo supervisión médica. Este procedimiento suele utilizarse cuando hay discrepancias en los resultados del *prick test*, o para confirmar el diagnóstico cuando el resultado del *prick test* o los ensayos *in vitro* son negativos. Sin embargo, esta prueba no está recomendada en aquellos pacientes con un historial de reacciones graves.¹⁵⁷ Durante la realización del ensayo, el paciente debe permanecer en un entorno hospitalario con instalaciones de reanimación y cumpliendo un alto nivel de seguridad. Estos requisitos conllevan un elevado coste. En 2018 se calculó que una prueba de provocación básica supone un coste adicional de 359 dólares al sistema de salud de Estados Unidos. A pesar de la gravedad de los síntomas y su elevado coste, muchos autores lo consideran como la primera línea del diagnóstico, ya que más del 30 % de los pacientes podían ser diagnosticados con precisión solo mediante la prueba de provocación.¹⁵⁸ La Tabla 5 muestra algunas de las ventajas e inconvenientes que presenta este tipo de ensayo.

Tabla 5. Ventajas y desventajas del ensayo de provocación.¹⁵⁹

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none">• Confirmación o exclusión de hipersensibilidad• Menor uso de antibióticos de amplio espectro• Perfil de seguridad generalmente bueno• Reducción del riesgo de resistencia bacteriana• Previsión de alternativas seguras	<ul style="list-style-type: none">• Potencialmente peligrosa• Obtención de falsos positivos y falsos negativos• Riesgo de resensibilización• Falta de protocolos estandarizados• Los síntomas subjetivos podrían ser difíciles de interpretar• Requiere de personal experimentado, protocolo de actuación y entornos clínicos bien establecidos

1.4.2. Ensayos *in vitro*

La falta de sensibilidad de las pruebas dérmicas, el riesgo de los ensayos de provocación, el alto coste económico de ambos y la necesidad de que las pruebas *in vivo* sean realizadas en un hospital con profesional médico cualificado, son los principales motivos por los que se han desarrollado ensayos alternativos más baratos y complementarios. En este sentido, los ensayos *in vitro* están ganando aceptación en la práctica clínica de rutina.

1.4.2.1. Test de activación de basófilos

El test de activación de basófilos es una de las pruebas *in vitro* utilizadas para el diagnóstico de alergias mediadas por IgE. Este ensayo se basa en la determinación de la activación o degranulación de los basófilos tras la estimulación *in vitro* con el alérgeno mediante citometría de flujo. Los dos principales biomarcadores de la activación de los basófilos son el CD63, que se encuentra expresado en las vesículas que contienen la histamina en basófilos, mastocitos, macrófagos, plaquetas, etc., y que tras la degranulación de los basófilos es expresada en su superficie y el CD203c, que se encuentra sobreexpresado en la superficie tras la activación de los basófilos, y a diferencia del anterior es exclusivo de basófilos y mastocitos.¹⁶⁰ El uso de uno u otro marcador en la detección de la activación va a depender del fármaco utilizado en la estimulación.¹⁶¹

El test de activación de basófilos ha demostrado ser útil como ensayo complementario a los ensayos *in vivo*, especialmente en aquellas situaciones en los que no hay otro ensayo de diagnóstico disponible, ya que es posible obtener un resultado positivo en pacientes que muestran resultados negativos con los ensayos dérmicos.¹⁶² Sin embargo, estos ensayos presentan algunas desventajas. Por un lado, la prueba debe realizarse por personal especializado, debido a la complejidad del ensayo e interpretación de los resultados. Además, actualmente no existen protocolos estandarizados de trabajo. Por otro lado, se requieren altas concentraciones del β -lactámico, ya que los fármacos inducen una menor activación de los basófilos que las proteínas. Así mismo, el fármaco debe utilizarse recién preparado para evitar procesos de degradación¹⁶³ y en un periodo de 4 horas desde que se realiza la extracción sanguínea.¹⁶⁴

Con respecto a las prestaciones clínicas de esta prueba, en estudios llevados a cabo con pacientes con alergia a antibióticos β -lactámicos, se observó una sensibilidad media del 51.7 % y una especificidad media del 89.2 %.^{59,165-168} Sin embargo, la sensibilidad clínica se ve altamente influenciada por el intervalo de tiempo que transcurre entre la reacción alérgica y la realización del ensayo, disminuyendo hasta un 50 %. Por lo tanto, no se recomienda la realización de esta prueba 12 meses después de la reacción alérgica.¹⁶⁴

1.4.2.2. Ensayo de determinación de mediadores inflamatorios

Uno de los ensayos *in vitro* más utilizados para confirmar la anafilaxis, es la determinación de triptasa en suero sanguíneo. Se ha demostrado que niveles elevados de triptasa en sangre están relacionados con la gravedad de la reacción anafiláctica. Otros de los mediadores antiinflamatorios que pueden ser determinados en suero tras la reacción alérgica provocada por fármacos es la histamina. Esta molécula es el indicador más abundante e importante de anafilaxis. El ensayo para la determinación de este mediador en suero presenta una sensibilidad y especificidad clínica que oscila entre el 51 – 92 %. El problema asociado a la determinación de este biomarcador en suero es que tiene un tiempo de vida medio de 20 minutos lo que afecta a la sensibilidad del ensayo. Como alternativa se determina también el nivel de metabolitos de histamina (N-metil-histamina y ácido acético N-metil-imidazol) en muestras de orina, pudiéndose medir hasta 24 horas después de la reacción.¹⁴⁷

1.4.2.3. Ensayo de liberación de histamina

El ensayo de liberación de histamina (HRT) se basa en la detección de la histamina que liberan los basófilos tras la estimulación con el fármaco causante de la alergia.¹⁴⁹ Este ensayo consiste en estimular las células de una muestra de sangre con el antibiótico objeto de estudio y determinar la histamina liberada mediante técnicas fluorimétricas. El HRT se ha utilizado para el diagnóstico de reacciones alérgicas a varios alérgenos, pero rara vez en fármacos. Existe una variante de este ensayo denominado pasivo, en el que se requiere sólo de suero y no células, presentando la ventaja de poder realizar el ensayo pasadas las 24 horas de la extracción de la sangre.¹⁶⁹ Este método es útil cuando no existe ningún otro método *in vitro* para el diagnóstico de alergias a un fármaco concreto como es el caso del CVL. En este contexto, se evaluaron las prestaciones de la prueba HRT en

grupos de pacientes alérgicos al CVL. Este ensayo alcanzó una sensibilidad clínica del 55 % y una especificidad del 85 %, un resultado similar a los obtenidos con los test de activación de basófilos.¹⁷⁰

1.4.2.4. Inmunoensayos

La IgE es otro de los marcadores comunes de hipersensibilidad tipo I. Esta macromolécula es una glucoproteína de 190 kDa que puede encontrarse de forma soluble en sangre tras una respuesta alérgica o unida a la superficie de los mastocitos mediante el receptor de alta afinidad. Al igual que las demás inmunoglobulinas, está constituida por una región común o cristalizable (Fc) y una región variable (Fab). Esta región variable le confiere selectividad y permite discernir el causante de la respuesta alérgica.

En este contexto, la determinación de este biomarcador está tomando cada vez más peso en el diagnóstico de alergia. El método más utilizado para su determinación en muestras de suero sanguíneo es mediante inmunoensayo. A diferencia del test de activación de basófilos, esta prueba no necesita realizarse con sangre recién extraída. Además, son ensayos simples, pudiendo realizarse en laboratorios poco equipados. Básicamente, el inmunoensayo es un ELISA indirecto, en el que los alérgenos o antígenos inmovilizados en una superficie polimérica son reconocidos por la IgE específica presente en el suero de los pacientes alérgicos. Este reconocimiento alérgeno-anticuerpo se pone de manifiesto mediante el uso de un anticuerpo anti-IgE marcado y detección radiactiva u óptica (Figura 15A).

Algunos inmunoensayos permiten no solo la detección de este biomarcador, sino su cuantificación. Diversos estudios han determinado que existe relación entre la concentración de IgE específica y la severidad de los síntomas.¹⁷¹ Por lo tanto, cuantificar este biomarcador es de gran importancia. Actualmente, el sistema de calibración más utilizado en los ensayos *in vitro* para la determinación de IgE específica es el heterólogo (Figura 15B.I). En este tipo de calibración se utiliza un material certificado por la OMS de IgE total, como calibrador y presenta la ventaja de ser genérico y poder cuantificar indirectamente cualquier IgE específica con una única curva de calibrado.¹⁷² Alternativamente algunos ensayos *in vitro* realizan una calibración homóloga (Figura 15B.II), partiendo de suero procedente de pacientes alérgicos con concentración de IgE específica conocida y calculada a partir de la calibración heteróloga.

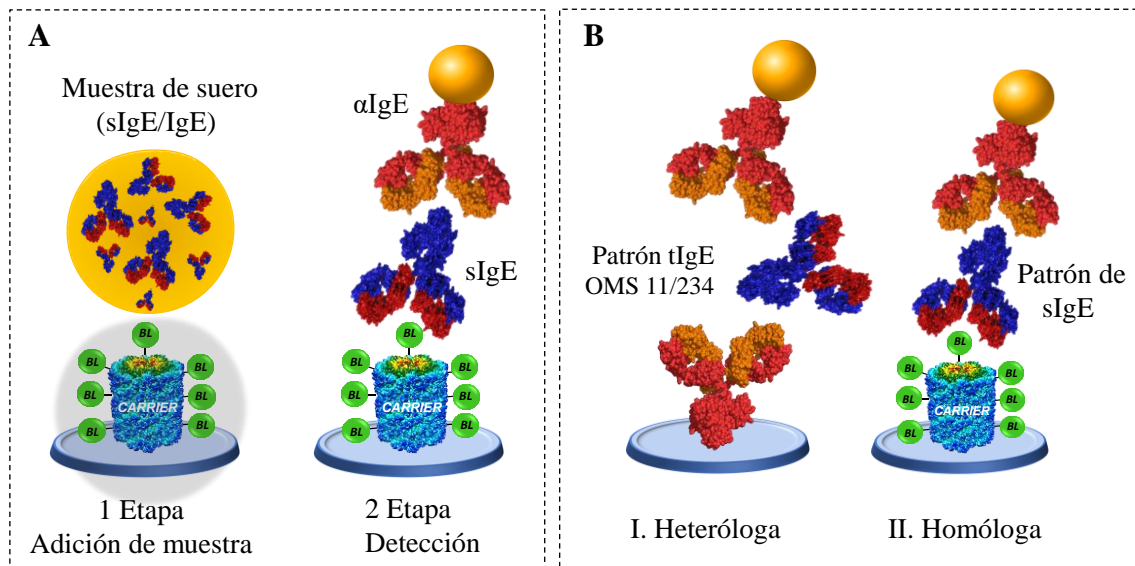


Figura 15. Esquema del inmunoensayo para la determinación de IgE específica (A). Representación de los sistemas de calibración para la cuantificación de IgE en los ensayos *in vitro* (B).

Los pacientes alérgicos pueden ser clasificados en función de la concentración de IgE específica presente en suero y la severidad de la respuesta alérgica (Tabla 6).

Tabla 6. Clasificación de pacientes alérgicos de acuerdo con la concentración de IgE específica presente en suero.

Clase	Concentración (UI/mL)	Nivel
0	< 0.35	Negativo
1	0.35 - 0.70	Bajo
2	0.7 - 3.5	Medio
3	3.5 - 17.5	Alto
4	17.5 – 50	Muy alto
5	50 – 100	Muy alto
6	> 100	Extremadamente Alto

Actualmente son varios los ensayos comerciales que se han desarrollado para el diagnóstico de este tipo de alergias (Figura 16). La Tabla 7 muestra las diferencias y similitudes de algunos de estos ensayos *in vitro*.

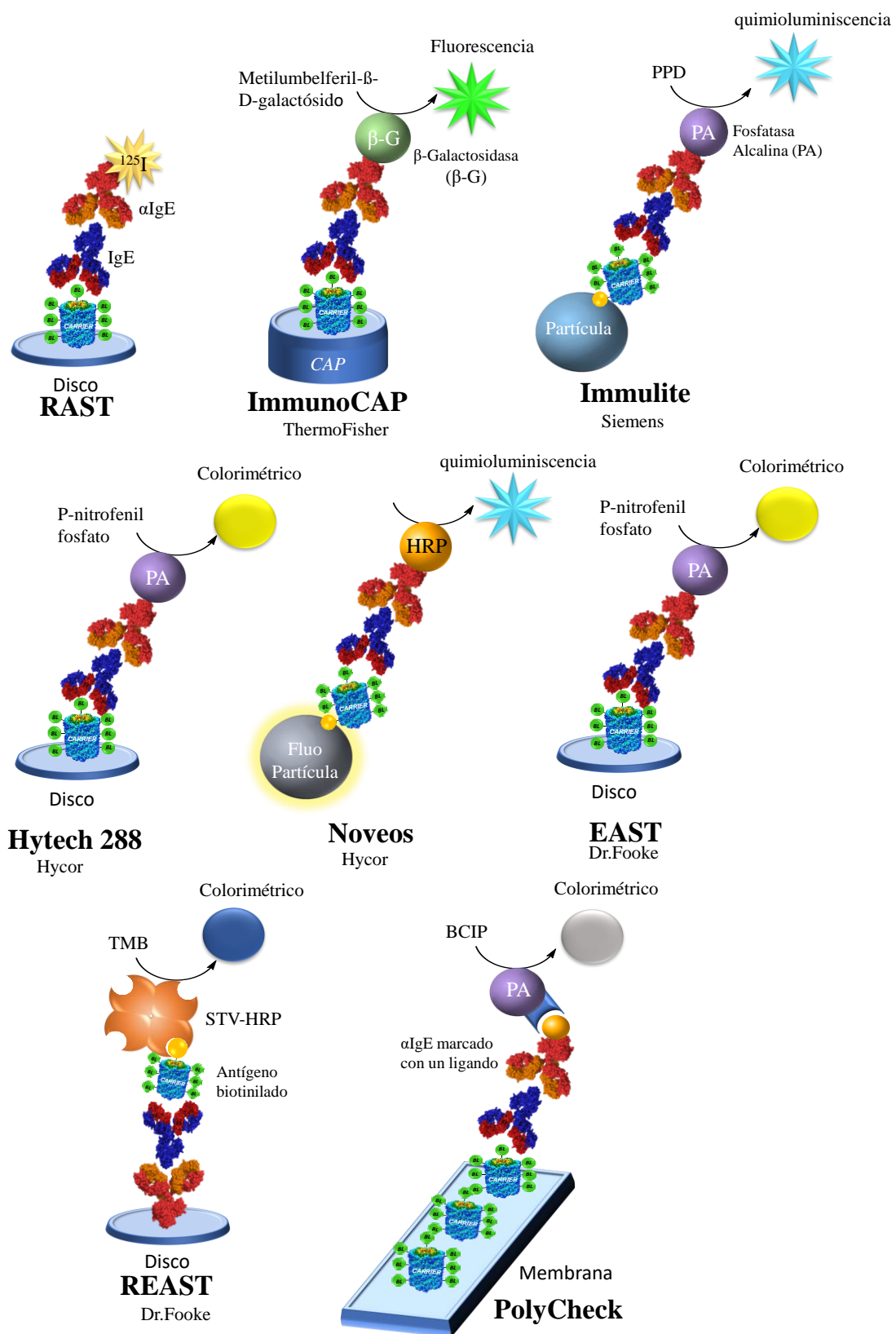


Figura 16. Esquema de los principales ensayos comerciales de diagnóstico in vitro de reacciones alérgicas a antibióticos β -lactámicos.

Tabla 7. Características analíticas y clínicas de ensayos *in vitro* comerciales para la determinación de IgE específica en suero.

	RAST	ImmunoCAP (ThermoFisher)	Immulite (Siemens)	Hytech 288 (Hycor)	Noveos (Hycor)	EAST (Dr.Fooke)	REAST (Dr.Fooke)	Polycheck
Antígeno	PLL-BL HSA-BL	Octa-PLL-BL	-	-	-	HSA-BL	HSA-BL	-
BL disponibles	Personalizado	PG, PV, AMX, AMP, CFC	PG, PV, AMX, AMP	PG, PV AMX, AMP, CFL, CFR, CFC, CFO	PG, PV AMX, AMP, CFL, CFR, CFC, CFO	PG, PV AMX, AMP	PG, PV AMX, AMP	PG, PV AMX, AMP, CFC
Superficie	Sephadex/ papel	Cap (capsulas polimerizadas)	Partículas de poliestireno	Disco de celulosa	Partículas fluorescentes	Disco de celulosa	Disco de celulosa	Membranas
Tipo	Cualitativo/ Semicuantitativo	Cuantitativo	Cuantitativo	Cuantitativo	Cuantitativo	Cuantitativo	Cuantitativo	Cuantitativo
Calibración	-	Heteróloga	Heteróloga	Heteróloga	Heteróloga	Heteróloga	Heteróloga	Homóloga
Detección	Radioactividad	Fluorescencia	CLIA	Colorimétrico	Fluorescencia	Colorimétrico	Colorimétrico	Colorimétrico
Multiplex	No	No	No	No	CLIA No	No	No	Si
Automatizado	No	Si	Si	Si	Si	No	No	Si
Formato	Indirecto/ Competitivo	Indirecto	Indirecto	Indirecto	Indirecto	Indirecto	Reverso	Indirecto
Vol. Suero (μL)	50	40	-	40	4	50	50	200
Sensibilidad (%)	43 - 75	30	9	ND	ND	ND	ND	ND
Especificidad (%)	68 -83	93	100	ND	ND	ND	ND	ND

➤ **RAST**

La primera prueba *in vitro* desarrollada para el diagnóstico de alergia a antibióticos β -lactámicos fue el ensayo RAST (*Radio Allergo Sorbent Test*). Este ensayo consiste en inmovilizar el antígeno covalentemente sobre una superficie activada de sephadex o discos de celulosa, y utilizar un anticuerpo marcado con el isótopo ^{125}I como anticuerpo detector. El sistema se desarrolló inicialmente para la determinación de IgE de PG y PV, utilizando penicilloyl como determinante antigénico mayor unido a HSA. Sin embargo, con el tiempo se han ido evaluando otros transportadores (PLL, dendrímeros, brazos espaciadores...) con el fin de mejorar la sensibilidad clínica de la prueba y se han ido incorporando antígenos de otros β -lactámicos, como AMX o diferentes cefalosporinas. Hoy en día, el transportador más utilizado es la PLL ya que ha demostrado presentar mayor capacidad de conjugación que la HSA.^{68,173}

La concentración de IgE presente en una muestra de suero es expresada en términos de porcentaje de señal y calculada de acuerdo a la ecuación 1, considerándose positivos aquellos pacientes que presentan un valor superior al 2.5 %. Así pues, el ensayo RAST es una prueba cualitativa.

$$\% \text{ RAST} = \frac{\text{cuentas por minuto (cpm) del determinante antigénico} - \text{cpm (PLL)}}{\text{cpm máximo}} \quad \text{Ec. 1}$$

El RAST de inhibición es una variante de este ensayo que consiste en añadir a la muestra diferentes concentraciones de otros antibióticos β -lactámicos y evaluar si existe reducción de la intensidad de radioactividad debido a un proceso de competición entre analitos. Esta variante se utiliza principalmente para evaluar si existe reactividad cruzada entre fármacos y si un paciente desarrolla una respuesta heterogénea.

El ensayo RAST presenta una sensibilidad clínica de entre el 42.9 y el 75 %, ligeramente superior a la obtenida por otros ensayos *in vitro*. Sin embargo, la especificidad del inmunoensayo es más baja (67.7 - 83.3 %).²¹ Este test de diagnóstico presenta un importante inconveniente adicional. La manipulación de material radiactivo, que además del elevado coste económico, supone un riesgo sanitario y ambiental.

➤ **ImmunoCAP (ThermoFisher)**

Este ensayo para el diagnóstico de alergia es considerado actualmente como el método de referencia para la determinación *in vitro* de IgE. El soporte utilizado para la inmovilización de los alérgenos es un polímero hidrofílico altamente ramificado derivado de la celulosa que se empaqueta dentro de una cápsula. La capsula desarrollada o *cap* presenta una mayor capacidad de unión que los discos de celulosa convencionales.¹⁷⁴ Hay *caps* disponibles para una amplia variedad de alérgenos ambientales y alimentarios. Sin embargo, se dispone sólo de cinco *caps* para antibióticos β -lactámicos (PG, PV, AMX, AMP y CFC), formados por el determinante mayor del β -lactámico unido a un polímero de lisina (octa-L-Lisina) a través de la amina primaria libre. Este ensayo utiliza un formato enzimático fluorescente como modo de detección.

ImmunoCAP ha supuesto una mejora frente al RAST de primera generación, no sólo por la eliminación de material radioactivo sino también por la automatización del ensayo y la capacidad de cuantificación de IgE. La cuantificación se realiza mediante calibración heteróloga. Los resultados obtenidos se expresan en IU/mL o KU/L. Estas unidades pueden ser convertidas a μ g de IgE por litro de muestra utilizando el factor de equivalencia, 1 IU = 2.4 μ g/L.

Esta prueba de diagnóstico permite cuantificar IgE específica en un rango de 0.1 KU/L a 100 KU/L y establece 0.35 KU/L como el valor umbral para discriminar un sujeto alérgico de uno no alérgico. La sensibilidad y especificidad clínica de este ensayo varía en función de la población de pacientes utilizada en el estudio y del β -lactámico involucrado en la reacción alérgica, siendo el valor medio de 30 % y 93 %, respectivamente (Tabla 8). La especificidad del método es menor para la PV, observándose un aumento de falsos positivos (26 %), y cuando la concentración de IgE total es elevada.^{149,175,176}

Actualmente se está contemplando disminuir el umbral a 0.1 KU/L, valor del límite de detección del sistema, con el fin de obtener una mayor sensibilidad clínica. Sin embargo, esta medida lleva asociado una menor especificidad, especialmente en aquellos casos en que la concentración de IgE total es superior a 200 kU/L.^{176,177}

Tabla 8. Resumen de los resultados de sensibilidad y especificidad clínica de la prueba ImmunoCAP obtenidos en los diferentes estudios realizados hasta la fecha.

Antibiótico	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	N	Ref.
PG, AMX, AMP	32	89	58	178
PG	32	98	-	179
AMX	43	98	-	179
PG, AMX	50	96	129	179
PG, PV, AMX, AMP	38	87	88	165
PG, AMX	16	100	37	180
PG, PV, AMX	27	96	36	181
PG, AMX, AMP, CFC	0 – 25	83 - 100	45	173
PG, PV, AMX, AMP	43	95	293	177
AX, PG, AMP, CEF	17	93	45	173
AX, PG, CEF	38	83	97	182

➤ **3gAllergy™ Immulite (Siemens)**

La compañía Siemens ha desarrollado un sistema de diagnóstico *in vitro* de alergias, 3gAllergy™ Immulite.¹⁸³ Este sistema utiliza alérgenos biotinilados que son incubados en formato homogéneo con la muestra de suero. La IgE específica presente en el suero de pacientes alérgicos es capturada en disolución por los alérgenos biotinilados, y a su vez estos son capturados por partículas recubiertas con estreptavidina mediante la unión específica STV-biotina. Finalmente, el complejo generado es reconocido por un α IgE marcado con fosfatasa alcalina y detectado mediante un revelado quimioluminiscente.¹⁸⁴

El sistema Immulite está totalmente automatizado y permite la cuantificación de IgE de cuatro antibióticos β -lactámicos (PG, PV, AMP, AMX). Al igual que ocurre con el ensayo ImmunoCAP, la cuantificación se lleva a cabo mediante una calibración heteróloga utilizando el patrón internacional OMS 75/502.

Con respecto a las prestaciones clínicas del ensayo, los estudios realizados establecen que el sistema presenta una menor sensibilidad clínica que el método de referencia, pero mayor especificidad.¹⁸¹ Sin embargo, estos resultados no son concluyentes ya que este

sistema está muy poco extendido y son pocos los estudios que han evaluado sus prestaciones para la determinación de sIgE a β -lactámicos.

➤ ***Hytech 288 plus***

Hytech es uno de los ensayos de diagnóstico de la empresa Hycor.¹⁸⁵ Este ensayo utiliza una fase sólida activada a la que el alérgeno va anclado covalentemente, un anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina como detector y p-nitrofenil fosfato como sustrato. El sustrato tras ser transformado por la fosfatasa genera un compuesto coloreado cuya intensidad (absorbancia) se relaciona con la concentración de IgE.

Este sistema permite analizar de forma automática 50 muestras de suero y 288 alérgenos por muestra. Su catálogo de alérgenos es de los más amplios que actualmente existen pudiendo evaluar 8 β -lactámicos diferentes (PG, PV, AMX, AMP, CFL, CFR, CFC y CFO). Sin embargo, no hay estudios que evalúen las prestaciones clínicas del ensayo para la determinación de sIgE a estos fármacos.

➤ ***Noveos***

Un sistema reciente comercializado también por la empresa Hycor es la prueba de diagnóstico Noveos. Este ensayo, al igual que Immulite, utiliza micropartículas con estreptavidina capaces de unir selectivamente los alérgenos biotinilados y emitir fluorescencia. Tras la inmovilización de los alérgenos y posterior incubación con la muestra, el reconocimiento alérgeno-IgE se pone de manifiesto utilizando un α IgE marcado con HRP y revelado quimioluminiscente (CLIA). La combinación de fluorescencia y quimioluminiscencia hace que el ensayo sea más fiable. Este ensayo presenta la ventaja de utilizar sólo 4 μ L de suero por ensayo, 10 veces menos que otras pruebas de diagnóstico *in vitro*, y una sensibilidad inferior a 0.1 UI/mL. Además, este ensayo reduce las interferencias con otras moléculas, como carbohidratos o biotina, presentes en suero, mejorando su selectividad. El tiempo total de ensayo es de 80 minutos y permite realizar decenas de ensayos simultáneamente. Aunque este sistema ha mostrado buenos resultados para múltiples alérgenos aún no ha sido validado para la determinación de IgE frente a β -lactámicos.

➤ **Dr. Fooke**

La compañía Dr Fooke, dispone de dos ensayos *in vitro* para el diagnóstico de alergias a antibióticos β -lactámicos, los ensayos EAST y REAST.¹⁸⁶

El ensayo EAST presenta un formato similar al usado en el sistema de diagnóstico, Hytech (Fig. 16). Sin embargo, en la metodología REAST, el α IgE es la especie inmovilizada sobre la superficie de los discos de celulosa en lugar del alérgeno, de forma que este anticuerpo captura la IgE presente en la muestra de suero, tanto específicas como no específicas. En la siguiente etapa, se añade el alérgeno biotinilado que es reconocido por la IgE específica capturada en la etapa anterior del ensayo. Este reconocimiento es puesto de manifiesto gracias a la adición de STV marcada con HRP, que se une específicamente al complejo con biotina. El ensayo se revela con TMB. Este tipo de ensayo es considerado “ensayo reverso” y es especialmente útil cuando en la muestra existen otros componentes, como la IgG, que pueden unirse al alérgeno. A diferencia de los ensayos comercializados por Thermofisher y Hycor, este ensayo no se encuentra automatizado.

Al igual que ocurre con los sistemas de la empresa Hycor, la sensibilidad y especificidad clínica de los ensayos EAST y REAST no ha sido evaluada para la determinación de IgE específica de ninguno de los 4 antibióticos β -lactámicos incluidos en su catálogo (PG, PV, AMX y AMP).

• **PolyCheck**

Los ensayos de diagnóstico descritos anteriormente no permiten la determinación simultánea de IgE frente a varios alérgenos. Aunque actualmente existen multitud de sistemas multiplex para la determinación de alergia tanto ambiental como alimentaria, como ImmunoCAP ISAC, ninguno de ellos ha sido aplicado a la determinación de sIgE a fármacos, posiblemente porque la concentración es muy baja (< 10 UI/mL) en comparación con el resto de alergias. El único sistema comercial que actualmente permite el análisis de alergia a varios β -lactámicos simultáneamente es Polycheck.¹⁸⁷ Este ensayo presenta dos modalidades, una automatizada y otra manual. El ensayo consiste en inmovilizar varios alérgenos en una membrana en forma de tira reactiva. Seguidamente la IgE específica presente en la muestra de suero reconoce los alérgenos inmovilizados y este reconocimiento se pone de manifiesto en 3 etapas, primero se añade un anticuerpo

monoclonal α IgE marcado con un ligando, seguidamente se añade una proteína conjugada a la fosfatasa alcalina capaz de unirse específicamente al ligando del anticuerpo primario y por último se añade BCIP como revelador. La intensidad del precipitado azulado es medida mediante escaneado de la membrana y tratado con un software propio. Este sistema permite la evaluación de sIgE frente a 10 fármacos diferentes, de los cuales 5 son antibióticos β -lactámicos (PG, PV, AMX, AMP, CFC). Sin embargo, las prestaciones clínicas del ensayo no han sido evaluadas en este sistema para la determinación de IgE específica frente a antibióticos β -lactámicos.

Resumen de las limitaciones de las pruebas de diagnóstico *in vitro* de alergias a antibióticos β -lactámicos

Los ensayos *in vitro* disponibles actualmente presentan limitaciones que los hace poco fiables para el diagnóstico de alergias a estos fármacos. Entre ellas destacan las siguientes:

1. Baja sensibilidad clínica. Los ensayos *in vitro* en uso presentan una sensibilidad clínica por debajo del 50 %. Esta baja sensibilidad puede ser debida al antígeno utilizado. Como se ha comentado, el determinante antigénico juega un papel crucial en el reconocimiento de IgE específica, ya que cada individuo genera sIgE a diferentes epítomos. Por lo que el uso de un único determinante antigénico puede dar lugar a falsos negativos, disminuyendo la sensibilidad del sistema. En consecuencia, una estrategia interesante para mejorar la sensibilidad del ensayo consistiría en usar diferentes determinantes simultáneamente, evaluando tanto el hapteno utilizado, como la proteína de conjugación, ya que ambos pueden influir en el reconocimiento de IgE específica. Además, la falta de sensibilidad puede deberse a la baja conjugación del hapteno y al tiempo que transcurre entre la reacción alérgica y el análisis clínico.¹⁴⁹

2. Ausencia de estandarización en la cuantificación IgE.¹⁸⁸ Los inmunoensayos *in vitro* en uso utilizan la estrategia de calibración heteróloga. La falta de patrones específicos de IgE ha llevado a una discordancia entre los resultados obtenidos entre diversas pruebas *in vitro*, lo que hace difícil establecer relaciones entre la concentración de IgE y los síntomas alérgicos.

3. Reactividad cruzada. Como ya se ha comentado, existe una elevada reactividad cruzada entre fármacos, tanto de la misma familia como de otras familias, por

su similitud estructural. La determinación de IgE específica a sólo 3-5 antibióticos, la mayoría de ellos de la familia de las penicilinas, hace que no se consiga evaluar la reactividad cruzada global con otros β -lactámicos, no pudiéndose establecer patrones de reconocimiento. La limitada información clínica impide el uso de toda esta familia de fármacos en pacientes alérgicos.

4. Detección monoanalito. La mayoría de los inmunoensayos desarrollados hasta ahora determinan la presencia de una única IgE específica de alérgeno β -lactámico por ensayo. Esto redundante en una información parcial. Para obtener un diagnóstico completo es necesario realizar diversas determinaciones, lo que conlleva un aumento del tiempo, costes y volumen de muestra.

5. Elevado coste. Los inmunoensayos comerciales actuales utilizan equipos muy voluminosos y de elevado coste para llevar a cabo la automatización y lectura de los resultados. Este problema conlleva que solo estén disponibles en hospitales de referencia y no en centros de atención temprana o consultorios médicos, aumentando los tiempos de espera. La IgE es un biomarcador cuya concentración disminuye con el tiempo desde que transcurre la respuesta alérgica, por lo que un aumento en los tiempos de espera se asocia a un descenso de la sensibilidad clínica de los inmunoensayos *in vitro*.

A pesar de estas limitaciones, son pocas las investigaciones que se centran en el desarrollo de nuevos ensayos de diagnóstico que mejoren las prestaciones tanto clínicas como analíticas. En los últimos 5 años, solamente se han desarrollado dos nuevos ensayos *in vitro* para el diagnóstico de alergia a estos fármacos, uno de ellos basado en SPR¹⁰¹ y otro basado en el concepto de magneto-ELISA.³⁹ El resto de las investigaciones se han centrado en la obtención de nuevos determinantes antigénicos y su aplicación en el ensayo RAST.

En este contexto, y con el fin de disponer de una metodología avanzada que supere las limitaciones de las pruebas de diagnóstico en uso, en esta tesis doctoral se propone la utilización de la tecnología de disco compacto para desarrollar un nuevo ensayo *in vitro* en formato micromatriz para el diagnóstico simultáneo de alergias a diversos fármacos de la familia de los β -lactámicos. Esta tecnología ha sido propuesta dada su elevada sensibilidad, versatilidad, bajo coste y capacidad analítica para procesar decenas de muestras de suero simultáneamente.

1.5. Ensayos bioanalíticos basados en tecnología de disco compacto.

La tecnología de disco compacto fue desarrollada conjuntamente por Philips y Sony en 1979. Desde que se comercializó para el almacenamiento de datos en 1982 se ha utilizado masivamente, permitiendo reducir los costes de producción tanto del disco compacto como del lector de discos, alcanzando un precio que oscila entre 0.1 - 0.25 € y 20 - 300 €, respectivamente. Estas ventajas hicieron posible su utilización como sistemas analíticos y su aplicación en biosensado, siendo el grupo SYM de la UPV pionero en su estudio, desarrollo e implementación práctica.

La aplicación analítica de la tecnología de disco compacto aprovecha la capacidad del disco para implementar sistemas microfluídicos y llevar a cabo ensayos (*lab-on-a-disc*) y la lectura de los resultados (disco compacto integrado).

1.5.1. Lab on a disc

Los dispositivos *lab-on-a-disc* aprovechan la fuerza centrífuga generada por la rotación del disco compacto, para mover líquidos a través de canales y cámaras que tienen integrados y llevar a cabo ensayos automatizados (Figura 17).¹⁸⁹ Aunque los dispositivos *lab-on-a-disc* pueden ser aplicados en muchos campos, el 44 % de los trabajos publicados hasta la fecha utilizando esta tecnología, se centran en biosensado.¹⁹⁰

Estos sistemas permiten integrar y miniaturizar las etapas de un inmunoensayo y el tratamiento de muestra, consiguiendo su completa automatización si necesidad de utilizar componentes complejos como sistemas de aspirado, bombas, etc., simplificando el ensayo y reduciendo la intervención humana.^{191,192}

Los materiales utilizados para su fabricación suelen ser termoplásticos, como policarbonato, copolímero cíclico de olefina, polimetilmetacrilato y poliestireno. Estos polímeros presentan interesantes propiedades ópticas como su elevada transparencia por lo que el sistema de detección utilizado en estos dispositivos es óptico.

Los dispositivos *Lab-on-a-disc*, al utilizar equipos de electrónica de consumo son altamente competitivos tecnológicamente y relativamente baratos comparados con otros analizadores. Además, la automatización y la compatibilidad con formatos en

micromatriz conlleva una mejora de la reproducibilidad en las determinaciones y un aumento en la capacidad de trabajo.¹⁹¹

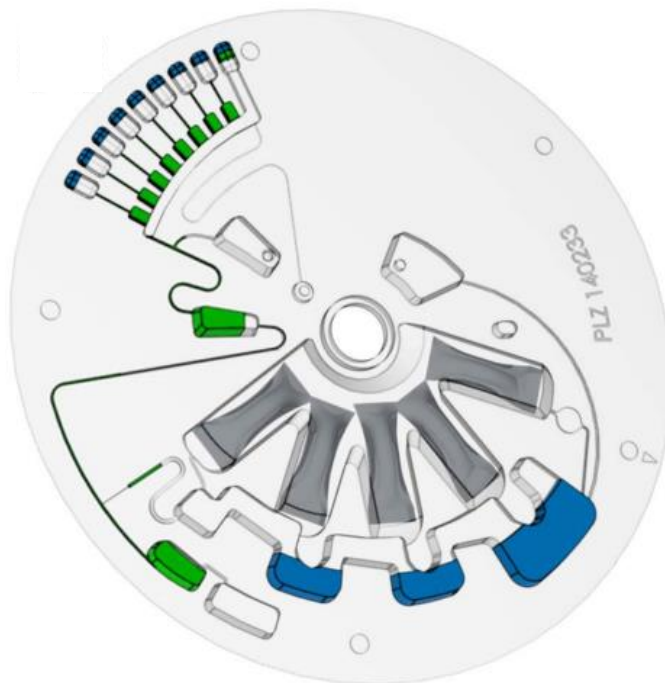


Figura 17. Ejemplo de dispositivos *lab-on-a-disc*.

1.5.2. Sistemas integrados basados en tecnología de disco compacto

Los sistemas integrados de disco compacto utilizan un disco compacto tipo CD, DVD o Blu-ray como soporte en el que se realizan ensayos, y, a diferencia de los dispositivos *lab-on-a-disc*, un lector de disco compacto como transductor de los resultados analíticos.

Los CD y DVD están constituidos por PC. Este polímero de naturaleza hidrofóbica (ángulo de contacto cercano a 90°) permite depositar sobre su superficie volúmenes de bioreceptores y/o muestra del orden de nanolitros, muy próximos entre sí, sin solaparse. Además, el disco presenta una elevada capacidad de trabajo, ya que posee una superficie de 92 cm² que permite la disposición de cientos de puntos que pueden ser utilizados íntegramente para evaluar cientos de antígenos, o dispuestos en forma ordenada, en columnas y filas dando lugar a micromatrices para analizar simultáneamente multitud de muestras.¹⁹³

El formato de micromatriz reduce los tiempos, la cantidad de reactivo y el volumen de muestra necesario, en comparación con los métodos convencionales. Al mismo tiempo, los ensayos en este formato han demostrado alcanzar una alta sensibilidad, gracias a la elevada densidad de analito.

Sin embargo, el desarrollo de ensayos multiplexados en formato micromatriz con fines bioanalíticos también presenta particularidades a tener en cuenta (Tabla 9). Así, hay que valorar el número de sondas que forman las matrices, ya que a medida que incrementa el número de analitos a determinar puede aumentar la reactividad cruzada. Además, es necesario controlar el volumen y morfología de las gotas dispensadas para mantener la reproducibilidad de los resultados.^{194,195} A pesar de estas consideraciones, los ensayos en formato micromatriz para su aplicación en el campo ambiental, agroalimentario y clínico, cada vez está alcanzando un mayor interés, debido principalmente a la gran información que aporta.

Tabla 9. Ventajas e inconvenientes del formato de micromatriz.

Ventajas	Limitaciones
Multiplexado	Reactividad cruzada
Bajos volúmenes de muestra	Irreproducibilidad
Reducción del tiempo de ensayo	Baja disponibilidad de reactivos
Bajo coste	
Alta sensibilidad	

La **adsorción pasiva** es la vía más frecuente de inmovilización de receptores sobre la superficie de los discos compactos. Este tipo de inmovilización lábil ocurre por reacción de las biomoléculas mediante fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, electrostáticas o puentes de hidrógeno con la superficie de policarbonato del disco. Este tipo de inmovilización presenta algunos inconvenientes como, baja reproducibilidad, requiere que la masa molecular del receptor sea suficientemente grande para generar múltiples puntos de unión con la superficie, es sensible a cambios de pH y temperatura, exhibe una orientación espacial aleatoria y puede llevar a cambios

conformacionales y desnaturalización de proteínas. A pesar de ello, su sencillez, bajo coste, y efectividad la convierte en el método habitual de inmovilización de biomoléculas en soportes poliméricos.

Sin embargo, en algunos casos, ya sea por el tipo de superficie de trabajo o por el tipo de bioreceptor a inmovilizar, como ocurre con las moléculas de baja masa molecular como haptenos y oligonucleótidos, la adsorción pasiva no muestra buenos rendimientos de inmovilización. En estos casos, la superficie debe modificarse químicamente para generar grupos funcionales capaces de unirse a grupos reactivos de las biomoléculas, por inmovilización **covalente**. Este tipo de anclaje es fuerte, rápido y estable. Además, permite la unión selectiva y orientada de biomarcadores. Sin embargo, el anclaje covalente de receptores necesita de una funcionalización previa de la superficie que puede no ser homogénea y encarece los costes del ensayo. Esta estrategia de inmovilización en la tecnología de disco compacto requiere trabajar en unas condiciones especiales, como el uso de temperaturas, reactivos y disolventes que no alteren las propiedades físicas ni ópticas del soporte.

La Figura 18 muestra algunas de las estrategias de funcionalización realizadas hasta la fecha en PC.

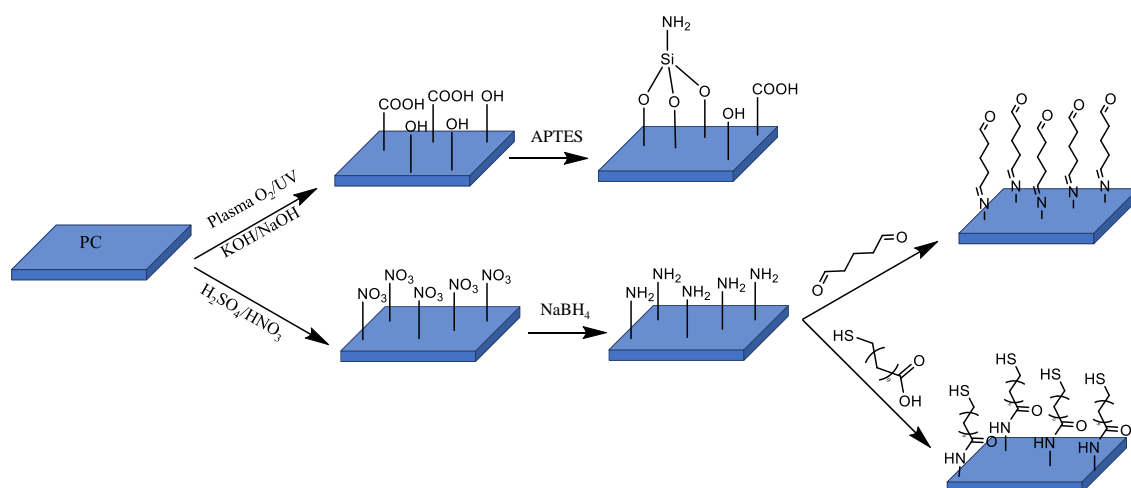


Figura 18. Esquema de funcionalización química de policarbonato.

Otro sistema utilizado en la tecnología de disco compacto que permite la inmovilización de receptores de forma orientada y con una elevada selectividad es la inmovilización por **afinidad**. Este sistema consiste en inmovilizar sobre la superficie mediante adsorción pasiva moléculas que presentan una fuerte afinidad por otros ligandos

específicos. Algunos de los receptores más utilizados son: proteína G o proteína A para la inmovilización orientada de anticuerpos, concanavalina A para la inmovilización de azúcares, y estreptavidina/avidina para la inmovilización de compuestos biotinilados.

Tras el reconocimiento analito-bioreceptor, esta interacción debe ser traducida a una señal fisicoquímica medible. La tecnología de disco compacto, a diferencia de los dispositivos *lab-on-a-disc* tradicionales, utiliza un lector de discos convencional para realizar la transducción y procesamiento de la señal. Hasta ahora son dos los modos de detección que se han desarrollado para la lectura y obtención de resultados. Uno de ellos, se basa en el análisis de errores en la lectura. La principal ventaja de este modo de detección es que no requiere modificaciones en el hardware del lector. El segundo modo de lectura de resultados se basa en medir la atenuación de la intensidad del haz reflejado al interactuar con la superficie del disco (Figura 19).

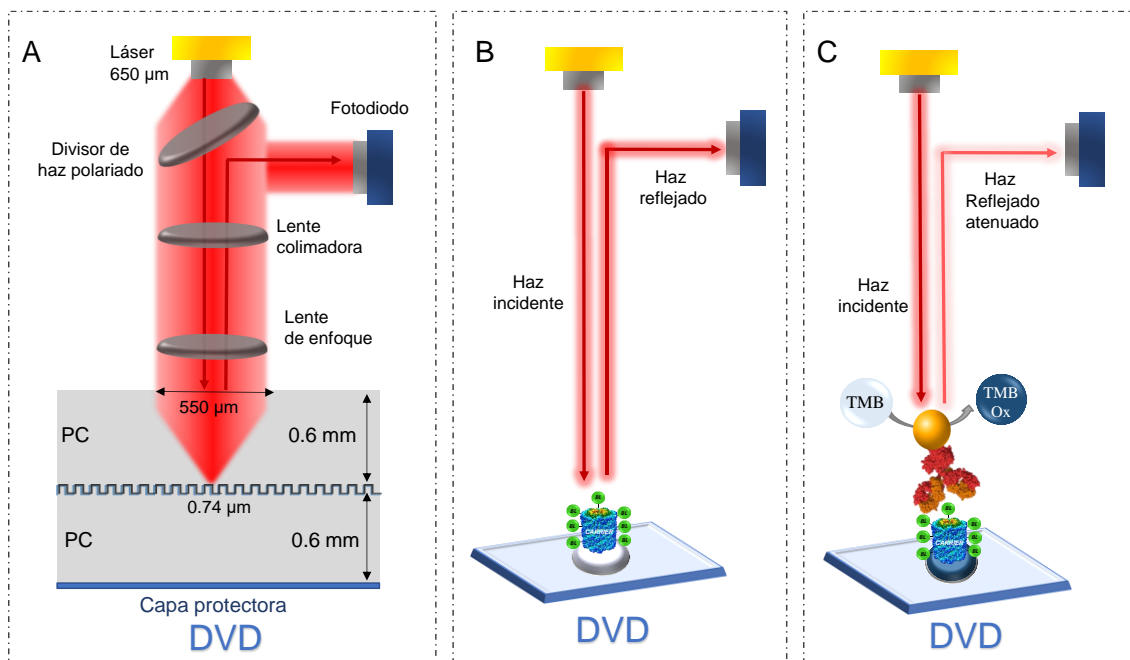


Figura 19. Diagrama del cabezal óptico del lector de discos (A). Intensidad del haz reflejado en un blanco (B) y una muestra positiva (C).

Este modo de detección es el utilizado por el grupo coordinado por el Dr. Ángel Maquieira. A diferencia del análisis de errores, este requiere la modificación del hardware del lector de disco compacto para digitalizar las señales detectadas por el fotodiodo del OPU. Esta innovadora estrategia de lectura ofrece una mayor resolución óptica y por lo tanto una mayor sensibilidad analítica.¹⁹⁷

Así pues, para poder leer y transducir la información correspondiente a la interacción analito-sonda es necesario que se produzca una atenuación en la intensidad del haz reflejado. Sin embargo, el complejo analito-receptor no genera cambios apreciables con el sistema de lectura de discos compactos, por lo que es necesario recurrir a sistemas de amplificación de la señal. El método de amplificación más común es el uso de marcadores como enzimas, que catalizan la conversión de un sustrato en un producto, principalmente coloreado, o nanopartículas capaces de atenuar la intensidad del haz del láser. A la hora de elegir el marcador hay que tener en cuenta que, si se utiliza una enzima, ésta debe generar un producto insoluble. Por otro lado, este producto debe ser capaz de absorber o dispersar la luz a la longitud de onda de emisión del láser. El lector de discos escanea la superficie con uno de los láseres que dispone, según se utilice CD (780 nm), DVD (650nm) o Blu-ray (405 nm). Por consiguiente, el tipo de disco utilizado como soporte va a jugar un papel fundamental en la selección del sistema de amplificación.

Uno de los sistemas de amplificación más empleados utiliza nanopartículas de oro y posterior revelado con nitrato de plata e hidroquinona. El oro funciona como catalizador de la reacción de reducción de Ag^+ a Ag^0 , lo cual genera sobre la superficie un precipitado plateado. Este sólido absorbe y dispersa la luz a todas las longitudes de ondas del visible y por lo tanto puede ser utilizado en los tres tipos de disco compacto. También se han empleado marcadores enzimáticos, como la peroxidasa de rábano picante (HRP) capaz de oxidar el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) generando un precipitado azul intenso; o la fosfatasa alcalina (PA), que genera un precipitado rojo al catalizar la reacción del sustrato conocido como Fast Red. Este tipo de marcadores, a diferencia de los anteriores, presentan elevada selectividad, ya que en ausencia de marcador la reacción no es favorable. Así, el producto resultante de la oxidación de la TMB absorbe luz a una longitud de onda de 652 nm, y el producto de reacción del sustrato Fast Red a 405 nm, siendo estos, por lo tanto, los sustratos adecuados para trabajar con los discos DVD y BR, respectivamente.

Otra práctica de amplificación menos utilizada es el uso de marcadores coloreados sin la necesidad de realizar un posterior revelado. Para ello, se han empleado diferentes marcadores como nanopartículas de oro de 10 - 250 nm de diámetro, nanorods, nanopartículas de plata, partículas magnéticas, partículas de poliestireno, quantum dots o nanotubos de carbono, entre otros. Sin embargo, los ensayos desarrollados con estos

marcadores han presentado una menor sensibilidad analítica que los que han empleado un revelador.¹⁹⁸

1.5.3. Aplicaciones de la tecnología de disco compacto integrado

Algunas de las aplicaciones desarrolladas hasta ahora utilizando la tecnología de disco compacto se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10. Aplicaciones analíticas de la tecnología de disco compacto integrado.

<i>Campo</i>	<i>Analito</i>	<i>Superficie</i>	<i>Inmovilización</i>	<i>Formato de ensayo</i>	<i>LOD</i>	
Medio ambiente	Fármacos	DVD/CD ¹⁹⁷⁻²⁰⁰	Adsorción	Competitivo	0.003-0.16 ng/mL	
		DVD ²⁰¹	Covalente(C)		0.03-0.04 ng/mL	
	Insecticidas	DVD ^{197-199,202,203}	Adsorción	Competitivo	0.01-0.37 ng/mL	
		DVD ²⁰¹	Covalente(C)		0.01-0.9 ng/mL	
Toxinas ²⁰⁴	Microcistina	BR	Adsorción	Competitivo	0.4 ng/mL	
Diagnóstico Médico	Cáncer ²⁰³	Marcador tumoral (AFP)	CD	Adsorción	Sándwich	8 ng/mL
	Alergia ²⁰⁵	sIgE frente alérgenos ambientales	DVD	Adsorción	Indirecto	0.63 ng/mL
	LUPUS ²⁰⁶	TRIM y TROVE	DVD	Adsorción	Sándwich	11-58 U/mL
	Cardiopatías ²⁰⁷	Proteína C reactiva, troponina mioglobina	BR	Covalente (A)	Sándwich	30 ng/mL
	Embarazo ²⁰⁸	HCG	DVD	Covalente (A)	Sándwich	1.5 mIU/mL
	Virus ²⁰⁹	Influenza A	DVD	Covalente (C)	Sándwich	29 ng/mL
	Infecciones ²¹⁰	IgG total	CD	Covalente (A)	Sándwich	25 ng/mL
Polimorfismos	ADN	CD ²¹¹	Covalente (C)	Indirecto	-	
		BR ²¹²	Afinidad			

Tabla 10. Aplicaciones analíticas de la tecnología de disco compacto integrado (continuación).

<i>Campo</i>	<i>Analito</i>	<i>Superficie</i>	<i>Inmovilización</i>	<i>Formato de ensayo</i>	<i>LOD</i>	
Alimentario	β -lactoglobulina, gliadina, caseína, ovalbúmina ²¹³	DVD	Adsorción	Competitivo	10-80 ng/mL	
	β -lactoglobulina, gliadina, caseína ^{213,214}	DVD	Adsorción	Sándwich	1.2-120 ng/mL	
	ADN de avellana, cacahuete y soja ^{215,216}	DVD	Afinidad	Indirecto	1 ng/mg	
	Toxinas ²¹⁷	Aflatoxina B1	BR	Covalente (A)	Competitivo	0.27 ng/mL
	Metales pesados ²¹⁸	Pb ²⁺ y Hg ²⁺	CD/DVD	Covalente(A)	Indirecto	10 nM
	<i>Salmonella</i>	ADN <i>Salmonella</i>	DVD	Afinidad ^{216,219-223}	Indirecto	6-176 CFU/mL
				Covalente (A) ²²⁴	Indirecto	2 nM
			BR	Covalente ²²⁵	Indirecto	1 pM
	<i>Cronobacter</i>	ADN <i>Cronobacter</i>	DVD ^{220,223}	Afinidad	Indirecto	7-17 CFU/mL
			BR ²⁰⁴	Afinidad	Indirecto	10 CFU/mL
<i>Campilobacter</i> ^{216,221}	ADN <i>Campilobacter</i>	DVD	Afinidad	Indirecto	11-176 CFU/mL	
Otros	Drogas ²²⁶	Cocaína y morfina	DVD	Covalente (A)	Competitivo	1-5 ng/mL

Podemos concluir que la sensibilidad de los ensayos desarrollados utilizando la tecnología de disco compacto permite la determinación de analitos a bajas concentraciones, por debajo de 2.4 ng/mL, como es el caso de fármacos, sIgE a alérgenos ambientales, o toxinas. Además, estos trabajos han demostrado que esta tecnología permite la determinación simultánea y selectiva de diversos analitos. Esta capacidad para el cribado multianalito hace de esta tecnología una buena herramienta analítica para la evaluación de la selectividad, expresada como reactividad cruzada.¹⁹⁹

Todos estos ejemplos demuestran el enorme potencial que presenta la tecnología de disco compacto en el campo del biosensado.

OBJETIVOS

Actualmente, los ensayos *in vitro* en uso para la determinación de IgE específica a β -lactámicos carecen de sensibilidad clínica suficiente para realizar un diagnóstico eficaz. Se postula que esta baja sensibilidad clínica puede ser consecuencia de varios factores, destacando dos de ellos, la falta de paneles de antígenos y la baja sensibilidad analítica de los ensayos. Además, el volumen y elevado coste de los equipos que se utilizan en las pruebas *in vitro* hacen que estos sistemas estén disponibles únicamente en grandes hospitales, por lo que se ralentiza el diagnóstico.

En este contexto, el objetivo principal de esta tesis doctoral es el desarrollo de ensayos *in vitro* más sensibles, selectivos, robustos, portables y de bajo coste para el diagnóstico de reacciones alérgicas a antibióticos β -lactámicos utilizando la tecnología de disco compacto integrado. Para alcanzar este objetivo principal y abordar las limitaciones de los ensayos actuales, se plantearon los siguientes objetivos particulares.

1. Mejorar la sensibilidad analítica de las pruebas *in vitro* para la determinación fiable de IgE específica en suero sanguíneo, mediante el estudio y puesta a punto de diferentes formatos de ensayo.
2. Diseñar ensayos multiplex que permitan determinar simultáneamente IgE específica para 8 antígenos diferentes.
3. Evaluar el efecto de la proteína transportadora en el reconocimiento de IgE específica en suero de pacientes alérgicos.
4. Estandarizar los resultados de los ensayos *in vitro* para el diagnóstico de alergias a β -lactámicos mediante el estudio de diversas estrategias de calibración.
5. Obtener perfiles de sensibilización de pacientes alérgicos mediante el análisis de reactividad cruzada.
6. Validar el ensayo *in vitro* desarrollado con un conjunto amplio de muestras representativas de suero de pacientes y controles y comparar los resultados con el ensayo de referencia actual y otros ensayos automatizados.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos y disoluciones

Los antibióticos utilizados en la preparación de los antígenos han sido: sal potásica de penicilina V (PV), sal sódica de ampicilina (AMP), sal sódica de piperacilina (PPR), trihidrato de meropenem (MRP), ceftriaxona (CFT), sal disódica de carbenicilina (CRB), sal disódica de ticarcilina (TCL) aztreonam (AZT), sal sódica de mecillinam (MZL), cefoxitina (CFN), ceftazidima (CFD), cefaclor 96 % (CFC), cefalexina (CFL), sal sódica de ertapenem (ERT), imipenem (IMP) suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España); sal sódica de penicilina G 98 % (PG), sal sódica de cefotaxima (CFO), amoxicilina 96 % (AMX) adquiridos a la empresa Acros Organics (Geel, Bélgica) y cefuroxima (CFR) comprado a Abcam (Cambridge, Reino Unido).

Los reactivos etanolamina 98 %, carbohidrazida 98 %, clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida 98 % (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS) y Tween 20 fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Los kits y dispositivos utilizados en esta tesis fueron: filtros concentradores de proteínas PES, 10-100K MWCO suministrado por Sigma-Aldrich (Madrid, España); EZ-Link NHS-PEG4-Biotin, Slide-A-Lyzer MINI con MWCO de 10K, HiTrap S, HiTrap Q, HiTrap proteína G comprados a Thermo Fisher Scientific (Madrid, España) y el kit de conjugación HRP adquirido a la empresa Abcam (Cambridge, Reino Unido).

Los inmunorreactivos y proteínas utilizadas a lo largo de esta tesis fueron: albúmina de suero bovino (BSA), albúmina de suero humano 96 % (HSA), histona tipo III-S (H1), poli-L-lisina (PLL) de 15.000 – 30.000 Da de masa molar, suero humano AB+ suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España); proteína azul (BP), estreptavidina HRP de alta sensibilidad (STV-HRP) adquiridos a Thermo Fisher Scientific (Madrid, España); IgG de cabra preabsorbida anti-IgG de ratón (GAM-HRP), IgE humana recombinante (rIgE) adquiridos de Abcam (Cambridge, Reino Unido); sustrato colorimétrico de la enzima HRP, Ep(HS)TMB-mA comprado a SDT-reagents (Baesweiler, Alemania); IgG monoclonal específico de IgE humana (mAb1) suministrado por Eurofins-Ingenasa (Madrid, España); IgG policlonal de cabra específico frente a IgE humana (pAb), IgG monoclonal específico de IgE humana (mAb2), receptor de alta afinidad de la fracción constante de la IgE (FcεR1 y FcεR1-biot), tampón de dilución de anticuerpos (DB), antígeno C1-PG, IgE quimérica específica frente a PG

proporcionados por la empresa Dr. Fooke Laboratorien (Neuss, Alemania) y Omalizumab obtenido de Novartis International AG (Basilea, Suiza). El patrón de IgE total (OMS 11/234) utilizado para la preparación de la curva de calibrado heteróloga procedía del Instituto nacional de patrones biológicos y controles (Hertfordshire, Reino Unido).

La IgG humana utilizada como proteína transportadora en la preparación de antígenos de PG se obtuvo tras la purificación por cromatografía de afinidad del suero AB humano. El suero humano artificial (qIgE) se obtuvo mediante la fusión del dominio Fc de IgE y el dominio Fc ϵ RI (CD64) con la IgG policlonal específica para el AZT, tal y como se describe en el artículo de Offermann y colaboradores²²⁷ y se empleó como patrón interno. Los anticuerpos de conejo específicos frente a AZT, MRP y CFT, fueron obtenidos tras la inmunización de conejos por la empresa Dr. Fooke. El antígeno utilizado en la inmunización fue preparado siguiendo el protocolo 3.2.2.1.

Los tampones utilizados durante esta tesis doctoral han sido: tampón de impresión de antígenos (NaCO₃ 50 mM, pH 9.6), tampón de conjugación A (carbonato sódico 0.5 M pH 11.0), tampón de conjugación B (MES 0.1 M pH 4.7), tampón de conjugación C (Acetato sódico 3M pH 5.5), PBS 1X (Na₂HPO₄ 8 mM, 2 mM KH₂PO₄ 2 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM), tampón de la muestra de electroforesis (Tris base 141 mM, Tris HCl (106 mM), LDS (2 %), EDTA (0.51 mM) SERVA Blue G-250 (0.22 mM), phenol red (0.175 mM), pH 8.5), tampón de elución (glicina 0.1M pH 2.7), tampón de neutralización (Tris 1 M pH 9.0), tampón de trabajo de electroforesis (EDTA 1mM, SDS 0.1 %, Tris 50 mM, MOPS 50 mM), tampón método TNBS (NaCO₃ 4 % (m/v)) y tampón de lavado (PBS-T (Na₂HPO₄ 8 mM, 2 mM KH₂PO₄ 2 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, 0.05 % (v/v) Tween-20, pH 7.4)), tampón de purificación A (Tris 50 mM pH 7.5), tampón de purificación B (Tris-NaCl (50 mM/1 M) pH 7.5). Todos los tampones utilizados se filtraron a través de membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro 0.45 μ m.

3.2. Instrumentación

La concentración de antígenos y anticuerpos, así como la cuantificación de grupos amino siguiendo el método TNBS, se obtuvo a partir de la medida de absorbancia a 280 y 350 nm, respectivamente, utilizando un espectrofotómetro ultravioleta-visible de espectro completo, Nanodrop 2000 de ThermoFisher (Madrid, España). Los resultados obtenidos tras realizar el método Bradford para la cuantificación de antígenos se midieron

con el lector de placas Victor 1420 (Wallac/Perkin Elmer; Waltham, MA). Los filtros preconcentradores usados en la purificación e intercambio de tampón de los reactivos se utilizaron con la centrifuga 5415D (Eppendorf; Hamburgo, Alemania). Los geles de electroforesis se corrieron en una cubeta Mini gel Tank (ThermoFisher; Madrid, España) conectada a una fuente de alimentación PolyScience 500. La separación de poblaciones de los antígenos mediante cromatografía de intercambio iónico se realizó con ÄKTA™ Start. La liofilización de los reactivos se llevó a cabo utilizando un Lyoquest de la empresa Telstar (Terrassa, Barcelona). La masa molar de las proteínas y antígenos se determinó con un equipo MALDI-TOFTOF 5800 de ABSciex (Framingham, MA). El análisis elemental de los conjugados de Histona (C, H, O, S) se realizó con un analizador Flashmart (ThermoFisher- Madrid, España). Un equipo UV FHR (Ottendorf, Okrilla) se utilizó para irradiar y activar la superficie de PC del DVD. Las medidas de ángulo de contacto de la superficie de PC se realizaron con un equipo Attension Theta Lite de la empresa Biolin Scientific (Västra Frölunda, Suecia). Un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz equipado con una criosonda QCI Cryo 5m (1H/19F/15N/13C) de Bruker (Billerica, MA) se utilizó para la obtención de los espectros RMN. La impresión de los antígenos y anticuerpos sobre la superficie del disco compacto se realizó con el dispensador de líquidos sin contacto Biodot AD1500 (BioDot Inc.; Irvine, CA). La lectura y adquisición de los resultados obtenidos tras la realización del inmunoensayo se realizó con un lector Labplayer desarrollado por el grupo SYM del IDM (Valencia, España).

3.3. Preparación de reactivos

3.3.1. Purificación de Inmunoglobulina G

La inmunoglobulina G procedente de suero humano no alérgico y de suero de conejo inmunizado se purificó mediante inmunoafinidad utilizando una columna HiTrap de proteína G.

En primer lugar, la columna fue equilibrada con 10 mL de PBS 1X. Seguidamente, se añadió 1 mL de suero sanguíneo a un caudal de 1 mL/min. Posteriormente, se eliminan las impurezas y otros componentes del suero no unidos pasando 10 mL de PBS 1X. Las IgG capturadas en la columna se eluyeron usando 5 mL de glicina 0.1 M pH 2.7 recolectando cada mL en un vial que contenía 0.05 mL de tampón de Tris 1 M pH 9, con el fin de neutralizar el pH del tampón de elución. Finalmente, la concentración de proteína

de cada fracción se calculó a partir de su absorbancia a 280 nm. El cambio del tampón de elución a PBS 1X se llevó a cabo utilizando filtros preconcentradores Amicon 100K.

3.3.2. Preparación de antígenos

Los antígenos se prepararon conjugando los derivados β -lactámicos con los grupos amino de las lisinas libres de los transportadores mediante: 1) hidrólisis básica del anillo β -lactámico, 2) activación del grupo carboxílico del anillo tiazolidina por medio de la química de la carbodiimida y 3) reacción de Mannich.

3.3.2.1. Hidrólisis básica

El determinante antigénico mayor se obtuvo a través de la lisis del anillo β -lactámico siguiendo el protocolo de Baldo y colaboradores, con ligeras modificaciones (Figura 20).⁹⁴ Así, 10-100 mg del antibiótico β -lactámico se disolvieron en 0.5 mL de tampón carbonato 0.5 M pH 11.0. A la disolución resultante se le añadieron 2 mg del transportador, y se dejó reaccionar durante 24 horas a 37 °C. El exceso de antibiótico fue eliminado mediante el uso de filtros preconcentradores de 10 K, utilizando PBS 1X como diluyente. Finalmente, la concentración de antígeno se determinó mediante el método de Bradford. La disolución de los antígenos se alicuotó y almacenó a -20 °C hasta su uso.

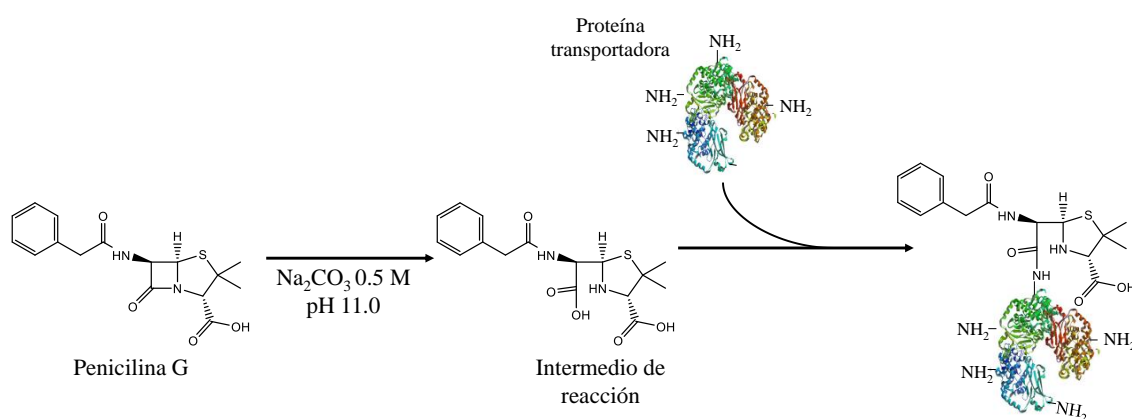


Figura 20. Esquema de la formación de antígenos mediante hidrólisis básica del anillo β -lactámico.

La conjugación de los antibióticos β -lactámicos que presentan un grupo amino en su estructura (AMX, AMP, CFL y CFC) se realizó adicionando, cada dos horas durante un total de 8 horas, 10-100 mg del antibiótico a una disolución de 2.0 mg de proteína preparada en 0.5 mL de tampón carbonato 0.5 M pH 11.0. Transcurrido ese tiempo la

disolución resultante se dejó incubar durante toda la noche a 37 °C. La purificación y la cuantificación de los antígenos se realizó siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Los antígenos utilizados para la inmunización de conejos se prepararon utilizando KLH como proteína transportadora a una relación molar hapteno/proteína de 10.000.

3.3.2.2. Química de las carbodiimidas

Los antibióticos β -lactámicos presentan en su estructura química un grupo carboxílico en el anillo tiolado anexo a la β -lactama. Este grupo carboxílico puede unirse a los grupos amino de las proteínas mediante la química de la carbodiimida, generando antígenos de los denominados “determinantes menores” o derivados *llanyl* (Figura 21).

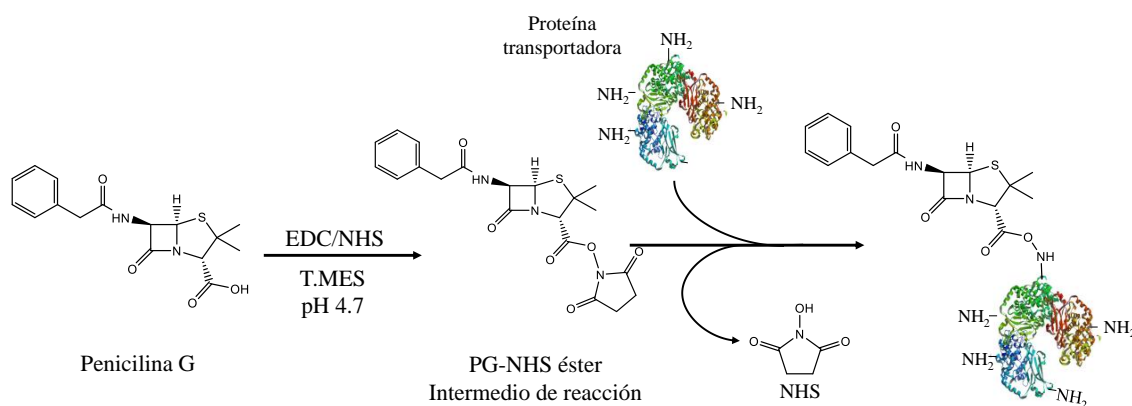


Figura 21. Esquema de la formación de antígenos mediante la química de las carbodiimidas.

Para llevar a cabo la preparación de estos antígenos, en primer lugar, se disolvieron 0.03 mmoles de antibiótico β -lactámico en 0.5 mL de tampón MES 0.1 M pH 4.7. Seguidamente, a esta disolución se añadieron 0.06 mmoles de EDC/NHS diluidos en 0.2 mL de tampón MES pH 4.7. La mezcla resultante se dejó reaccionar durante 15 minutos a temperatura ambiente y, seguidamente se añadieron 0.09 μ moles de proteína disuelta en 0.5 mL de tampón PBS 1X pH 7.5. Finalmente, la mezcla se dejó reaccionar durante 24 horas a 37 °C. Trascurrido el tiempo de reacción, el antígeno resultante se purificó por exclusión molecular utilizando los filtros preconcentradores Amicon de 10 K y PBS 1X como diluyente. La concentración del antígeno se determinó mediante la medida de la absorbancia a 280 nm. La disolución de los antígenos fue alicuotada en diversas fracciones y almacenadas a -20 °C hasta su uso.

3.3.2.3. Reacción de Mannich

Otra de las rutas de conjugación estudiadas fue la unión del antibiótico a la proteína mediante la reacción de condensación de Mannich. Esta reacción se basa en condensar los hidrógenos activos de los antibióticos β -lactámicos y una amina mediante el uso de formaldehído (Figura 22). Para llevar a cabo esta conjugación, se disolvieron 0.03 mmoles de antibiótico β -lactámico en 0.5 mL de H_2O desionizada. Seguidamente, a esta disolución se añadieron 0.09 μ moles de proteína diluida en 0.2 mL de H_2O desionizada. A la mezcla resultante se le adicionaron 250 mL de acetato sódico 3 M, pH 5.5 y 0.1 mL de formaldehído al 37 %. Finalmente, la mezcla se dejó reaccionar durante 24 h a 37 °C y oscuridad. Trascurrido el tiempo de reacción el antígeno resultante se purificó mediante filtros preconcentradores Amicon de 10 K, utilizando PBS 1X como diluyente. La concentración de antígeno se cuantificó mediante la medida de la absorbancia a 280 nm. Las disoluciones de los antígenos fueron alicuotadas y almacenadas a -20 °C hasta su uso.

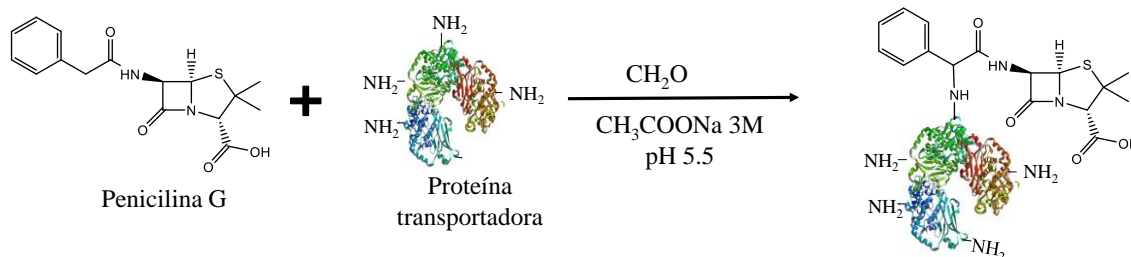


Figura 22. Esquema de la formación de antígenos mediante la reacción de Mannich.

3.3.3. Preparación de reactivos auxiliares

3.3.3.1. Marcaje de anticuerpos con HRP

El marcaje del anticuerpo mAb1 con la enzima HRP se llevó a cabo utilizando el kit *HRP Conjugation*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, en primer lugar, 1 μ L del agente modificador del kit se añadió a 10 μ L de una disolución de 1.0 mg/mL de anticuerpo en PBS 1X. La disolución resultante se añadió al tubo que contenía 10 μ g de enzima HRP liofilizada. La mezcla se homogenizó con ayuda de una pipeta y se dejó incubar en oscuridad. Transcurridas 3 horas, se llevó a cabo la etapa de bloqueo, añadiendo a la disolución 1 μ L de *quencher*. Finalmente, la disolución se almacenó a 4 °C hasta su uso.

3.3.3.2. Biotinilación de antígenos y anticuerpos

La biotinilación de antígenos se llevó a cabo como sigue: 2.0 mg de antígeno se hicieron reaccionar con 30 μ L de una disolución 20 mM de agente biotinilante preparada en agua destilada. Transcurridos 30 minutos de reacción, el antígeno biotinilado se purificó mediante filtros de concentración con un valor de corte molecular de 10 KDa. Finalmente, la concentración del antígeno biotinilado se determinó mediante el método Bradford y la disolución se almacenó a -20 °C hasta su uso. La biotinilación de los anticuerpos utilizados en esta tesis se realizó siguiendo el protocolo anteriormente descrito con ligeras modificaciones. En este caso, se mezclaron 0.1 mL de anticuerpo a 1.0 mg/mL en PBS 1X con 1 μ L de una disolución 20 mM de agente biotinilante preparado en agua destilada. Transcurridos 30 minutos, la mezcla se llevó a un dispositivo de diálisis de 10K (Thermo Scientific Slide-A-Lyzer MINI con MWCO de 10K) para eliminar el exceso de biotina. El proceso de diálisis se realizó durante 3 horas en 0.5 L de PBS 1X, cambiando el tampón cada hora. Finalmente, la concentración de anticuerpo biotinilado se cuantificó midiendo la absorbancia de la disolución a 280 nm y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

3.4. Cuantificación y caracterización de reactivos

3.4.1. Cuantificación de proteínas mediante el método Bradford

La concentración de los antígenos se obtuvo determinando su contenido en proteína siguiendo el método de Bradford. En primer lugar, se efectuó el calibrado utilizando la proteína transportadora como calibrador. Para ello, se utilizó una placa de 96 pocillos y se añadieron en cada pocillo 25 μ L de concentraciones crecientes de proteína (0-400 mg/L) por cuadruplicado. Seguidamente, los antígenos se diluyeron a 1/10, 1/20 y 1/40 en PBS 1X por duplicado. Posteriormente, se añadió en cada pocillo 200 μ L de reactivo de Bradford diluido 1/5 (v/v) en agua. Finalmente, la reacción se dejó incubar durante 5 minutos en oscuridad y pasado ese tiempo, se midió la absorbancia a 595 nm. La concentración de los antígenos se determinó interpolando la señal de absorbancia de las muestras en la curva de calibrado aplicando el factor de dilución correspondiente.

3.4.2. Determinación de grupos aminos libres

El grado de conjugación de los antígenos fue determinado midiendo la variación de amino libres en la molécula transportadora antes y después de la reacción de conjugación con el antibiótico. La cuantificación de estos grupos se realizó siguiendo el método TNBS.²²⁸ Para ello, 0.1 mL de 0.2 mg/mL de los antígenos en tampón NaHCO₃ al 4 % pH 8.5, se hicieron reaccionar con 0.05 mL de 0.01 % de TNBS durante 2 horas a 37 °C. A continuación, se añadió 0.1 mL de SDS al 10 % y 0.025 mL de HCl 1 M para parar la reacción. Finalmente, se midió la absorbancia de la disolución resultante a 335 nm. El número de aminos libres se calculó interpolando la señal de absorbancia en una curva de calibrado realizada con glicina como calibrador. El grado de conjugación de los antígenos fue expresado en porcentaje y calculado según la ecuación 2.

$$\% \text{ Conjugación} = \frac{[\text{NH}_2] \text{ transportador} - [\text{NH}_2] \text{ antígeno}}{[\text{NH}_2] \text{ transportador}} \times 100 \text{ Ec.2}$$

3.4.3. Electroforesis

Los antígenos fueron caracterizados mediante electroforesis SDS-PAGE, usando mini geles NuPAGE 4 - 12 % Bis-Tris y geles de acrilamida del 10 y el 12 %, bajo condiciones reductoras.

Para ello, en primer lugar, se disolvieron 2.0 µg de antígeno o de proteína transportadora en 2.5 µL del tampón de carga de muestra, 1 µL de agente reductor y agua hasta un volumen de 10 µL. La disolución resultante se calentó a 80 °C durante 10 minutos en un termobloque. Las muestras y el patrón de diferentes masas moleculares se cargaron en los pocillos del gel y se corrieron a 100 V. Transcurridos 15 minutos, el voltaje se aumentó a 200 V y se dejó correr durante 40 minutos más. A continuación, el gel se tiñó con una disolución de azul brillante R de Coomassie durante toda la noche. Finalmente, el gel se lavó con agua destilada y se destiñó tres veces con una mezcla 4/1 (v/v) de ácido acético/metanol durante 8 horas, hasta la completa eliminación del exceso de colorante. Finalmente, el gel resultante fue rehidratado con agua destilada y escaneado.

3.4.4. Cromatografía de intercambio iónico

La purificación de los antígenos fue realizada mediante cromatografía de intercambio iónico. El principio de separación de las poblaciones de antígeno se basa en el diferente punto isoeléctrico de las especies con distinto grado de conjugación. Así, aquellas poblaciones que tienen un menor número de antibiótico unido presentaron un punto isoeléctrico mayor y por lo tanto eluyen a una menor concentración de NaCl, que los que tienen un mayor número de antibióticos conjugados

Para llevar a cabo esta purificación, en primer lugar, la columna, HiTrap Q HP anión Exchange o HiTrap SP HP catión Exchange, se acopló al equipo ÄKTA start y se llevó a cabo el lavado del sistema con H₂O destilada y posteriormente con el tampón de purificación A (Tris 50 mM pH 7.5). Tras el equilibrado del sistema con el tampón, se preparó la muestra. Para ello, 0.5 mL de 4.5 mg/mL de antígeno se diluyeron en tampón A hasta un volumen final de 10 mL, con el fin de disminuir las sales provenientes del tampón PBS 1X. Posteriormente, se procedió a la inyección de la muestra y paso por la columna. La disolución no retenida se recogió para ser evaluada posteriormente. Seguidamente, se seleccionó el método predefinido del sistema IEX gradient 1 mL HiTrap, que consiste en eluir la proteína mediante el uso de concentraciones crecientes del tampón B. Finalmente, la disolución eluida se recogió en fracciones de 0.8 mL en el colector de fracciones y se midió la absorbancia a 280 nm por el propio equipo generando un espectro de elución. Finalizado el programa, el equipo y la columna se lavaron con agua destilada. Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. Patricia Casino Ferrando de la Universitat de València.

3.4.5. Maldi-TOF

La determinación de la masa molecular de los antígenos se determinó mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI-TOF). Este análisis másico fue realizado por el Laboratorio de Proteómica del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universitat de València. Para ello, en primer lugar, tanto los antígenos como las proteínas transportadoras, H1 y HSA, se diluyeron 1/10 (v/v) en una disolución que contenía 10 mg/mL de ácido sinapínico (Bruker) en 70 % acetonitrilo y 0.1 % de ácido trifluoroacético. Seguidamente, 1 µL de la disolución

resultante se dispensó sobre la placa de MALDI y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, cada una de las muestras se analizaron utilizando un equipo MALDI TOFTOF 5800 (ABSciex) en modo lineal de 7500 a 855000 m/z. Finalmente, los resultados obtenidos fueron evaluados y representados en SigmaPlot 14.0.

3.4.6. Análisis elemental

La determinación del porcentaje de C, N, H y S de los antígenos y de la proteína H1 requirió en primer lugar, la eliminación de las sales del tampón PBS 1X en el que estaba disuelto. Para ello, se llevó a cabo un proceso de intercambio de tampón de 1 mL a 5.0 mg/mL de antígeno con filtros preconcentradores Amicon 10 K utilizando H₂O MiliQ como diluyente. Seguidamente, la muestra se congeló a -60 °C y se liofilizó durante 8 horas. Finalmente, 1 mg de la muestra liofilizada se introdujo en una cápsula de estaño y se añadió una pequeña cantidad de pentóxido de vanadio (V₂O₅) para facilitar la pirólisis a 1020 °C. Este análisis se llevó a cabo en el SCSIE de la Universitat de València y los resultados fueron expresados en porcentaje.

3.5. RMN-STD

Los experimentos de RMN se realizaron en un equipo Bruker Avance III de 600MHz equipado con una criosonda, QCI Cryo 5m (¹H/¹⁹F/¹⁵N/¹³C) para ¹H, ¹⁵N, ¹³C, y ¹⁹F con desacoplamiento en 2D. Los espectros se asignaron a partir de los valores de las bases de datos, siempre que fue posible. En el caso contrario se asignaron mediante métodos convencionales, en las mismas condiciones de disolvente, tampón y concentración en las que se registraron los experimentos RMN-STD. Los resultados de los experimentos de RMN se registraron usando las secuencias implementadas por el fabricante, 2D COSY, TOCSY, NOESY, HSQC.

Los experimentos RMN-STD fueron realizados empleando las secuencias implementadas en la biblioteca de experimentos de Bruker usando como elemento de supresión de disolvente el módulo watergate por 3-9-19; un periodo de spinlock para destruir las señales residuales de la proteína; y pulsos de purga entre experimentos para eliminar las señales residuales. La irradiación selectiva se efectuó con un tren de pulsos gaussianos de baja intensidad (3.2 mW) de 50 ms espaciados por un tiempo de 1 ms. Para evitar la influencia de las velocidades de relajación de los diferentes protones en los

resultados se empleó la velocidad inicial de crecimiento STD_0 para la comparación de los valores de saturación. El valor STD_0 se calculó a partir de la evolución del STD con el tiempo de saturación (t_{sat}), ajustado a la ecuación 3, donde el parámetro a representa el máximo de la curva de crecimiento de STD (STD_{max}), b es una constante de velocidad relacionada con las propiedades de relajación de un protón concreto que mide la velocidad de crecimiento del STD (k_{sat}). Los valores de STD_0 se obtienen del producto de los coeficientes a x b .

$$STD - AF(t) = a(1 - \exp(-bt_{sat})) \text{ Ec. 3}$$

Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. Pedro M. Nieto-Mesa del instituto de investigaciones químicas (CSIC/US) de Sevilla.

3.6. Protocolos de ensayo

3.6.1. *Microarraying*

Los ensayos desarrollados durante esta tesis doctoral para la determinación de IgE específica de diversos antibióticos β -lactámicos consistieron en inmunoensayos de tipo directo o reverso en formato micromatriz. La generación de las micromatrices o *microarraying* sobre la superficie del disco compacto se realizó mediante la impresión de 25 nL de los reactivos, diluidos en PBS o tampón carbonato pH 9.6 utilizando un dispensador sin contacto (AD 1500 BioDot, Inc., Irvine, CA). Los reactivos utilizados en la impresión variaron en función del formato de ensayo y las condiciones a evaluar. El microarray incluía en todos los casos, un control negativo, principalmente 40 mg/L de HSA y un control positivo, 10 mg/L de rIgE o IgG. Sobre la superficie de un DVD se generaron un total de 20 micromatrices idénticas de 5 filas de dos reactivos por fila, cada uno con dos replicas y una distancia entre el centro de los puntos de 1.2 mm (Figura 23). A continuación, el disco se incubó durante toda la noche a 37 °C. y transcurrido ese tiempo el disco se lavó con PBST y H₂O desionizada. Finalmente, el DVD se secó mediante centrifugación a 8000 rpm.

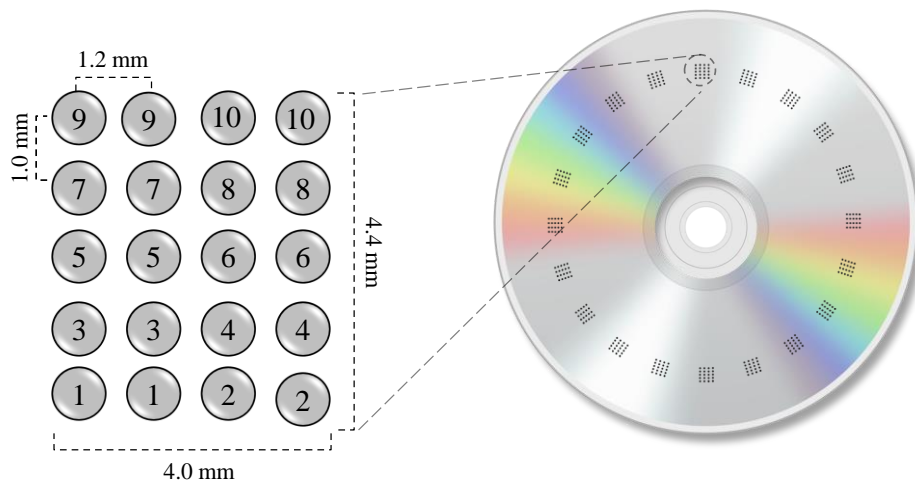


Figura 23. Esquema del diseño de cada una de las 20 micromatrices impresas en la superficie del DVD.

3.6.2. Ensayo indirecto de determinación de IgE de tres etapas

El protocolo del ensayo indirecto de tres etapas consistió en añadir sobre la matriz de puntos 25 μ L de concentraciones crecientes (0 - 25 UI/mL) de suero humano artificial (IgE quimérica específica a PG; qIgE). Tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, el disco se lavó con PBST y posteriormente con agua desionizada. A continuación, se añadieron 25 μ L del anticuerpo detector marcado con HRP (1/800 pAb-HRP y 1/400 mAb-HRP) preparado en DB y se dejó incubar sobre la matriz durante 30 minutos. A continuación y tras el lavado del disco, se añadió 25 μ L de la disolución de sustrato (TMB). La reacción enzimática se detuvo tras 15 minutos lavando la superficie del DVD con abundante agua desionizada (Figura 24).

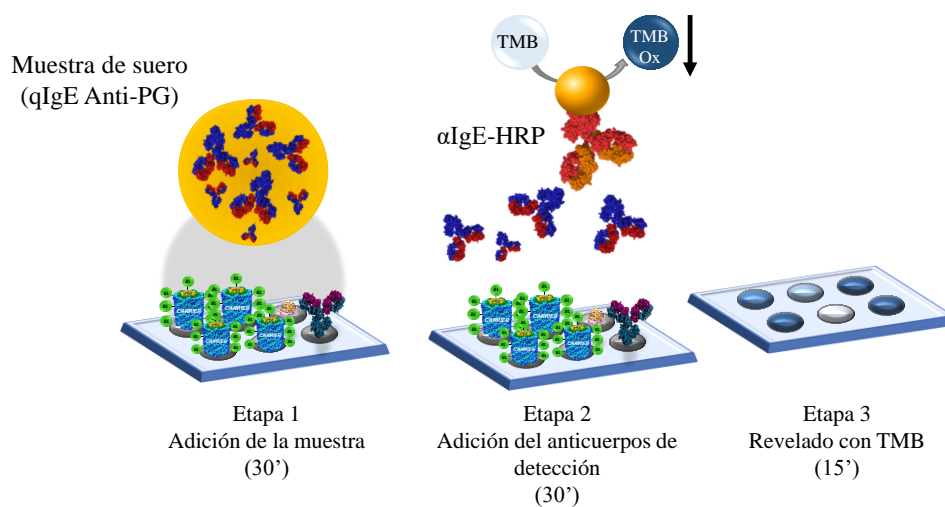


Figura 24. Esquema del inmunoensayo de determinación de sIgE de tres etapas.

3.6.3. Ensayo indirecto de determinación de IgE de cuatro etapas

El protocolo de ensayo fue como sigue: Sobre la matriz se añadieron 25 μ L de muestra y tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se llevó a cabo el lavado y secado del disco. Seguidamente, se añadieron 25 μ L de anticuerpo primario a 1.0 mg/L en DB en el caso del mAb1 o 2.0 mg/L en DB en el caso de mAb1-biot, y se dejó incubar sobre la matriz durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se procedió al lavado del DVD con PBST y H₂O desionizada, y secado mediante centrifugación. Posteriormente, se adicionaron sobre cada matriz 25 μ L de una dilución de GAM-HRP a 1/100 preparada en DB o de una dilución 1/500 de STV-HRP y se dejó incubar durante 15 minutos. Finalmente, se efectuó el revelado durante 15 minutos con TMB (Figura 25).

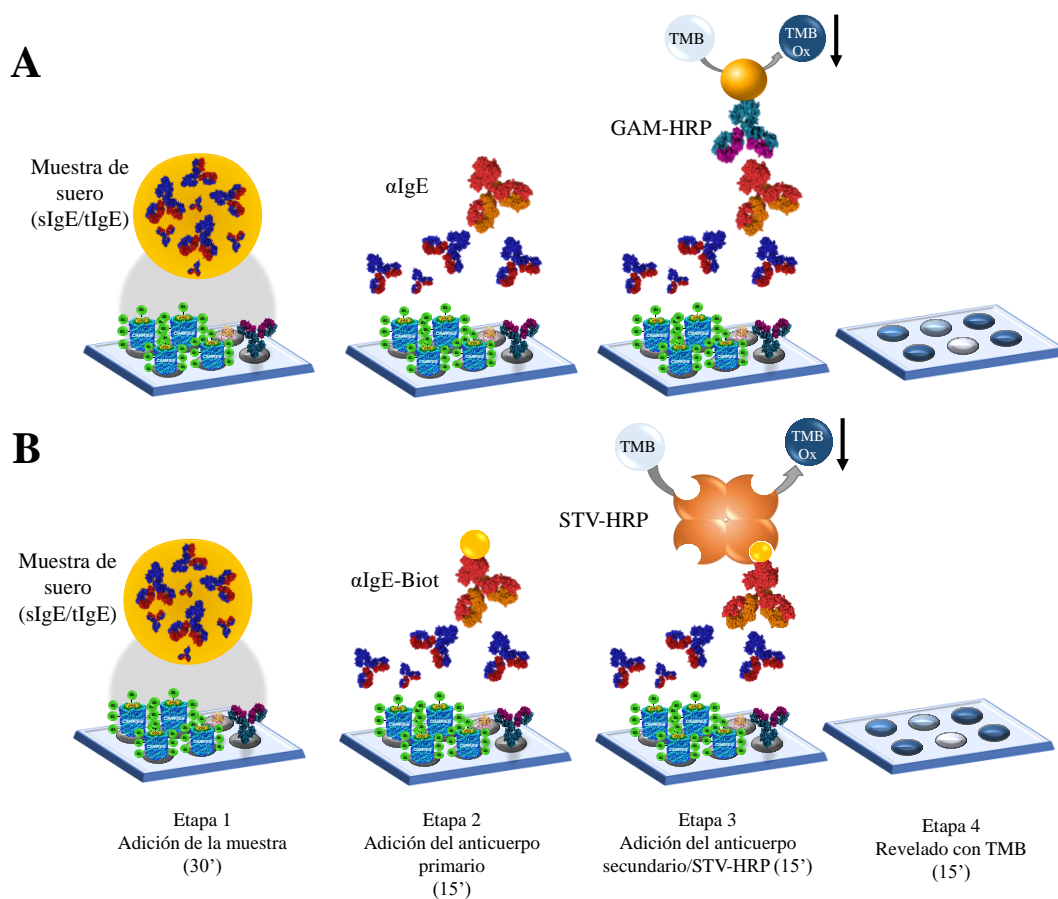


Figura 25. Esquema del inmunoensayo multiplex de determinación de IgE específica de cuatro etapas utilizando GAM-HRP (A) y STV-HRP (B) como especies detectoras.

3.6.4. Ensayo reverso de determinación de sIgE

Otro de los ensayos evaluados y puesto a punto fue un inmunoensayo reverso no competitivo en formato de micromatriz para la determinación singleplex de IgE específica frente a antibióticos β -lactámicos. En este caso, se inmoviliza el α IgE sobre la superficie del DVD en lugar de los antígenos. Este ensayo consistió en añadir sobre las matrices 25 μ L de concentraciones crecientes de qIgE anti-PG (0-25 UI/mL). Tras 30 minutos de incubación y posterior lavado y secado del disco, se añadieron 25 μ L a 1 mg/L de antígeno biotinilado preparado en DB dejándose incubar sobre la matriz durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se procedió al lavado del disco con PBST y H₂O desionizada, y secado mediante centrifugación. Posteriormente, se dispensaron sobre cada matriz 25 μ L de una dilución 1/1000 de STV-HRP y se dejaron reaccionar durante 15 minutos. Finalmente, el revelado se llevó a cabo añadiendo 25 μ L de TMB y parando la reacción al cabo de 15 minutos con H₂O desionizada (Figura 26).

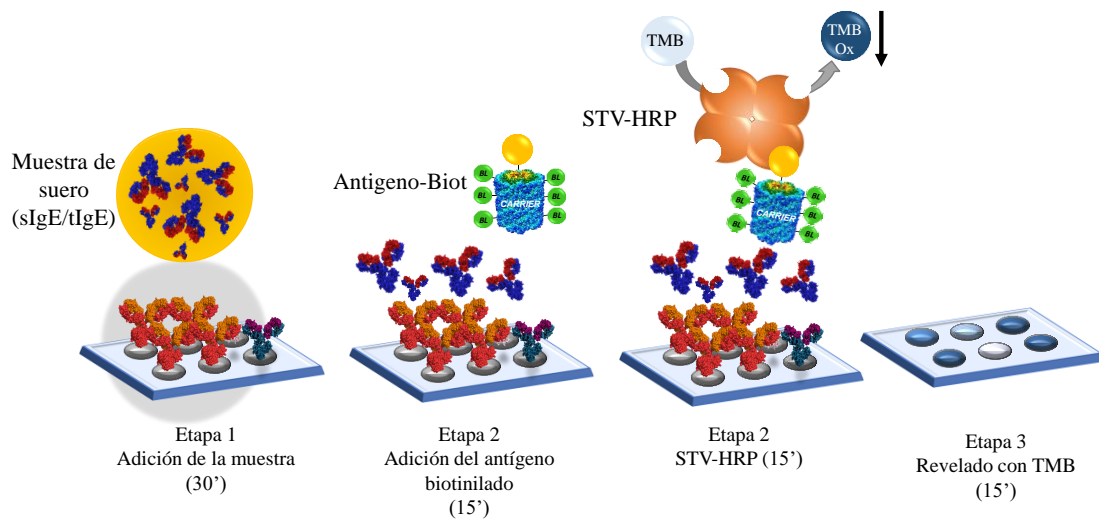


Figura 26. Esquema del inmunoensayo reverso de determinación de sIgE.

3.6.5. Ensayo indirecto de determinación de IgG específica a β -lactámicos

La inmovilización de los antígenos sobre la superficie se realizó siguiendo el protocolo anteriormente descrito en la sección 3.6.1.

Sobre la matriz impresa se incubaron 25 μ L de las disoluciones de concentraciones crecientes de IgG de conejo específica a distintos β -lactámicos (0-24 mg/L). Transcurridos 15 minutos, el disco se lavó con abundante PBST y H₂O

desionizada y se secó mediante centrifugación a 800 rpm. Seguidamente, se añadieron sobre la matriz 25 μL de una dilución 1/400 de un anticuerpo de cabra específico a la fracción constante de la IgG de conejo marcada con HRP (GAR-HRP) y se dejó incubar durante 15 minutos. Finalmente, se procedió al revelado añadiendo sobre cada matriz 25 μL de TMB, paralizando la reacción tras 5 minutos con H_2O desionizada (Figura 27).

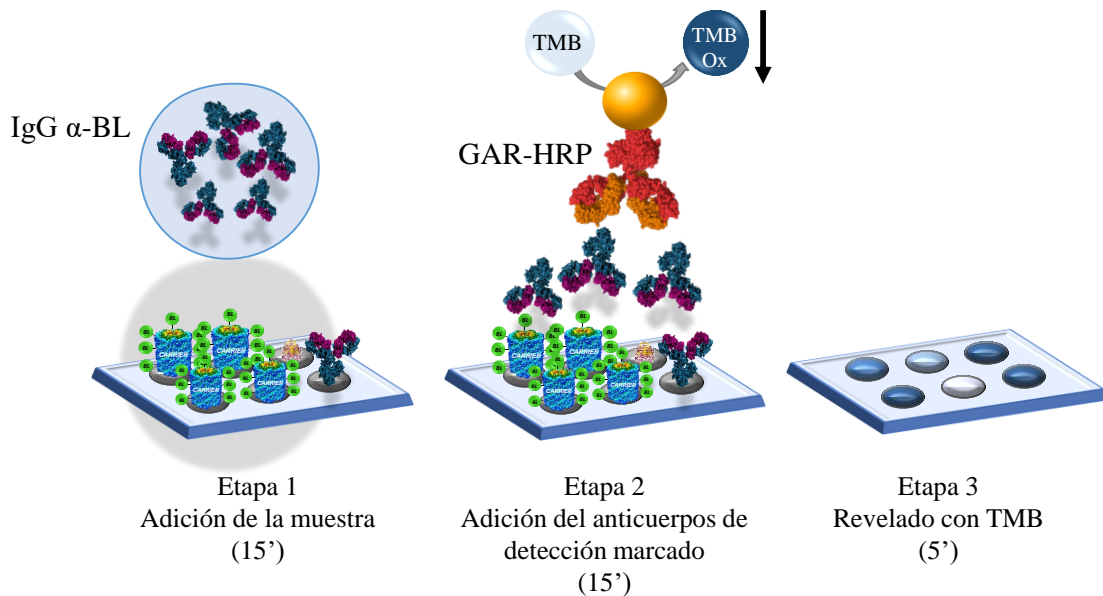


Figura 27. Esquema del inmunoensayo de evaluación de reactividad cruzada con IgG específica frente a β -lactámicos.

3.6.6. Ensayo mediante inmovilización covalente de antibióticos

Con el fin de generar grupos amino en la superficie de PC de un DVD se procedió a su activación. Para ello, en primer lugar, el disco compacto se irradió durante 10 minutos con luz UV (256 nm y 50 mW/cm^2) con el equipo UV FHR (Ottendorf, Okrilla). Seguidamente, el disco activado se sumergió en NaOH 1 M a $60\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos.²²² Una vez los grupos carboxilo se han generados sobre el DVD, éstos son activados mediante la química de las succinimidas. Para ello, se añadió 1 mL de una disolución 46 mM de EDC/NHS y se cubrió con una plancha circular de 0.6 cm de espesor, para extender la disolución sobre toda la superficie del DVD. Transcurrida 1 hora de reacción, el disco se lavó con agua destilada, eliminado el exceso de reactivo. Seguidamente se añadió 1 mL de carbohidrazida 5 mM y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de reactivo se eliminó lavando el DVD con agua destilada (Figura 28).

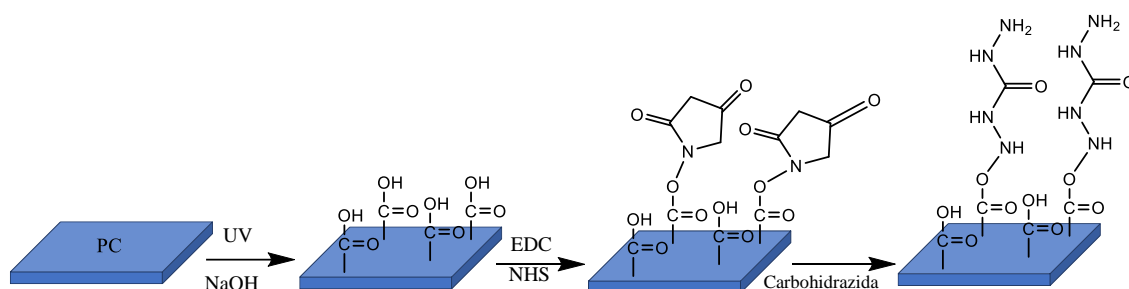


Figura 28. Esquema de modificación química de la superficie del disco para el anclaje de antibióticos β -lactámicos.

Posteriormente, se llevó a cabo el anclaje covalente del fármaco, siguiendo dos rutas de conjugación. Para ello, se dispensaron en formato de micromatriz sobre la superficie del disco activado 25 nL de disoluciones de concentración creciente de antibiótico (0.1 - 100 mM) en tampón carbonato 0.5 M pH 11 y en tampón MES 0.1 M pH 4.7 + EDC/NHS 46 mM. Tras una hora de reacción a temperatura ambiente, se lavó el disco con agua destilada y se secó mediante centrifugación (Figura 29).

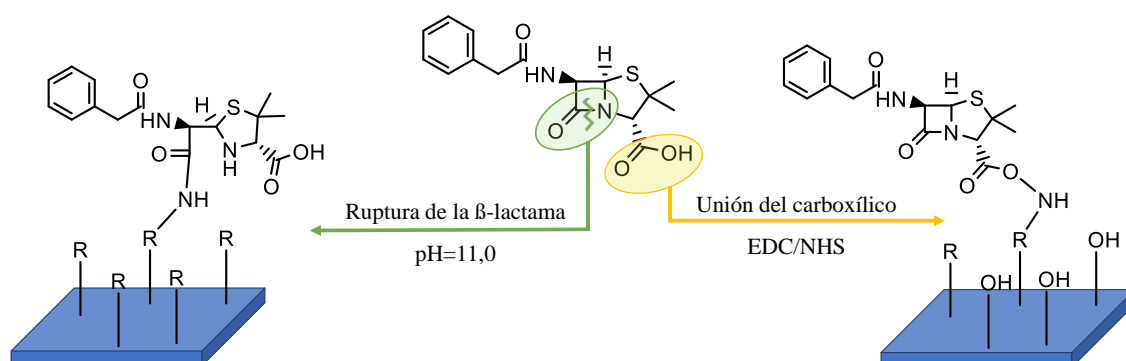


Figura 29. Esquema de las rutas de anclaje covalente de antibióticos β -lactámicos a la superficie de policarbonato aminada.

Con el fin de eliminar la interacción inespecífica de otras moléculas con los sitios activos libres del policarbonato aminado se llevaron a cabo dos etapas de bloqueo. En primer lugar, los grupos carboxílicos activos que no habían reaccionado se bloquearon con etanolamina 1.0 M durante 1 hora a temperatura ambiente, y seguidamente se bloquearon los grupos amino libres de la carbohidrazida sin reaccionar, con una disolución de 0.25 % de BSA, 1 nM de EDTA y 0.05 % de Tween durante 1 hora. Finalmente, se realizó el ensayo indirecto de cuatro etapas usando GAM-HRP descrito en la sección 3.6.3A.

3.6.7. Caracterización de la modificación química de la superficie

Las variaciones de la hidrofobicidad superficial del PC tras su modificación química se estimaron mediante la medida del ángulo de contacto con el equipo Attension Theta Lite (Biolin Scientific). Para ello, sobre la superficie del disco se añadió, por triplicado, 1 μL de agua destilada (18 $\text{m}\Omega$) a temperatura ambiente. Las imágenes generadas fueron procesadas con el programa OneAttension (versión 3.1; Biolin Scientific).

3.7. Estrategias de calibración

Durante esta tesis doctoral se evaluaron 4 estrategias de calibración (Figura 30).

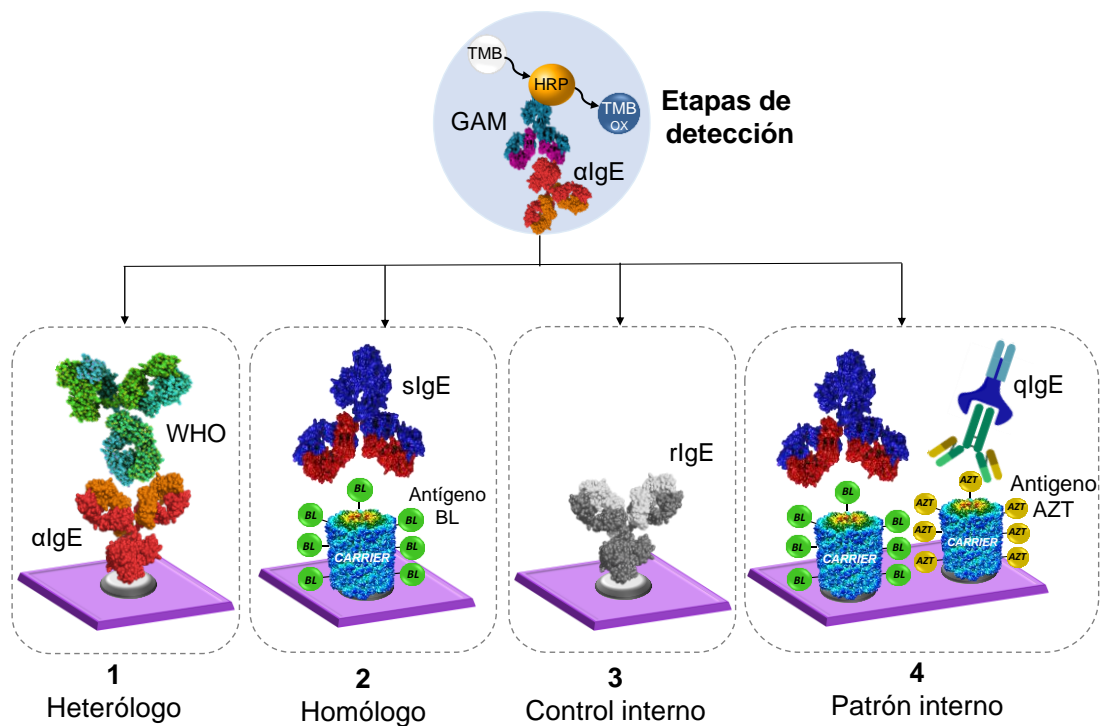


Figura 30. Representación esquemática de las cuatro estrategias de calibración evaluadas.

La calibración heteróloga (1) se realizó usando un ensayo tipo sándwich con una pareja de anticuerpos monoclonales compatibles (Omalizumab-captura y mAb1-detección) y diluciones seriadas de un patrón de IgE total estandarizado, diluido en PBST o en suero de un paciente inmunodeficiente (sin IgE). Las señales obtenidas para cada una de las concentraciones de IgE total evaluada (0-25 UI/mL) se ajustaron a una curva logística de cuatro parámetros. La calibración homóloga (2) consistió en un ensayo

indirecto no competitivo, en el que los antígenos se inmovilizaron, en formato de micromatriz, por adsorción sobre la superficie de PC del DVD y posteriormente el reconocimiento sIgE-antígeno se puso de manifiesto mediante el uso de mAb1 y un anticuerpo secundario marcado (GAM-HRP). En este caso el calibrador utilizado fue un material de referencia propio, preparado a partir de un conjunto de pacientes positivos con concentración conocida de IgE específica frente a PG y AMX. Al igual que en el caso anterior, las señales obtenidas para cada una de las concentraciones de IgE específicas fueron ajustadas a una curva logística de cuatro parámetros. La calibración homóloga interna (3) se basó en el uso de controles positivos, en este caso IgE recombinante (rIgE), impresos en la matriz. Las señales obtenidas para cada una de las concentraciones de control positivo se relacionaron con la calibración (2) permitiendo construir una curva de calibrado en cada matriz.

La estrategia de calibración con patrón interno (4) consistió en inmovilizar sobre la matriz antígenos de PG, AMX y AZT, este último como antígeno específico del patrón interno. Seguidamente, se adicionó 4.25 UI/mL de patrón interno (qIgE anti-AZT) a las diluciones seriadas del calibrador homólogo. Finalmente, las señales obtenidas para los antígenos de PG y AMX fueron normalizadas siguiendo la ecuación 4 y ajustadas a una curva logística de cuatro parámetros.

$$\text{Señal normalizada} = \frac{\text{Señal del antígeno de PG o AMX}}{\text{Señal del antígeno de AZT}} \text{ Ec.}$$

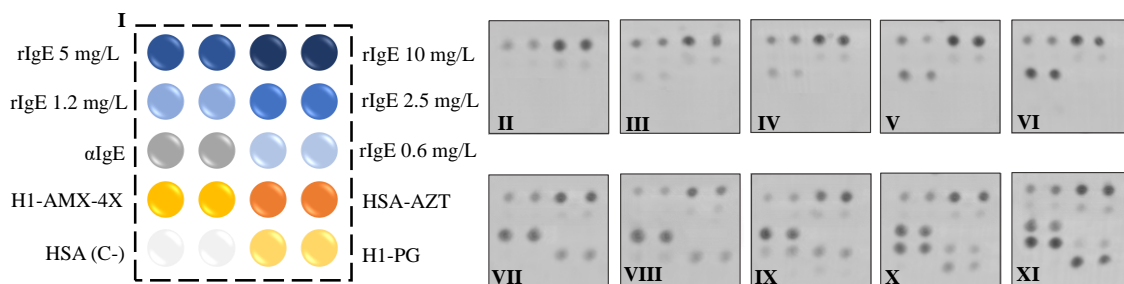


Figura 31. Esquema del diseño de la matriz del ensayo con las distintas estrategias de calibración (panel I). Los paneles II-V muestran los resultados de la evaluación de diluciones 1/4 del patrón de IgE total (calibración (1) y (3)). Los paneles VII-XI muestran los resultados de la evaluación de diluciones 1/4 de un conjunto de muestras de concentración conocida de IgE dopada con 4.5 UI/mL de patrón interno (calibración (2), (3) y (4)).

Gracias a la elevada capacidad de trabajo de la tecnología de disco compacto, las cuatro estrategias de calibración estudiadas se evaluaron simultáneamente siguiendo el patrón de impresión representado en la Figura 31.

3.8. Muestras de suero sanguíneo

Las muestras de suero sanguíneo utilizadas provienen de 52 pacientes alérgicos a antibióticos β -lactámicos y 49 controles no atópicos y se obtuvieron siguiendo el protocolo normalizado por el Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia. En primer lugar, las muestras de sangre se recogieron en tubos de recolección sin anticoagulantes (BD Diagnostics, Madrid, España). Seguidamente, las muestras se dejaron reposar durante 60 minutos a temperatura ambiente para inducir su coagulación. A continuación, los tubos se centrifugaron durante 15 minutos a 2000 rpm. El suero resultante se alicuotó en crioviales y se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Los participantes del estudio dieron el consentimiento informado por escrito de acuerdo con los protocolos aprobados por la junta de revisión de ética del Hospital Universitari i Politècnic La Fe (registro no. COBIOPHAD). Los procedimientos seguidos se ajustaban a la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 2008. Los pacientes fueron diagnosticados siguiendo el procedimiento descrito en el protocolo de la Red Europea de Alergia a Medicamentos (ENDA) basado en historial clínico, pruebas cutáneas, pruebas *in vitro* (ImmunoCAP y test de activación de basófilos) o pruebas de provocación de fármacos, siempre que fuera necesario (Tabla A1.1-A1.4).

3.9. Lectura y adquisición de datos

El sistema de lectura de resultados del lector de discos consta de tres partes: (1) una tarjeta de adquisición de datos de alta velocidad (DAQ); (2) una tarjeta de alimentación e interfaz (PIC); y (3) una unidad de disco óptico (ODD).

El DAQ comprende tres bloques funcionales principales para lograr la detección de la señal, la adquisición analógica, y deserialización y transmisión de datos. La detección de la señal implica el procesamiento analógico (acondicionamiento y preamplificación) de la señal de reflexión óptica obtenida del fotodiodo del cuadrante de la unidad de captación del ODD, así como la detección digital de la señal de disparo. La

adquisición analógica se realiza con el convertidor analógico-digital LT2323 (ADC) que digitaliza la señal de reflexión.

El bloque de deserialización convierte la salida digital en serie del SPI (Serial Peripheral Interface) del ADC en datos paralelos de 16 bits. Para ello, se utiliza una FPGA (Field Programmable Gate Array) Cyclone III que también gestiona la configuración de la frecuencia de muestreo y la interfaz con el transceptor USB para la transferencia de datos a alta velocidad. El PIC suministra la tensión para el DAQ, la unidad de disco óptico y los componentes electrónicos del HUB y del puente SATA. Además, proporciona la interfaz de comunicación con el ordenador externo a través de un conector USB tipo B. El ordenador se conecta al HUB interno con cuatro puertos USB. Un puerto se conecta a la tarjeta de adquisición de datos, y otro se conecta al puente SATA para comunicarse con la unidad de disco óptico.

La lectura de los discos se realiza de la siguiente manera. El DVD se introduce en la bandeja del lector y se realiza una simulación de la grabación del disco, de la misma manera, como se haría con cualquier disco grabable. El lector escanea el disco moviendo el conjunto de captación óptica láser desde el radio interior al exterior mientras el disco gira a una velocidad angular constante. El sistema logra una resolución optoelectrónica de 5.5 μm . El lector se controla mediante un software personalizado (BIODISK), que se ejecuta en un ordenador personal conectado a través de una interfaz de bus serie universal USB 2.0. Durante este proceso, el haz láser (λ 650 nm) escanea la superficie del disco, pudiendo correlacionar las variaciones de la potencia óptica del haz reflejado con la concentración de analito (IgE, IgG, etc.), que es proporcional a la densidad óptica del precipitado de TMB.

Posteriormente, el haz reflejado se detecta por el fotodiodo de la unidad de captación óptica del ODD (señal diferencial de RF) y la señal es digitalizada mediante el DAQ. El software personalizado funciona bajo Windows (Windows W7 y W10) y está escrito en lenguaje Microsoft Visual C ++. Este software genera una imagen tipo *tiff* para cada una de las 20 micromatrices impresas en el disco. Un algoritmo de análisis de imágenes y datos identifica cada uno de los puntos impresos en la matriz. El análisis de datos genera las señales digitales y los parámetros de calidad (concentración, cálculo de errores y controles) para cada punto, restando el fondo local del valor medio de la señal

del punto. En la Figura 32 se muestra un esquema electrónico del lector de discos empleado en este trabajo.

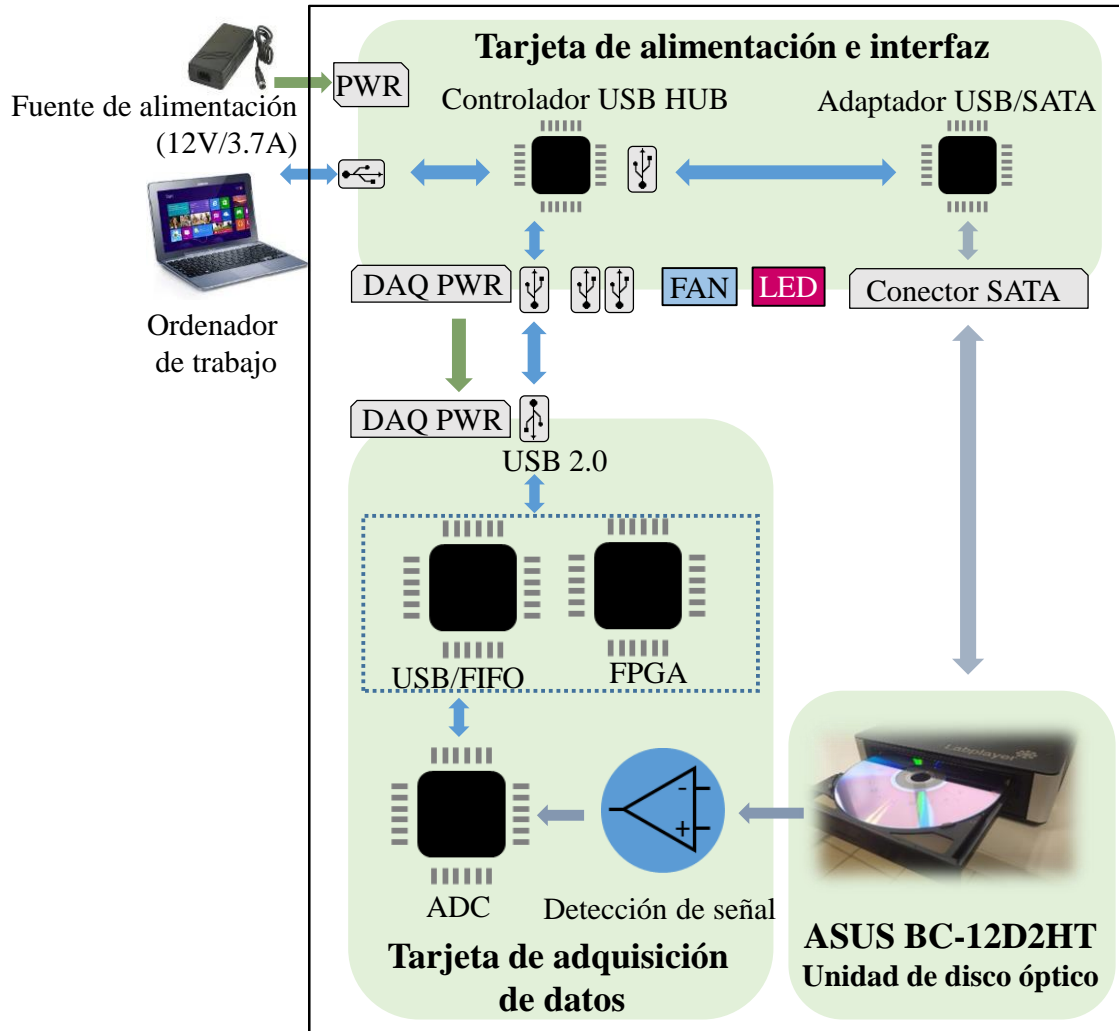


Figura 32. Esquema electrónico del lector de discos compactos tipo DVD.

RESULTADOS

El desarrollo de pruebas *in vitro* con buenas prestaciones analíticas para el diagnóstico de alergia a antibióticos β -lactámicos es un desafío. Actualmente, la IgE es el único biomarcador específico relacionado con alergia. Los niveles de esta inmunoglobulina aumentan en sangre circulante tras una respuesta alérgica. A diferencia de otros marcadores de hipersensibilidad tipo I como la histamina o la triptasa, la IgE tiene una zona de reconocimiento específica al alérgeno (paratopo) que le confiere selectividad y proporciona información valiosa acerca del epítipo responsable de la respuesta alérgica. Sin embargo, la concentración de IgE en sangre es generalmente muy baja, inferior a 24 ng/mL, en la mayoría de los pacientes alérgicos a antibióticos β -lactámicos. Por lo tanto, un diagnóstico correcto requiere disponer de métodos con una elevada sensibilidad analítica. Además, como consecuencia de la baja concentración de IgE en sangre, es conveniente trabajar con muestras de suero sanguíneo sin diluir. Esto dificulta el proceso de análisis ya que este tipo de muestra es compleja en su composición presentando un elevado número de interferentes que pueden afectar a la determinación selectiva de IgE específica. Por lo que, además de una elevada sensibilidad, el ensayo debe presentar una buena selectividad.

Obtener un ensayo con las características analíticas requeridas para el diagnóstico *in vitro* de alergias a antibióticos β -lactámicos pasa por considerar una serie de aspectos clave, por ello en esta tesis doctoral se planteó, en primer lugar, la puesta a punto y selección del formato del ensayo para la determinación de IgE específica a PG, como sistema modelo. Seguidamente, se abordó la preparación y caracterización de diferentes antígenos de PG y AMX. Posteriormente se evaluaron las prestaciones analíticas y clínicas del ensayo analizando muestras de suero de pacientes y controles. A continuación, se estudiaron diferentes estrategias de calibración para la cuantificación de IgE específica en muestras de suero humano de pacientes alérgicos. Los resultados obtenidos tras el uso de las diferentes estrategias de calibración se compararon con los obtenidos por el método de referencia (ImmunoCAP). Además, se utilizó la capacidad multiplex de la tecnología de disco compacto para evaluar la reactividad cruzada de los pacientes alérgicos a otros β -lactámicos, con el fin de obtener patrones de sensibilización. Finalmente, se compararon los resultados obtenidos en la plataforma de disco compacto y los obtenidos con un sistema microfluídico y semiautomatizado (COBIOPHAD), utilizando las condiciones y reactivos del ensayo puesto a punto en disco tipo DVD.

4.1. Puesta a punto del ensayo de detección de IgE específica a fármacos

Como se comentó anteriormente, el ensayo de determinación de IgE específica en muestras de suero sanguíneo en la plataforma de disco compacto debe ser selectivo, sensible y preciso, para poder ser usado como herramienta fiable de diagnóstico *in vitro* de alergia a β -lactámicos. Es por ello que el criterio empleado para seleccionar reactivos y formato de ensayo se ha basado en los parámetros analíticos: selectividad, reproducibilidad (RSD), relación señal/ruido (S/N) y sensibilidad (LOD, LOQ y EC50), principalmente.

4.1.1. Estudio de la inmovilización del antígeno

4.1.1.1. Inmovilización mediante adsorción pasiva de los antígenos

La puesta a punto de un inmunoensayo heterogéneo para la determinación de IgE requiere, en primer lugar, estudiar las condiciones de inmovilización de las sondas (antígenos o anticuerpos) en la superficie del disco.

Estudios previos y datos bibliográficos muestran que el PC presenta un buen rendimiento de inmovilización de sondas de naturaleza proteica por adsorción pasiva. Sin embargo, el rendimiento de inmovilización depende de la concentración de impresión de la sonda y el pH del medio, parámetros clave que hacen que el ensayo muestre una elevada sensibilidad analítica.

Para llevar a cabo el estudio de selección de la concentración de impresión, varias concentraciones del antígeno comercial C1-PG (1.25-40 mg/L) se inmovilizaron en la superficie en tampón carbonato 50 mM pH 9.6. Seguidamente, se realizó el ensayo indirecto de cuatro etapas usando GAM-HRP descrito en la sección 3.6.3A de Materiales y Métodos, utilizado como muestra qIgE anti-PG a diferentes concentraciones (0, 1.56 y 6.4 UI/mL). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 33.

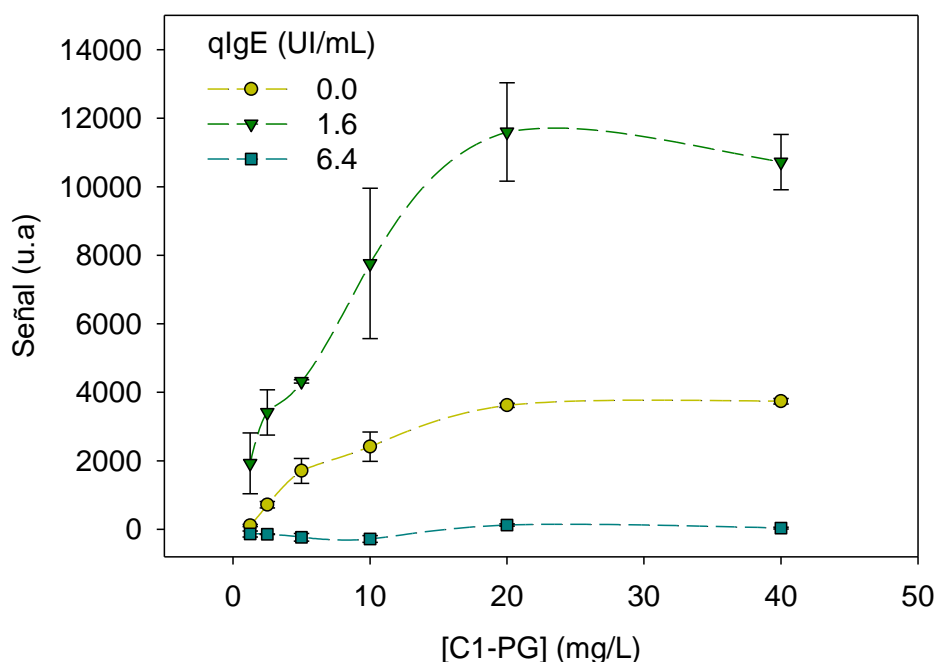


Figura 33. Estudio del efecto de la concentración de impresión de antígeno en la señal analítica del ensayo.

Como se puede observar, la señal analítica aumenta hasta alcanzar la saturación a una concentración de impresión de 20 mg/L. Concentraciones superiores al valor de saturación no llevaron a un incremento en la intensidad de la señal analítica, de modo que no se observan diferencias estadísticamente significativas entre 20 y 40 mg/L (ANOVA, $p = 0.160$). Sin embargo, la reproducibilidad de las señales obtenidas a 20 mg/L fue hasta dos veces más baja que la obtenida con 40 mg/L, siendo la RSD para las concentraciones de qIgE 1.6 y 6.4 UI/mL de 12 y 4 % para la concentración de 20 mg/L y 8 y 2 % para 40 mg/L, respectivamente. En base a estos resultados se seleccionó 40 mg/L como concentración óptima de impresión.

Es importante señalar que, para alcanzar el máximo rendimiento de inmovilización, la proteína debe encontrarse en un medio que favorezca su adsorción sobre la superficie. En este contexto, se estudió el efecto del pH del tampón de impresión. Para obtener un buen rendimiento de inmovilización es necesario que el pH del medio sea superior al punto isoeléctrico (pI) del antígeno. Los antígenos utilizados en esta tesis doctoral son conjugados hapteno-proteína, preparados con diferentes transportadores, todos ellos con un punto isoeléctrico inferior a 7.0, por lo que se utilizaron medios de impresión con pH superior a este valor.

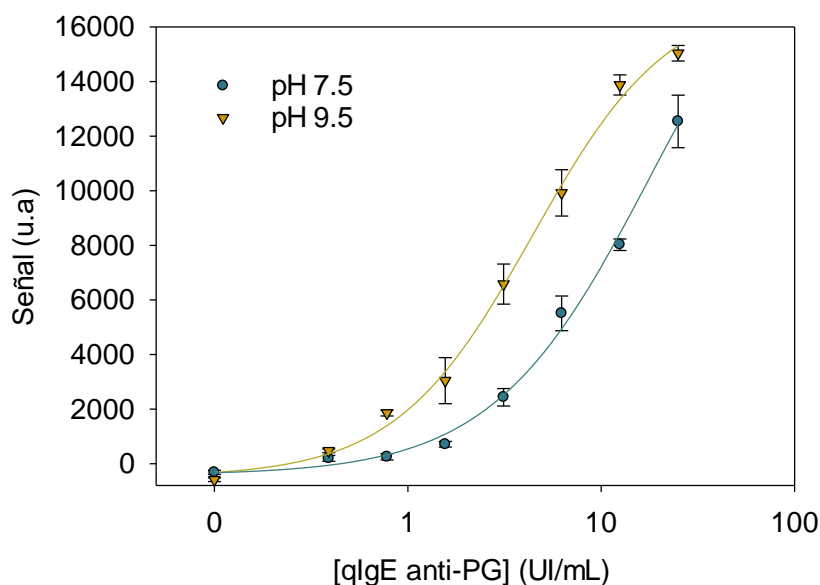


Figura 34. Efecto del pH del tampón de impresión en la sensibilidad del ensayo de determinación de IgE.

Este estudio se llevó a cabo inmovilizando el antígeno sobre la superficie del disco a una concentración de 40 mg/L en tampón carbonato pH 9.5 y PBS 1X pH 7.5 y utilizando qIgE anti-PG como muestra a concentraciones crecientes en un rango de 0-25 UI/mL. Los resultados obtenidos muestran que el pH del tampón de impresión afecta considerablemente a la inmovilización del antígeno (Figura 34). Los mejores resultados se obtuvieron a pH 9.5, alcanzando un LOD y EC50 de 0.4 y 3.5 UI/mL, respectivamente, 2.5 veces mayor sensibilidad que la obtenida utilizando PBS 1X pH 7.5, (LOD 1.1 UI/mL y EC50 8.9 UI/mL). Estos resultados coincidieron con lo esperado, ya que el tampón carbonato tiene un pH dos puntos por encima del punto isoeléctrico de los antígenos utilizados. En base a estos resultados se seleccionó el tampón carbonato pH 9.5 como tampón de impresión.

La proteína transportadora que forman parte del antígeno, además de interactuar con la superficie, puede interactuar inespecíficamente con los componentes de la muestra, generando una señal que puede ser confundida con el reconocimiento antígeno-anticuerpo. Para llevar a cabo el estudio de selectividad del ensayo, se inmovilizaron sobre la superficie del disco, en formato micromatriz, una batería de antígenos preparados con diferentes antibióticos β -lactámicos. Seguidamente, se evaluó la selectividad del reconocimiento siguiendo el ensayo indirecto de cuatro etapas usando GAM-HRP

(3.6.3.A) y utilizando como muestra disoluciones de diferentes qIgE específicas a PG, AZT, CFT y MRP a una concentración de 10 UI/mL.

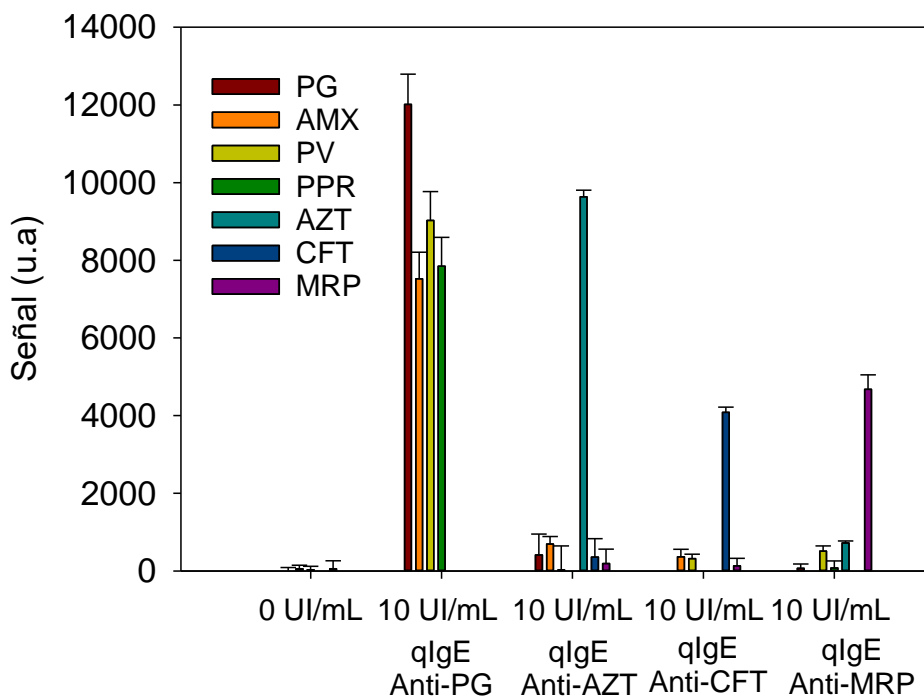


Figura 35. Estudio de selectividad del ensayo con antígenos de diferentes familias de antibióticos BL.

Como se observa en la Figura 35, la qIgE específica a PG reconoció únicamente a los antígenos formados por los antibióticos β -lactámicos pertenecientes a la familia de las penicilinas (PG, AMX, PV y PPR), no observándose señal con aquellos antígenos preparados con miembros de las otras familias (AZT, CFT y MRP) ni en la proteína transportadora sin conjugar (HSA). De igual manera, la qIgE específica a CFT, MRP o AZT reconoció específicamente a los antígenos de CFT, MRP y AZT, respectivamente, no reaccionando con el resto de los antígenos estudiados. Además, ninguno de los antígenos inmovilizados mostró señal inespecífica en el blanco (0 UI/mL de qIgE). Estos resultados revelaron que el ensayo desarrollado era selectivo.

4.1.1.2. Inmovilización covalente de haptenos

Los antibióticos β -lactámicos son compuestos de baja masa molecular (300 - 600 g/mol) y no presentan apenas grupos reactivos capaces de interaccionar con la superficie del disco compacto mediante fuerzas de Van Der Waals, electroestáticas, o puentes de

hidrógeno. Es por ello que los β -lactámicos necesitan conjugarse, principalmente a proteínas, para favorecer y facilitar su inmovilización por adsorción pasiva. Sin embargo, el uso de estas proteínas puede afectar a la sensibilidad y selectividad del ensayo. Por un lado, las proteínas que componen los antígenos pueden interaccionar inespecíficamente con componentes de la muestra enmascarando el reconocimiento o dando lugar a señal inespecífica. Y, por otro lado, aunque estas proteínas suelen presentar un elevado número de grupos lisina, puede ocurrir que sólo unos pocos de estos grupos se encuentran accesibles, como ocurre con HSA, en la que únicamente 8-10 residuos de los 60 que presenta se encuentran modificados. Además, estos grupos modificados pueden no quedar expuestos y accesibles al reconocimiento de la IgE tras la inmovilización.

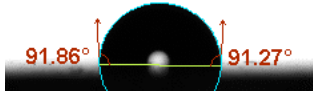


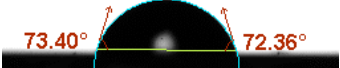
Con el fin de disminuir las interacciones inespecíficas y mejorar el reconocimiento de los determinantes antigénicos se planteó la inmovilización directa de los antibióticos mediante anclaje covalente sobre la superficie del disco compacto. Este tipo de inmovilización permite también la inmovilización direccionada del epítipo.

Atendiendo a la estructura química de los antibióticos β -lactámicos, se puede observar que todos ellos presentan un anillo β -lactámico que puede ser hidrolizado y anclado a la superficie del disco (ruta A), y un grupo carboxilo en el anillo condensado con la β -lactama que puede ser utilizado como punto de anclaje (ruta B). Por lo tanto, para poder inmovilizar covalentemente el antibiótico sobre la superficie del DVD es necesario generar grupos amino que puedan unirse a los dos grupos anteriormente citados. Otra estrategia es generar grupos carboxilo en la superficie de PC y unir el antibiótico mediante la química de las succinimidias al grupo amino presentes en la cadena lateral de algunos β -lactámicos, como la AMX, AMP, CFC. Sin embargo, esta vía, no permite el anclaje de otros antibióticos β -lactámicos que generan comúnmente respuesta alérgica, como la penicilina y la PPR, entre otras.

Para llevar a cabo la inmovilización covalente se activó el PC según el protocolo descrito en la sección 3.6.6 y se estudió el efecto del tratamiento fisicoquímico de funcionalización en la hidrofobicidad de la superficie mediante la medida de ángulos de contacto. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

La superficie de PC sin tratar es muy hidrofóbica, presentando un ángulo de contacto cercano a 90°. Tras la irradiación de la superficie con luz ultravioleta, ésta se volvió muy hidrofílica (11.6°) por la generación de grupos carboxílicos. Posteriormente, se realizó una hidrólisis básica de la superficie, recuperando parcialmente la hidrofobicidad (60°). Seguidamente, los ácidos carboxílicos generados se hicieron reaccionar con EDC/NHS, como se indica en el protocolo de activación anteriormente descrito. Esta modificación disminuyó la tensión superficial de 60° a 73°. Las etapas posteriores, no generaron cambios de la hidrofobicidad de la superficie.

Tabla 11. Ángulos de contacto obtenidos en la activación química del DVD (n=3).

Etapas de modificación química	Ángulo de contacto (°)	Figuras
DVD sin tratar	91.2 ± 0.4	
Irradiación UV	11.6 ± 5.3	
NaOH	59.6 ± 1.7	
EDC/NHS	70.8 ± 5.3	
Carbohidrazida	71.6 ± 1.8	
Etanolamina	73.2 ± 3.2	
BSA/EDTA/Tween 20	73.9 ± 2.1	

A continuación, se estudió el efecto de la concentración de antibiótico en la respuesta del ensayo. Para ello, se inmovilizó PG covalentemente sobre la superficie del disco a diferentes concentraciones (0.1-100 nM), y posteriormente, se evaluó el rendimiento de anclaje siguiendo el ensayo indirecto de cuatro etapas usando GAM-HRP (sección 3.6.3A de Materiales y Métodos) utilizando como muestra qIgE anti-PG a 25 UI/mL.

Como se observa en la Figura 36, en las dos rutas de anclaje estudiadas, la señal de reconocimiento mejoró conforme aumentó la concentración de PG inmovilizada, alcanzando el valor máximo para una concentración de 10 mM. Sin embargo, las señales

obtenidas para la penicilina anclada mediante la ruta A (lisis básica) fueron significativamente más altas que las obtenidas para la ruta B.

Esta diferencia en la señal puede deberse, por un lado, a un peor rendimiento de inmovilización de los haptenos mediante la ruta B y, por otro lado, a la estructura del determinante antigénico, ya que la qIgE fue producida frente determinante mayor de los BL, por lo que presentará una mayor afinidad por los determinantes generados mediante la ruptura del anillo β -lactámico (ruta A), que por los mantiene esa estructura intacta (ruta B).

En base a estos resultados se seleccionó la ruta de anclaje A, como vía de inmovilización covalente del antibiótico β -lactámico.

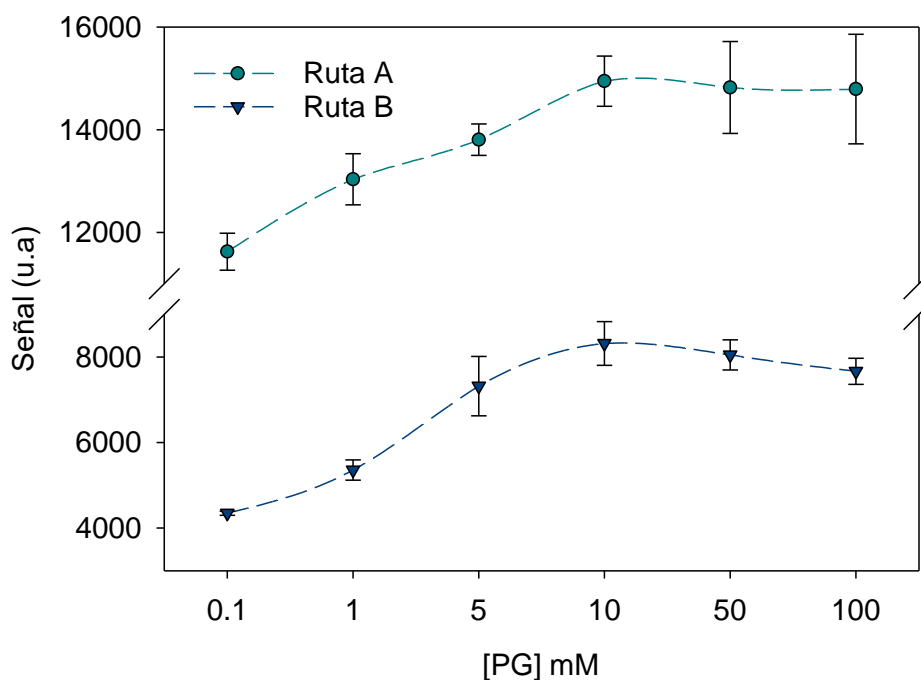


Figura 36. Variación de la señal con la concentración de inmovilización para el anclaje del antibiótico siguiendo la lisis básica del anillo β -lactámico (ruta A) y la química de la carbodiimida (ruta B).

Uno de los puntos más importantes en la inmovilización de compuestos mediante anclaje covalente es la selectividad del ensayo, ya que en ocasiones la muestra puede interactuar con la superficie activada dando lugar a señales inespecíficas. Para ello, se evaluó la selectividad del ensayo inmovilizando covalentemente sobre la superficie del

DVD un panel de antibióticos β -lactámicos (MRP, AZT, PPR, CFR, AMX, AMP, PG, penicilina V) siguiendo la ruta A.

Como se muestra en la Figura 37, los blancos no presentaron señal inespecífica para ninguno de los fármacos inmovilizados. Además, se observó que conforme aumenta la concentración de qIgE anti-PG incrementa la señal analítica para los fármacos de la familia de las penicilinas, pero no detecta los de las otras familias. Estos resultados indicaron que, el reconocimiento es selectivo, existiendo reactividad cruzada entre miembros de la misma familia, pero no con otros de las diferentes familias.

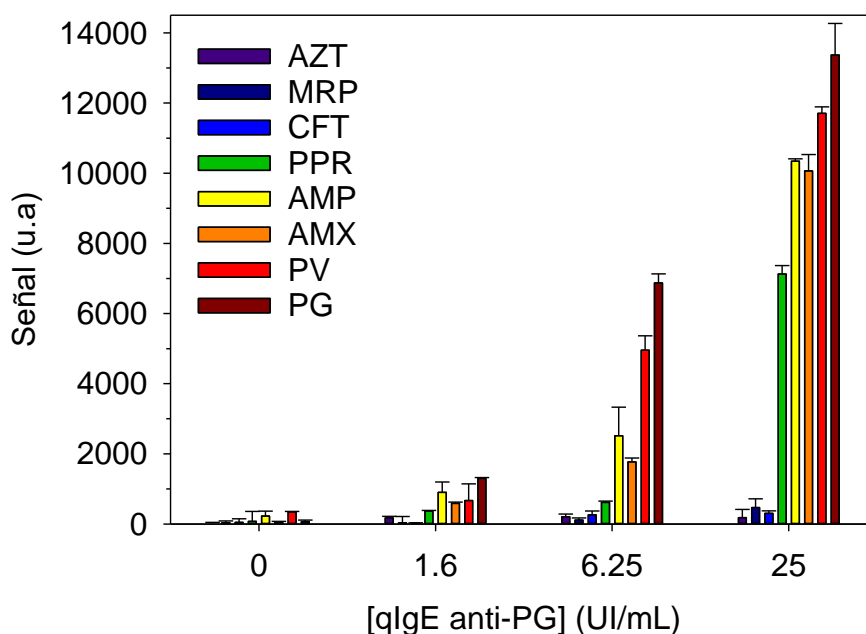


Figura 37. Evaluación del reconocimiento obtenido de la sIgE anti-PG frente a diferentes β -lactámicos inmovilizados sobre la superficie del disco mediante anclaje covalente.

Para confirmar la selectividad del ensayo se utilizó una disolución de IgE anti-AZT a una concentración de 17 UI/mL (Figura 38). En este caso, como se esperaba, esta qIgE sólo reconoció el antibiótico análogo (AZT), confirmando la selectividad del ensayo.

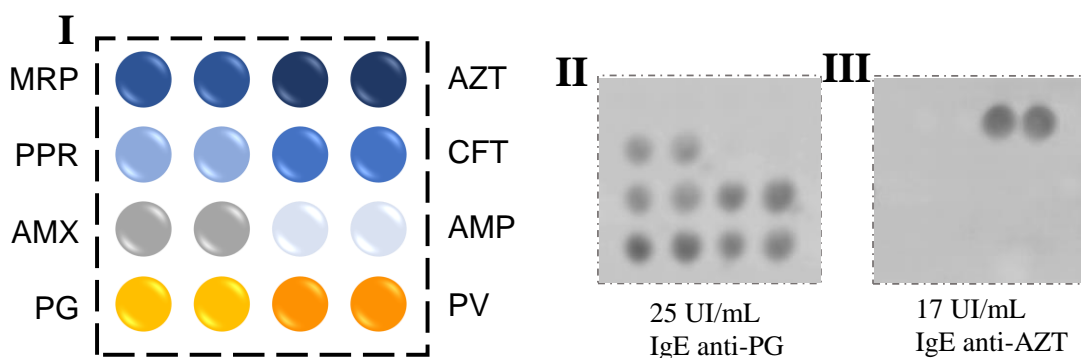


Figura 38. Esquema del diseño de impresión de antibióticos inmovilizados covalentemente sobre la superficie (I), imagen de los resultados obtenidos con 25 UI/mL de qIgE anti-PG (II) y 17 UI/mL de qIgE anti-AZT(III).

La sensibilidad del ensayo covalente se comparó con la obtenida en el ensayo por adsorción pasiva siguiendo el ensayo indirecto de cuatro etapas usando GAM-HRP (sección 3.6.3A de Materiales y métodos) y utilizando concentraciones crecientes de qIgE anti-PG (0 – 25 UI/mL) como calibrador (Figura 39).

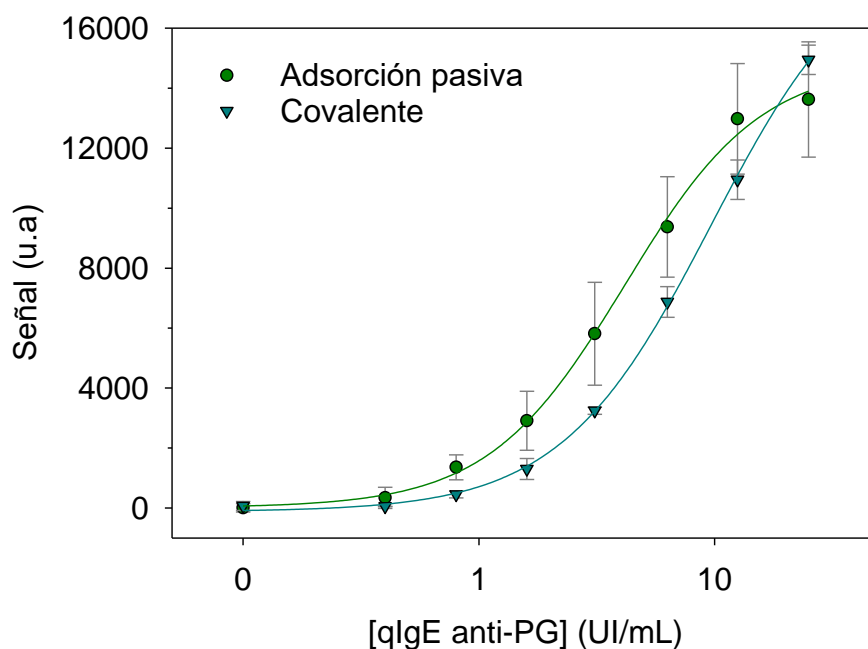


Figura 39. Curvas de calibrado del ensayo para la determinación de IgE específica anti-PG mediante en anclaje covalente de PG (n=3) e inmovilización pasiva de C1-PG (n=10).

Como se observa en la Figura 39 ambas curvas de calibrado presentan una pendiente similar, 1.9 y 1.6 para la inmovilización por adsorción pasiva y covalente

respectivamente. Sin embargo, el ensayo por inmovilización pasiva presentó mayor sensibilidad, con valores de LOD y LOQ de 0.4 y 1.0 UI/mL respectivamente. Estos parámetros analíticos fueron 2.2 veces más bajos que los obtenidos por inmovilización covalente (Tabla 12). En base a estos resultados se seleccionó la inmovilización pasiva para el ensayo de determinación de IgE específica frente a fármacos, si bien la vía de inmovilización covalente es muy prometedora.

Tabla 12. Prestaciones analíticas obtenidas para los dos tipos de inmovilización.

	LD (UI/mL)	LQ (UI/mL)	EC50 (UI/mL)	Intervalo de trabajo (UI/mL)
Adsorción	0.4	1.0	4.2	0.5 – 10
Covalente	0.9	1.8	6.9	0.9 - 12.5

4.1.2. Estudio del tiempo de incubación de la muestra

Uno de los puntos clave en el desarrollo de un ensayo de detección de biomarcadores es demostrar su aplicabilidad en muestras reales. En el caso de del diagnóstico de alergia a BL, la muestra a analizar es suero sanguíneo. Esta muestra es compleja en su composición y afecta, por un lado, a la sensibilidad del ensayo, ya que los componentes del suero dificultan la difusión del analito dando lugar a una cinética de reconocimiento lenta o pueden interaccionar con los antígenos inmovilizados en la superficie mediante enlaces no covalentes, enmascarando el lugar de unión del analito y por lo tanto interfiriendo en el grado de reconocimiento. Por otro lado, estos interferentes pueden afectar también a la selectividad del ensayo, ya que la interacción no específica de los componentes de la muestra tanto con la superficie del disco compacto como con los antígenos inmovilizados puede dar lugar a señales inespecíficas. Con el fin de minimizar este efecto y maximizar la sensibilidad del ensayo se planteó estudiar el efecto del tiempo de incubación del suero en las prestaciones analíticas del ensayo.

Para ello, se prepararon diluciones de un suero representativo con concentración conocida de IgE específica frente a PG, utilizando un suero control como diluyente. Estas diluciones se incubaron durante distintos tiempos (5 - 60 min) en el disco con antígeno

C1-PG inmovilizado. Las etapas de detección y revelado se llevaron a cabo como establece la sección 3.6.3.A de Materiales y Métodos. La Figura 40 muestra los resultados obtenidos.

Como se observa, la señal analítica obtenida para las diluciones 1/8, 1/16, 1/32 incrementó conforme aumentó el tiempo de incubación de la muestra hasta alcanzar la máxima señal a 30 minutos. Un aumento del tiempo no llevó una mejora en el reconocimiento en la mayoría de las diluciones evaluadas, y por contra, se observó un incremento de la señal inespecífica en el blanco (cero).

Tras el estudio estadístico (ANOVA multifactorial de dos variables) se determinó que para las concentraciones 0.3, 0.6 y 1.2 no existían diferencias estadísticamente significativas entre 30 y 60 minutos ($p > 0.3$). Sin embargo, había diferencias entre 5, 15 y 30 minutos ($p < 0.05$). En el caso del blanco (suero control), los resultados mostraron que no había diferencias significativas entre 5, 15 y 30 min, pero sí que las había para 60 minutos. De acuerdo a estos resultados se concluyó que 30 minutos era el tiempo de incubación óptimo, en términos de sensibilidad y selectividad del ensayo.

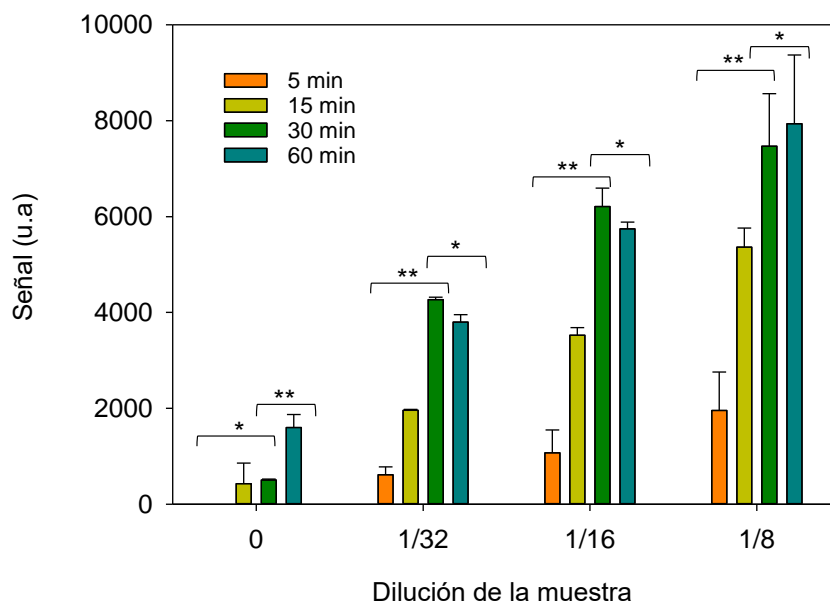


Figura 40. Efecto del tiempo de incubación de la muestra de suero en el reconocimiento de la IgE específica.

*No hay diferencias estadísticamente significativas, **Hay diferencias estadísticamente significativas.

4.1.3. Estudio del formato de ensayo

4.1.3.1. Ensayo indirecto

El formato de ensayo es otro de los factores clave en el desarrollo de un inmunoensayo sensible para la determinación de IgE específica a antibióticos β -lactámicos. Inicialmente se planteó la puesta a punto de un ensayo de tres etapas evaluando el efecto de la concentración de anticuerpo detector y la especie detectora en la sensibilidad del ensayo.

En este contexto, se llevó a cabo la titulación de dos especies detectoras, un anticuerpo monoclonal (mAb-HRP) y otro policlonal (pAb-HRP) en un rango de diluciones que varió entre 1/100-1/3200, siguiendo el ensayo indirecto de tres etapas descrito en la sección 3.6.2 de Materiales y Métodos, y utilizando las concentraciones de 0 y 17 UI/mL de qIgE anti-PG como calibrador.

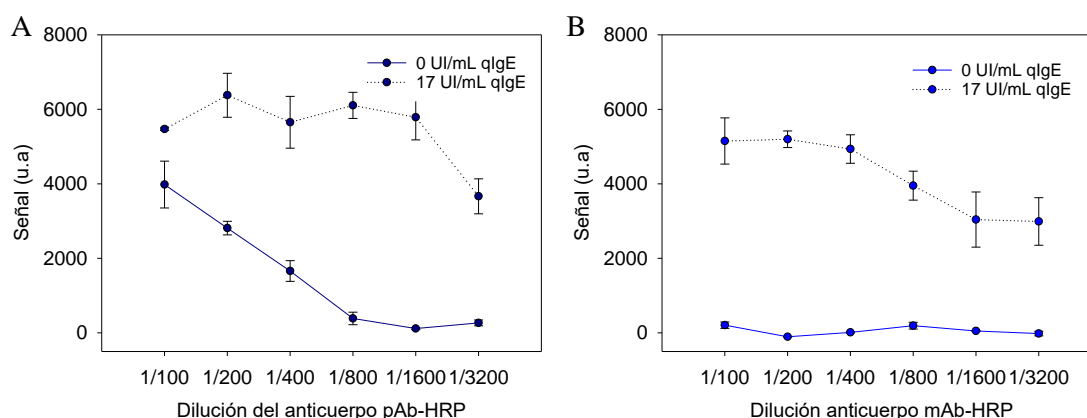


Figura 41. Titulación de la especie detectora, anticuerpo detector pAb-HRP (A) y mAb-HRP(B), en un ensayo de determinación de IgE específica de tres etapas.

Como puede observarse en la Figura 41A el ensayo con anticuerpo policlonal proporcionó señales inespecíficas elevadas para las diluciones 1/100, 1/200 y 1/400, disminuyendo la relación S/R, siendo ésta 1.2, 2.2, 3.4, 32.6 para las diluciones 1/100, 1/200, 1/400 y 1/800, respectivamente. Sin embargo, las diluciones de anticuerpo detector 1/1600 y 1/3200 generaron señales analíticas más bajas y por lo tanto, una menor relación S/R (< 31). Por ello, se seleccionó 1/800 como dilución óptima.

En el caso del anticuerpo monoclonal (Figura 41B), a diferencia de lo ocurrido en el caso anterior la relación S/R se mantuvo constante (~ 28) entre las diluciones 1/100-1/400. Sin embargo, diluciones mayores de anticuerpo detector provocaron una disminución de la relación S/R. Así pues, con el fin de obtener una mayor sensibilidad y disminuir el volumen de anticuerpo detector consumido, se seleccionó 1/400 como dilución óptima.

Una vez establecida la concentración óptima de anticuerpo detector, se llevaron a cabo calibrados, utilizando diluciones seriadas de qIgE como patrón, para comprobar la sensibilidad de los ensayos.

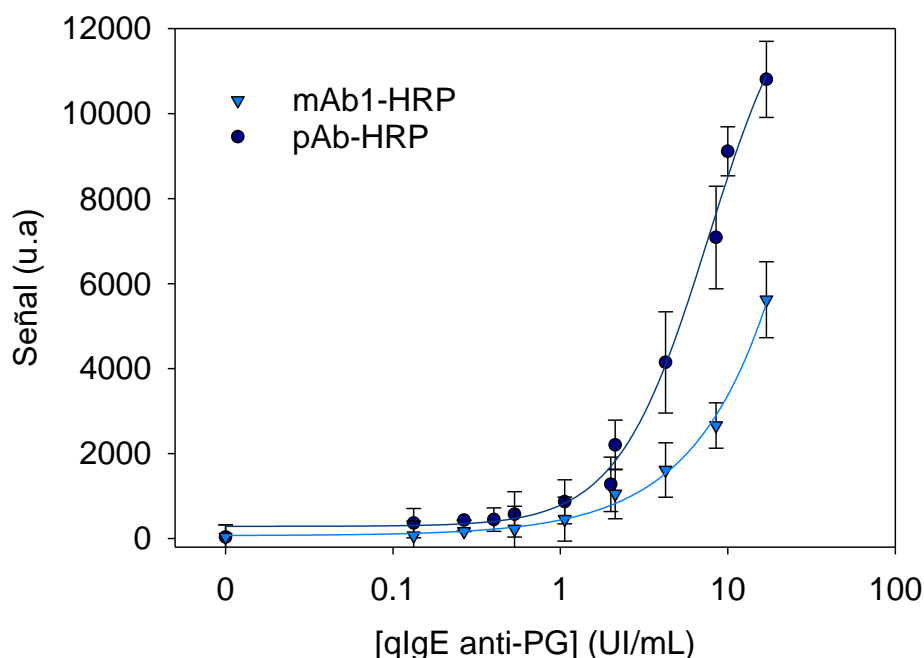


Figura 42. Estudio comparativo de la sensibilidad del ensayo indirecto de tres etapas de detección de IgE específica frente a PG utilizando pAb-HRP y mAb-HRP como especie detectora.

Como se observa en la Figura 42, el ensayo con el anticuerpo pAb-HRP mostró un LOD de 1.1 UI/mL, dos veces más bajo que el obtenido con el anticuerpo detector mAb1-HRP, (LOD = 2.3 UI/mL). Sin embargo, aunque el ensayo con el anticuerpo pAb-HRP mostró una mayor sensibilidad, el límite de detección del ensayo fue 3.3 veces más alto que el valor de corte de los métodos *in vitro* de referencia (0.35 UI/mL), impidiendo identificar pacientes alérgicos de la categoría 1 de la clasificación RAST (valores de IgE comprendidos entre 0.35-0.7 UI/mL).

Con el fin de mejorar la sensibilidad analítica del ensayo, se planteó añadir una etapa de amplificación adicional. El aumento del número de etapas puede realizarse marcando con biotina el anticuerpo anti-IgE humana, y posteriormente utilizar estreptavidina marcada con HRP como segunda etapa de detección. Esta estrategia es especialmente útil en ensayos tipo sándwich en el que los dos anticuerpos, detector y captura, son de la misma especie y presentan reactividad con el anticuerpo secundario. Además, la biotina tiene una elevada afinidad por la estreptavidina por lo que puede llevar a un aumento considerable de la sensibilidad del ensayo.

Para la puesta a punto de este formato de ensayo, en primer lugar, se realizó un estudio del efecto de las concentraciones de anticuerpo biotinilado y del marcador STV-HRP en la S/R. Para ello, primero se seleccionó la concentración de anticuerpo biotinilado óptima manteniendo constante la concentración de STV-HRP (1/200). Una vez seleccionada esta concentración se varió la dilución de STV-HRP en el rango 1/50-1/1600. Las titulaciones se realizaron siguiendo el ensayo indirecto de cuatro etapas con STV-HRP (sección 3.6.3B), utilizando 0 y 1.7 UI/mL de IgE quimérica anti-PG como muestra.

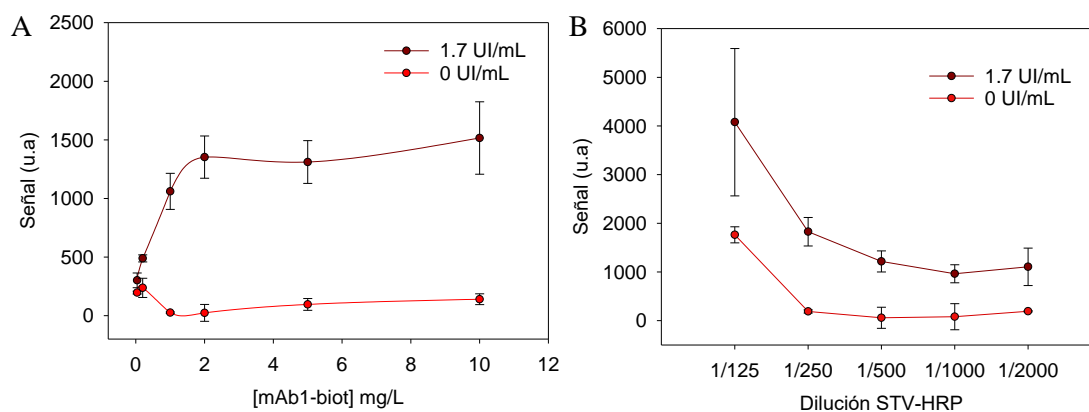


Figura 43. Titulación de la concentración de Ab-biot (A) y la STV-HRP (B) en un ensayo indirecto de 4 etapas.

Los resultados representados en la Figura 43A muestran que la señal de reconocimiento aumentó conforme se incrementó la concentración de anticuerpo biotinilado, hasta alcanzar su máximo de señal a 2.0 mg/L. Concentraciones superiores no generaron señales más altas, sin embargo, la RSD aumentó del 14 al 20 %, por lo que se seleccionó 2.0 mg/L como concentración óptima. Por otro lado, en el ensayo de

titulación de STV-HRP (Figura 43B) se observó que altas concentraciones del detector (1/125), provocaban señal inespecífica en los blancos, disminuyendo la S/R. Además, la reproducibilidad del ensayo fue baja, presentando una RSD por encima de 35 %. Conforme el detector se diluyó, la S/R mejoró, alcanzando la mejor respuesta a una dilución de 1/500.

Tras seleccionar las concentraciones óptimas de los anticuerpos de detección, se llevó a cabo la selección del anticuerpo biotinilado. Para ello, se evaluaron 4 anticuerpos (mAb1, mAb2, pAb y Omalizumab) y un receptor (Fc ϵ R1) siguiendo el ensayo indirecto de cuatro etapas descrito en la sección 3.6.3B de Materiales y Métodos, y utilizando qIgE anti-PG como muestra (0-25 UI/mL).

Como se observa en la Figura 44A, el anticuerpo utilizado en la etapa de detección es clave y afecta a la sensibilidad del ensayo. Los anticuerpos mAb1, mAb2 y el receptor de la IgE, mostraron un mayor reconocimiento que el pAb y Omalizumab. Las señales de reconocimiento se compararon mediante ANOVA multifactorial de dos variables y se determinó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre mAb1, mAb2 y Fc ϵ RI ($P > 0.8$), pero sí las había con el pAb y Omalizumab ($P < 0.05$).

Seguidamente, se evaluó la sensibilidad del ensayo, utilizando las tres especies detectoras (Figura 44B). El ensayo llevado a cabo con los detectores mAb (1 y 2) y Fc ϵ RI mostró límites de detección de 0.8 UI/mL, 1.8 y 2.3 veces más bajo que los obtenidos para pAb y omalizumab, respectivamente.

En comparación con el ensayo de tres etapas, este ensayo mostraba mejores prestaciones analíticas (menor LOD) pero insuficiente como prueba *in vitro* para el diagnóstico de alergias a antibióticos β -lactámicos.

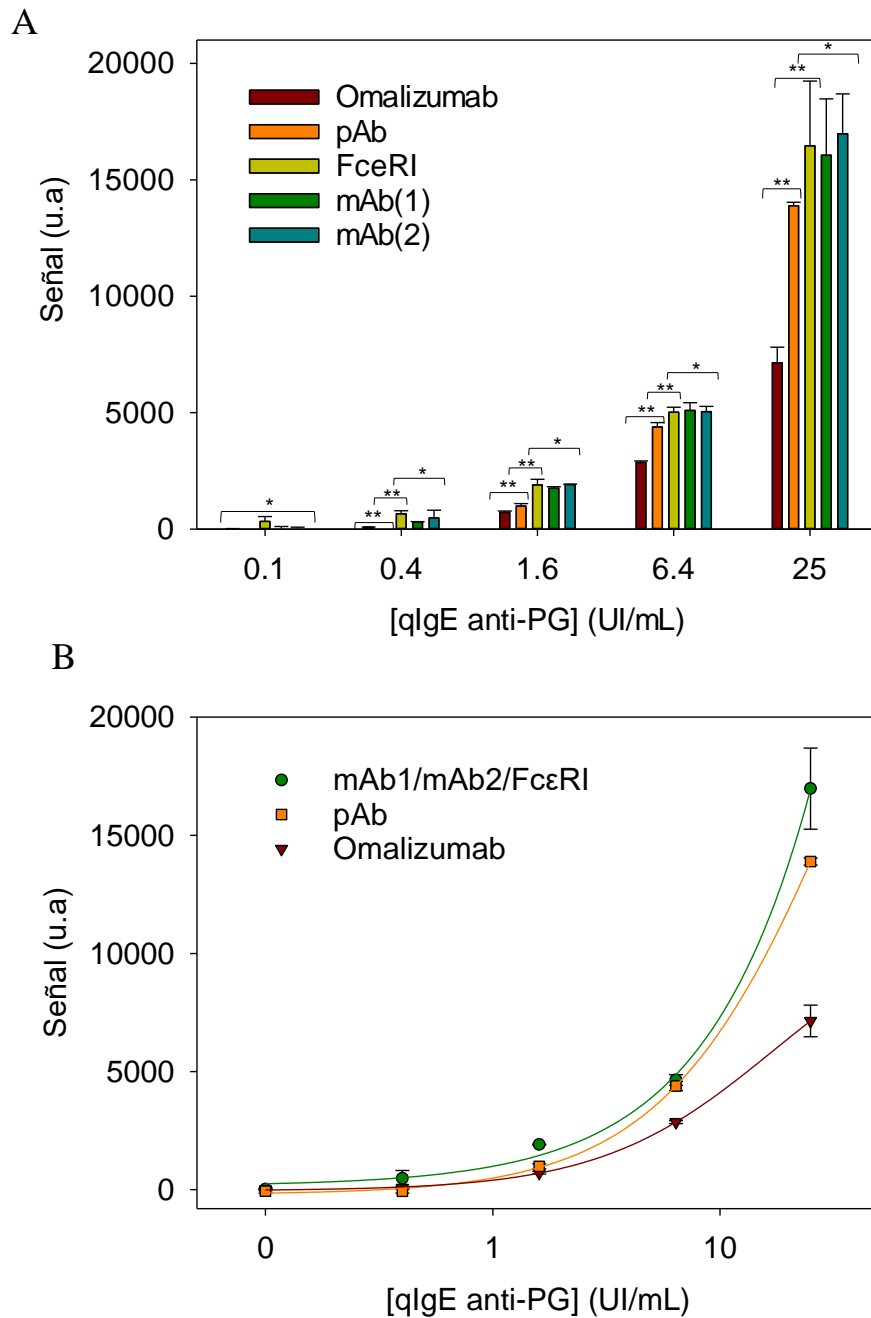


Figura 44. Respuesta de los anticuerpos biotinilados en un ensayo de 4 etapas (A). Curvas de calibrado de qIgE-PG utilizando diferentes anticuerpos de detección (B).

*No existen diferencias estadísticamente significativas. ** Existen diferencias estadísticamente significativas.

Otra estrategia planteada para incrementar la sensibilidad del ensayo consistió en utilizar un anticuerpo primario sin marcar y un anticuerpo secundario marcado con HRP. Este formato de ensayo no es válido con Omalizumab y FcεR1 como anticuerpo de detección, ya que en el caso de Omalizumab, el anticuerpo secundario (Anti-IgG humana)

interaccionaría con los anticuerpos presentes en la muestra y en el caso de Fc ϵ R1, no se disponía de anticuerpos secundarios marcados.

La evaluación de las prestaciones de esta estrategia de ensayo se llevó a cabo optimizando las concentraciones de los anticuerpos de detección. Este proceso de optimización consistió, en primer lugar, en mantener constante la concentración de anticuerpo secundario (1/200) y variar la concentración de anticuerpo primario en un rango de concentraciones (0.1-10 mg/L). Una vez seleccionada la concentración de anticuerpo primario, se estudió el efecto de la dilución de anticuerpo secundario en un rango de 1/50-1/1600.

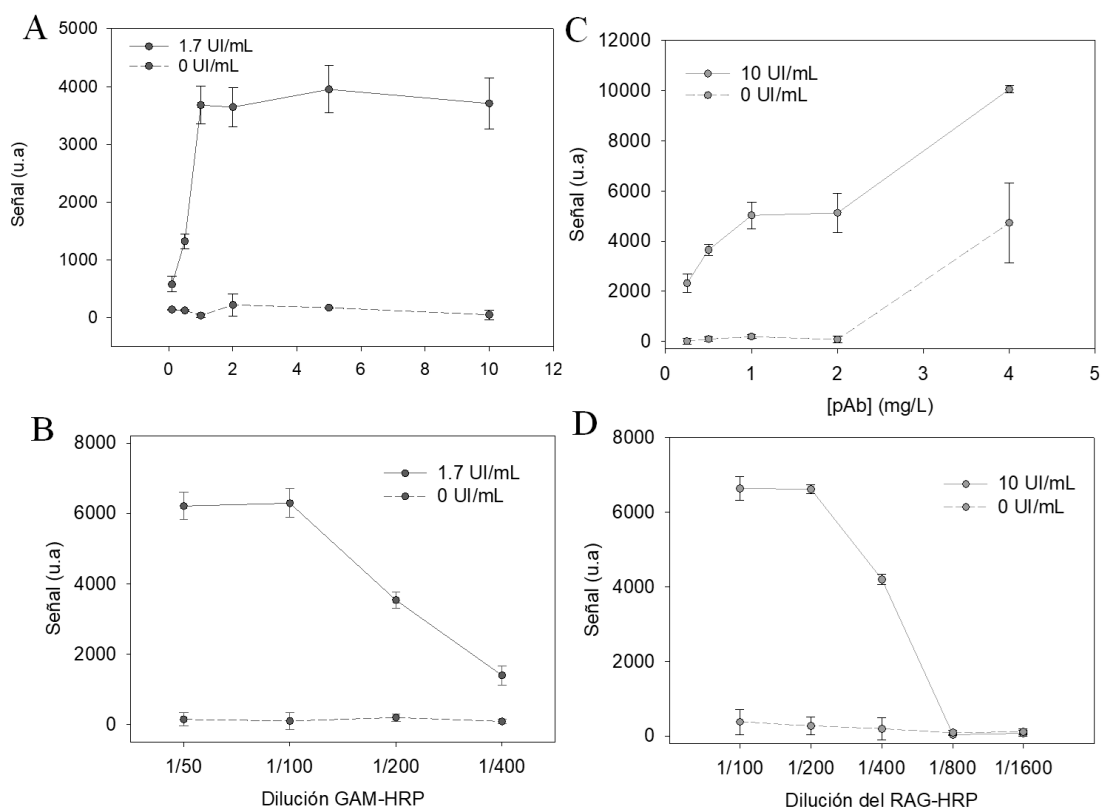


Figura 45. Titulación de la concentración anticuerpo primario (mAb (A) y pAb (C)) y secundario (GAM-HRP (B) y RAG-HRP (D)) en un ensayo de determinación de IgE de cuatro etapas.

Como se observa en la Figura 45A, la señal analítica aumentó conforme se incrementó la concentración de anticuerpo primario (mAb) hasta alcanzar la máxima señal a la concentración de 1.0 mg/L. A continuación, se estudió el efecto de la dilución de anticuerpo secundario en la señal analítica (Figura 45B). En este caso la señal se

mantiene constante hasta una dilución 1/100, dilución a partir de la cual la señal disminuía drásticamente. Por ello, se seleccionó 1/100 como concentración óptima de anticuerpo secundario.

En el ensayo de titulación de anticuerpo policlonal primario (pAb) (Figura 45C), se observó que, al igual que ocurre en el caso anterior, los mejores resultados de S/R se obtuvieron a 1 mg/L. Finalmente, se estudió el efecto de la dilución de anticuerpo secundario (RAG-HRP). Como se muestra en la Figura 45D, las diluciones 1/100 y 1/200 fueron las que mayor señal específica neta mostraron. En base a estos resultados se seleccionó la dilución 1/200 por presentar una mayor reproducibilidad y un menor consumo de reactivo en el ensayo.

Una vez seleccionadas las concentraciones y diluciones de los anticuerpos, se evaluó la sensibilidad analítica de los ensayos con los tres pares de anticuerpos de detección seleccionados. Para ello, se realizaron tres curvas de calibrado, cada una de ellas con un par de anticuerpos de detección distintos (mAb1/GAM-HRP, mAb2/GAM-HRP, pAb/RAG-HRP) utilizando la IgE quimérica como patrón de calibración (Figura 46).

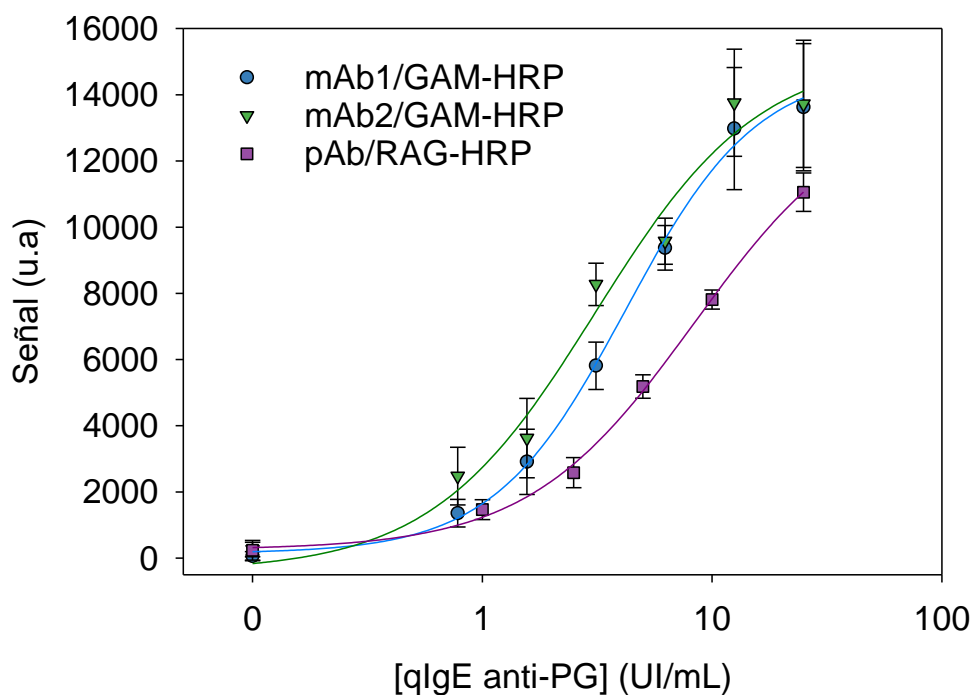


Figura 46. Curvas de calibrado obtenidas en un ensayo indirecto de cuatro etapas con los diferentes anticuerpos de detección.

Los resultados obtenidos mostraron que el ensayo que utiliza el par de anticuerpos pAb/RAG-HRP mostró peor sensibilidad que los obtenidos con las otras dos parejas, siendo su LOD y EC50 de 0.86 y 2.65 UI/mL, respectivamente. En cuanto a las parejas de anticuerpos monoclonales como primarios, ambas presentaron una buena sensibilidad, siendo el LOD 0.35 y 0.40 UI/mL para el ensayo realizado con los pares mAb2/GAM-HRP y mAb1/GAM-HRP, respectivamente.

A pesar de que no hay diferencias significativas entre ambos ensayos, se observó que el binomio mAb2/GAM-HRP daba lugar a falsos positivos cuando se analizaron muestras de suero, revelando que el anticuerpo mAb2 interacciona con algún interferente del suero (Figura 47).

Comparando la sensibilidad, en términos de LOD, se observó que el ensayo de cuatro etapas utilizando el par de anticuerpo mAb1/GAM-HRP presenta 1.9 veces mayor sensibilidad que el realizado con el sistema biotina-STV.

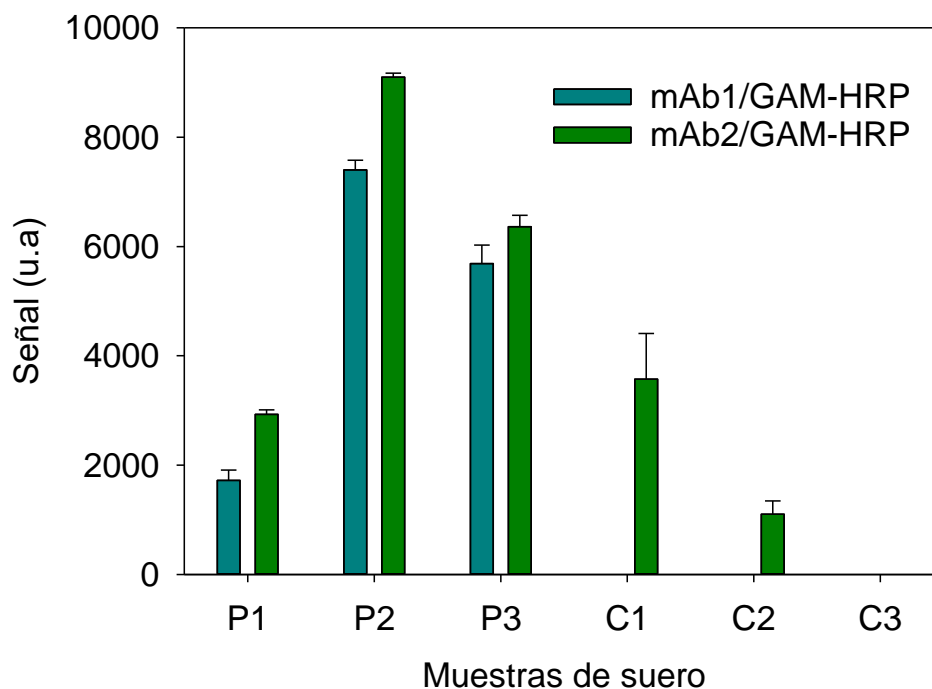


Figura 47. Resultados del análisis de muestras de pacientes alérgicos (P) y controles (C) con el ensayo indirecto de cuatro etapas.

4.1.3.2. Ensayo reverso

En la bibliografía se ha descrito que los ensayos de determinación de IgE pueden presentar reactividad cruzada con otras inmunoglobulinas presentes en suero como la IgG.²²⁹ La interacción de estas biomoléculas con los antígenos inmovilizados en la superficie, reduce el nivel de reconocimiento específico de la IgE ya que se encuentra en menor proporción en el suero sanguíneo. Para solucionar este inconveniente, algunos autores han optado por la depleción parcial del suero, eliminando proteínas y otros anticuerpos como IgG e IgM. Esta estrategia ha mostrado ser útil, ya que ha mejorado la sensibilidad analítica y clínica de los ensayos de determinación de IgE.²³⁰ Sin embargo, este tipo de estrategias provoca una dilución de la muestra, con la consiguiente disminución de la concentración de IgE.

Otra estrategia que palió este inconveniente es el uso de un ensayo reverso. Este ensayo se fundamenta en inmovilizar sobre la superficie un anticuerpo de captura de IgE. Esta estrategia permite eliminar la posible interacción de otras biomoléculas de la muestra con el antígeno.

Para poner a punto este formato de ensayo, en primer lugar, se llevó a cabo la biotinylación del antígeno, siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.3.3.2 de Materiales y Métodos y seguidamente, se realizó un estudio de condiciones del ensayo. Para ello, se llevó a cabo una titulación de antígeno biotinilado manteniendo constante la concentración de STV-HRP (1/100) y posteriormente la titulación de STV-HRP a la concentración óptima de antígeno biotinilado, siguiendo el ensayo reverso (sección 3.6.4 de Materiales y Métodos) y utilizando mAb(1) (20 mg/L) y qIgE anti-PG (0 y 17 UI/mL), como anticuerpo de captura y calibrador, respectivamente.

Como se observa en la Figura 48A, la concentración de antígeno biotinilado que mayor señal originó fue 1.0 mg/L. Un aumento o disminución de la concentración del antígeno generó una disminución de la señal. En el caso de la titulación de STV-HRP la señal se mantuvo constante hasta una dilución 1/2000, dilución a partir de la cual la señal neta se reducía significativamente (Figura 48B).

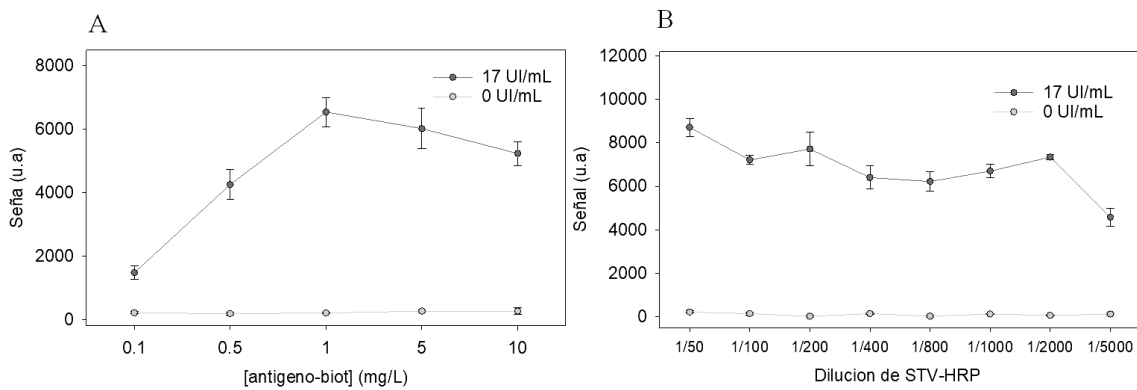


Figura 48. Titulación de la concentración de antígeno biotinilado (A) y STV-HRP (B) de un ensayo reverso de determinación de IgE.

Una vez seleccionadas las condiciones del ensayo, se evaluó la concentración de anticuerpo de captura. Para ello, sobre la superficie del DVD se inmovilizaron 20 mg/L de los anticuerpos mAb1, mAb2, Omalizumab y pAb, y seguidamente sobre la superficie se realizó el ensayo utilizando diferentes diluciones de IgE quimérica (0 - 17 UI/mL). El ensayo con mayor sensibilidad se obtuvo utilizando mAb1 como anticuerpo de captura, alcanzando un LOD y EC50 de 1.9 y 6.0 UI/mL respectivamente (Figura 49). El resto de anticuerpos estudiados presentaron un LOD y EC50 superior a 2.0 UI/mL y 8.0 UI/mL respectivamente.

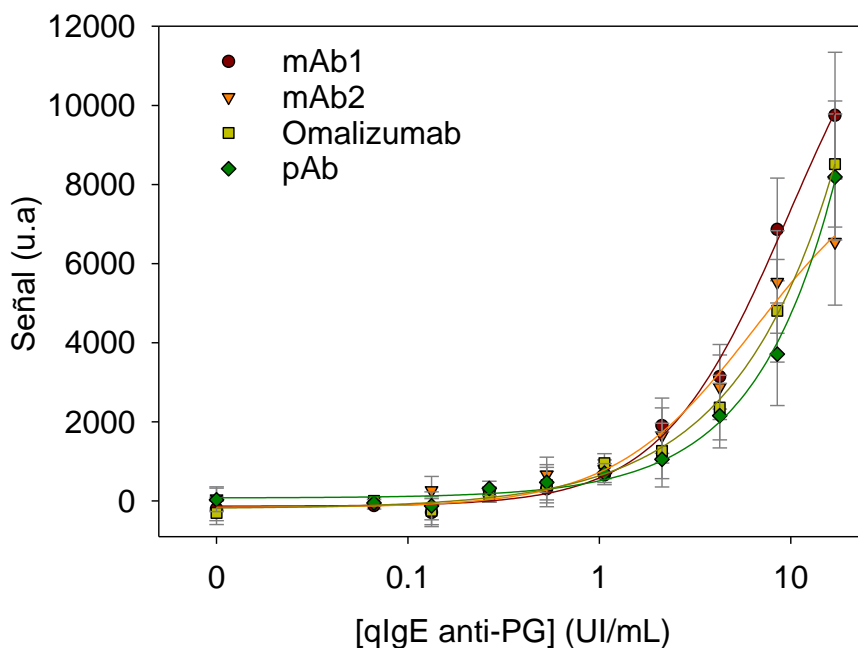


Figura 49. Sensibilidad obtenida en el ensayo reverso de detección de IgE específica con cada uno de los cuatro anticuerpos de captura utilizados.

Al comparar la sensibilidad del ensayo reverso con la del ensayo indirecto de cuatro etapas, se observó que el ensayo reverso presentó un LOD 7 veces más alto que el indirecto. Esta baja sensibilidad pudo deberse, por un lado, a que la conjugación de los haptenos β -lactámicos y el marcaje con biotina se realizan a través del mismo grupo funcional de la proteína, por lo que el antígeno generado tras la conjugación posiblemente presente pocos grupos amino libres que puedan interaccionar con la biotina, dando lugar a un bajo rendimiento de biotinilación, y, por otro lado, al rendimiento en la captura de IgE específica. Para comprobar esta hipótesis se planteó un ensayo que consistió en añadir diferentes cantidades de IgE total (0-1300 UI/mL) a una muestra con 10 UI/mL de qIgE anti-PG. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 50.

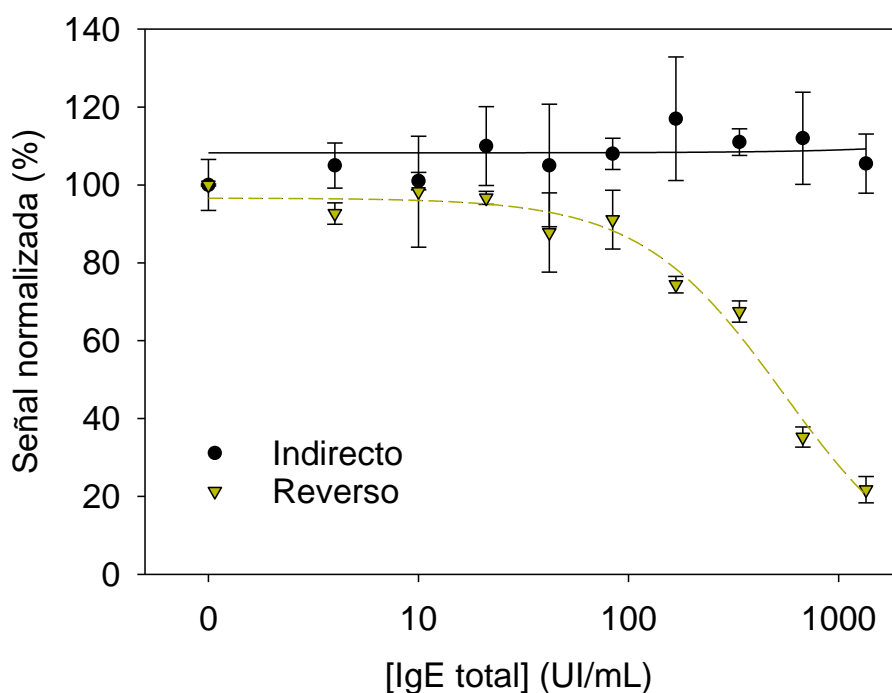


Figura 50. Evaluación del efecto de la concentración de IgE total en la determinación de IgE específica.

En el ensayo indirecto, la señal no se vio influenciada por la cantidad de IgE total en el rango de concentración estudiado. Sin embargo, en el ensayo reverso, se observó que ésta se mantenía constante hasta una concentración de tIgE de 84 UI/mL ($p = 0.39$). Concentraciones por encima de este valor producían una disminución de la señal de reconocimiento ($p < 0.05$), siendo 500 UI/mL la concentración que provocaba un 50 % de reducción de señal. Este efecto probablemente sea consecuencia de la saturación del anticuerpo de captura por exceso de IgE, bloqueando los sitios de unión de la IgE

específica. En base a estos resultados se concluyó que este formato de ensayo se ve significativamente influenciado por el nivel de IgE total presente en suero lo que afecta directamente a la sensibilidad y la cuantificación de la sIgE.

4.1.3.3. Recapitulación

La Tabla 13 muestra un resumen de las prestaciones analíticas y características de los ensayos de determinación de IgE específica estudiados.

Como se observa en la tabla, un aumento del número de etapas en el ensayo indirecto mejoró considerablemente la sensibilidad, manteniendo constantes los tiempos del ensayo y la reproducibilidad. En base a estos resultados el ensayo indirecto de cuatro etapas con el par de anticuerpo mAb1/GAM-HRP fue el seleccionado para la determinación de IgE específica a β -lactámicos en muestras de suero humano.

Tabla 13. Características analíticas de los ensayos desarrollados para la determinación de IgE específica.

Formato	Etapas	Especie detectora	Tiempo	LOD (UI/mL)	LOQ (UI/mL)	RSD (%)
Indirecto	3	pAb-HRP	75'	1.1	2.4	8 – 30
Indirecto	4	mAb1/ STV-HRP	75'	0.8	1.8	8 – 30
Indirecto	4	mAb1/ GAM-HRP	75'	0.4	1.0	14 – 31
Reverso	4	Ag-biot/ STV-HRP	75'	1.9	4.9	16 – 36

4.2. Puesta a punto del ensayo de IgE total

Un sistema cuantitativo debe proporcionar los resultados en unidades relacionadas con un patrón internacional validado. Actualmente no existen patrones de calibración de IgE específica por lo que el método de calibración más aceptado se basa en la interpolación de las señales obtenidas en el ensayo de IgE específica en una curva de calibrado de IgE total que utiliza un patrón validado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Este tipo de calibración heteróloga se emplea en los principales sistemas cuantitativos de diagnóstico *in vitro* de alergia a fármacos.

La calibración heteróloga se realiza con un inmunoensayo tipo sándwich, inmovilizando sobre la superficie un anticuerpo de captura específico a la Fc de la IgE. La puesta a punto del ensayo de IgE total pasa por estudiar, en primer lugar, las condiciones de inmovilización, en lo que se refiere a concentración, pH del medio, y selección del anticuerpo de captura.

La concentración de impresión del anticuerpo de captura se determinó inmovilizando sobre la superficie del disco compacto diferentes concentraciones de Omalizumab (10 - 40 mg/L). Seguidamente, se realizó el ensayo de cuatro etapas, utilizando como calibrador concentraciones crecientes del patrón IgE total validado por OMS (0-25 UI/mL) diluido en PBST. Las señales obtenidas para cada una de las concentraciones evaluadas se representaron frente a la concentración de IgE total, y se ajustaron con un modelo logístico de 4 parámetros.

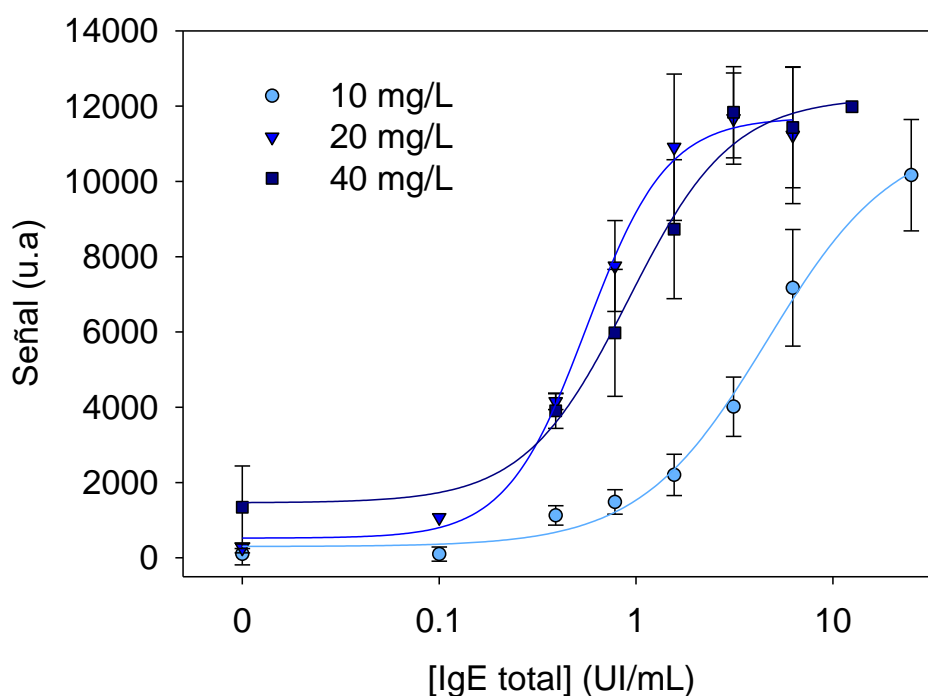


Figura 51. Efecto de la concentración del anticuerpo de captura en la sensibilidad del ensayo.

Como se observa en la Figura 51, las mejores prestaciones analíticas se obtuvieron inmovilizando 20 mg/L de anticuerpo de captura, siendo el LOD y EC50 de 0.06 y 0.56 UI/mL, respectivamente. Un aumento de la concentración de impresión dio lugar a un incremento del LOD y EC50, 0.55 y 0.92 UI/mL, respectivamente, provocado por la

aparición señal inespecífica en el blanco. Por el contrario, la inmovilización de 10 mg/L produjo una disminución en la sensibilidad en el ensayo, alcanzando un LOD y EC50 de 0.49 y 4.6 UI/mL, respectivamente. En base a estos resultados se seleccionó 20 mg/L como concentración óptima de impresión del anticuerpo de captura.

Paralelamente, se realizó la selección del tampón de impresión. Para ello se inmovilizó sobre la superficie mediante adsorción pasiva 20 mg/L de anticuerpo de captura (Omalizumab) preparado en tampón carbonato pH 9.6 y PBS 1X pH 7.4 y se realizó el ensayo indirecto de cuatro etapas como en el caso anterior. Como se observa en la Figura 52 los mejores resultados se obtuvieron utilizando PBS 1X pH 7.5 como tampón de impresión, siendo el LOD y EC50 0.06 y 1.5 UI/mL, respectivamente. El uso de tampón carbonato pH 9.5 aumentó la señal inespecífica en el blanco, traduciéndose en un aumento del LOD (3.6 UI/mL). Además, este pH incrementó considerablemente el EC50, alcanzando un valor de 10.2 UI/mL. Consecuentemente, se seleccionó el tampón PBS 1X, pH 7.5 como tampón de impresión.

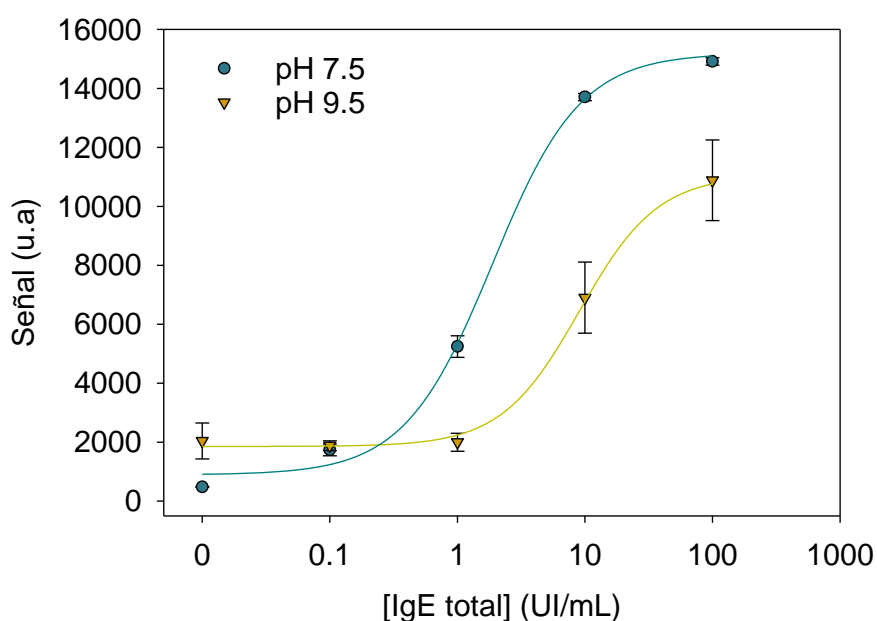


Figura 52. Evaluación del pH del tampón de impresión en la inmovilización del anticuerpo de captura.

Finalmente se realizó un estudio para la selección del anticuerpo de captura. En este ensayo, sólo se evaluaron dos anticuerpos de captura y el receptor Fc ϵ R1, ya que la naturaleza monoclonal del resto de anticuerpos limita su uso al emplear un anticuerpo

secundario anti-ratón de detección. Para llevar a cabo este estudio se inmovilizaron los anticuerpos siguiendo las condiciones anteriormente descritas. El FcεR1 tiene una masa molecular menor ($\sim 40 \text{ KDa}^{231}$) que los anticuerpos por lo que fue necesario realizar una titulación previa de la concentración de inmovilización. Tras evaluar diferentes concentraciones en el rango 10 - 160 mg/L, se seleccionó 80 mg/L como concentración óptima de impresión. Finalmente, los distintos receptores de tIgE fueron evaluados siguiendo el ensayo indirecto de cuatro etapas usando GAM-HRP (sección 3.6.3A de Materiales y métodos).

Como se observa en la Figura 53, El ensayo realizado con la especie de captura FcεR1 exhibió un EC50 de 1.4 UI/mL, 2 veces más alto que el obtenido con los anticuerpos de captura, Omalizumab y pAb, 0.7 y 0.6 UI/mL respectivamente. Sin embargo, aunque estos dos anticuerpos mostraron un EC50 similar, Omalizumab exhibió un LOD 2 veces más bajo (0.06 UI/mL) siendo el mejor anticuerpo de captura, en términos de sensibilidad analítica.

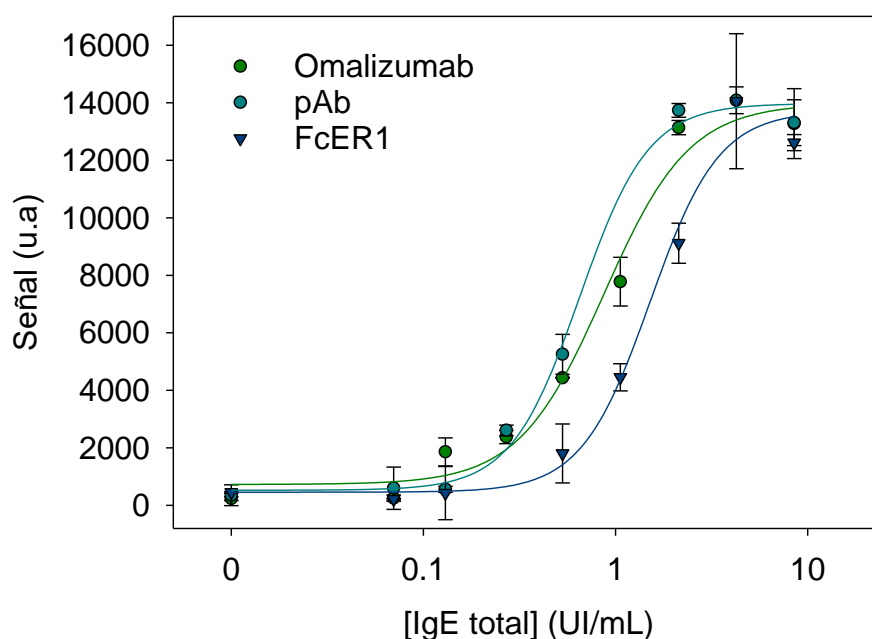


Figura 53. Evaluación de las especies de captura en un ensayo de determinación de IgE total de cuatro etapas.

Tras seleccionar las condiciones de inmovilización y el anticuerpo de captura, se llevó a cabo la calibración con diluciones seriadas (1/4) del patrón de IgE total preparado en PBST ($n = 20$).

Los resultados obtenidos se representaron frente a la concentración y posteriormente se ajustaron a una logística de 4 parámetros con un $r^2 = 0.999$ (Figura 54). Este ensayo de determinación de IgE total mostró una buena sensibilidad analítica, con límite de detección y cuantificación de 0.06 y 0.19 UI/mL, respectivamente, y un amplio intervalo de trabajo (0.06 - 6.25 UI/mL).

La reproducibilidad del ensayo fue dependiente de la concentración y osciló en el rango de 5 – 30 %.

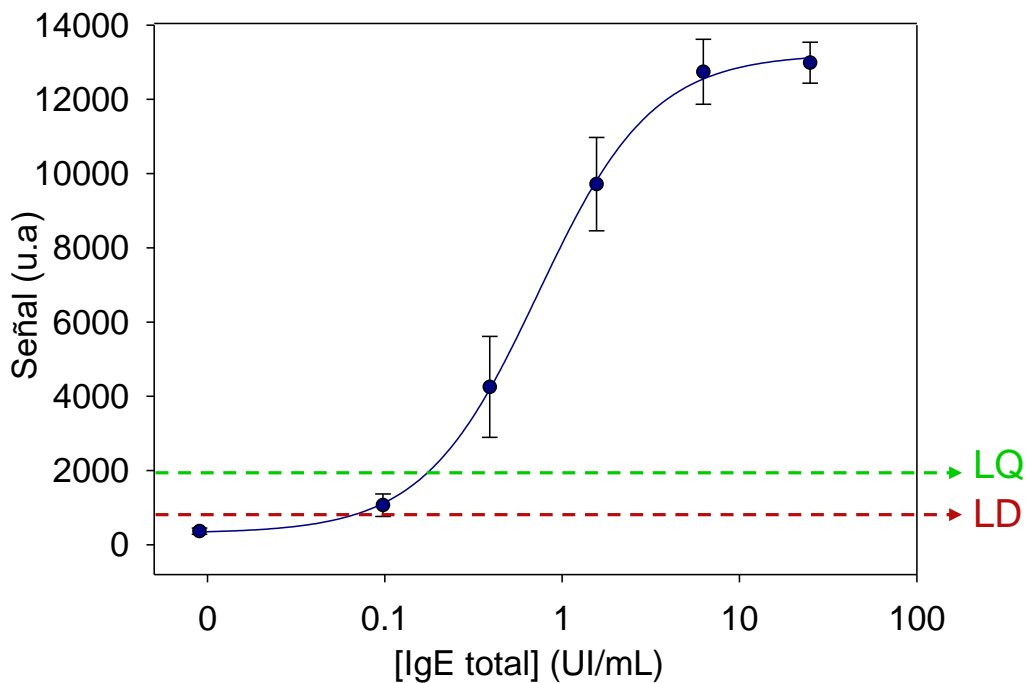


Figura 54. Curva de calibrado heteróloga para la cuantificación de IgE ($R^2=0.999$). Las líneas horizontales delimitan el LOD y LOQ.

4.3. Preparación de antígenos β -lactámicos.

Los antígenos β -lactámicos son de origen variable y pueden dar lugar a patrones de alergia complejos. Teniendo en cuenta que el epítipo está formado por la estructura del antibiótico y una porción de la proteína transportadora implicada en el proceso de sensibilización, la naturaleza proteica que compone el antígeno es clave. Con el fin de evaluar el papel de la proteína transportadora en la sensibilidad del ensayo, el siguiente estudio se centró en preparar antígenos utilizando diferentes proteínas transportadoras y evaluar la capacidad de reconocimiento de la IgE de los pacientes alérgicos.

Para la producción de estos antígenos se utilizó como modelo, el hapteno resultante de la lisis del anillo β -lactámico ya que es el metabolito principal de estos antibióticos y por lo tanto es considerado el epítipo mayor.

Las moléculas transportadoras utilizadas en este estudio han sido: la proteína azul (hemocianina derivada de moluscos), proteína comúnmente utilizada como transportador en procesos de inmunización por su elevado número de grupos reactivos, la PLL, polipéptido transportador utilizado en las pruebas de diagnóstico *in vitro* a β -lactámicos, la inmunoglobulina G, proteína mayoritaria del suero humano implicada en el proceso de sensibilización, la HSA que al igual que la anterior, se encuentra en elevadas proporciones en el suero humano y está relacionada con procesos de sensibilización, y la histona H1, proteína intracelular con mayor número de residuos de lisina. En la Tabla 14 se recogen las principales características de los compuestos estudiados como transportador.

Tabla 14. Características de los compuestos utilizados como transportador.

Transportador	Masa molecular (KDa)	Residuos de lisina	ratio NH ₂ /KDa	Concentración en suero humano (mg/mL)
Proteína azul (BP)	8000	900	0.1	-
Poli-L-lisina (PLL)	15 - 30	100 - 200	6.7	-
Inmunoglobulina G (IgG)	160	80	0.5	10
Albúmina de Suero humano (HSA)	66	60	0.9	40
Histona (H1)	21.5	63	2.9	-

En primer lugar, se estudió el efecto de la relación molar de conjugación para cada una de las proteínas ensayadas en el reconocimiento IgE/antígeno, ya que como se muestra en la Tabla 14, estas proteínas son de masa molecular y número de lisinas variable. En este contexto se prepararon antígenos con relaciones molares hapteno/transportador variables (30 – 1.000.000), siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.3.2.1.

La selección de la relación molar de conjugación óptima se realizó atendiendo a las señales de reconocimiento obtenidas tras la evaluación de diluciones seriadas (1/2) de

una muestra de suero humano con elevada concentración de IgE específica anti-PG (9.6 UI/mL), utilizando el ensayo indirecto de cuatro etapas usando GAM-HRP (sección 3.6.3A de Materiales y métodos). Estas diluciones seriadas se prepararon utilizando como diluyente un suero control preparado a partir de 16 sueros de individuos negativos.

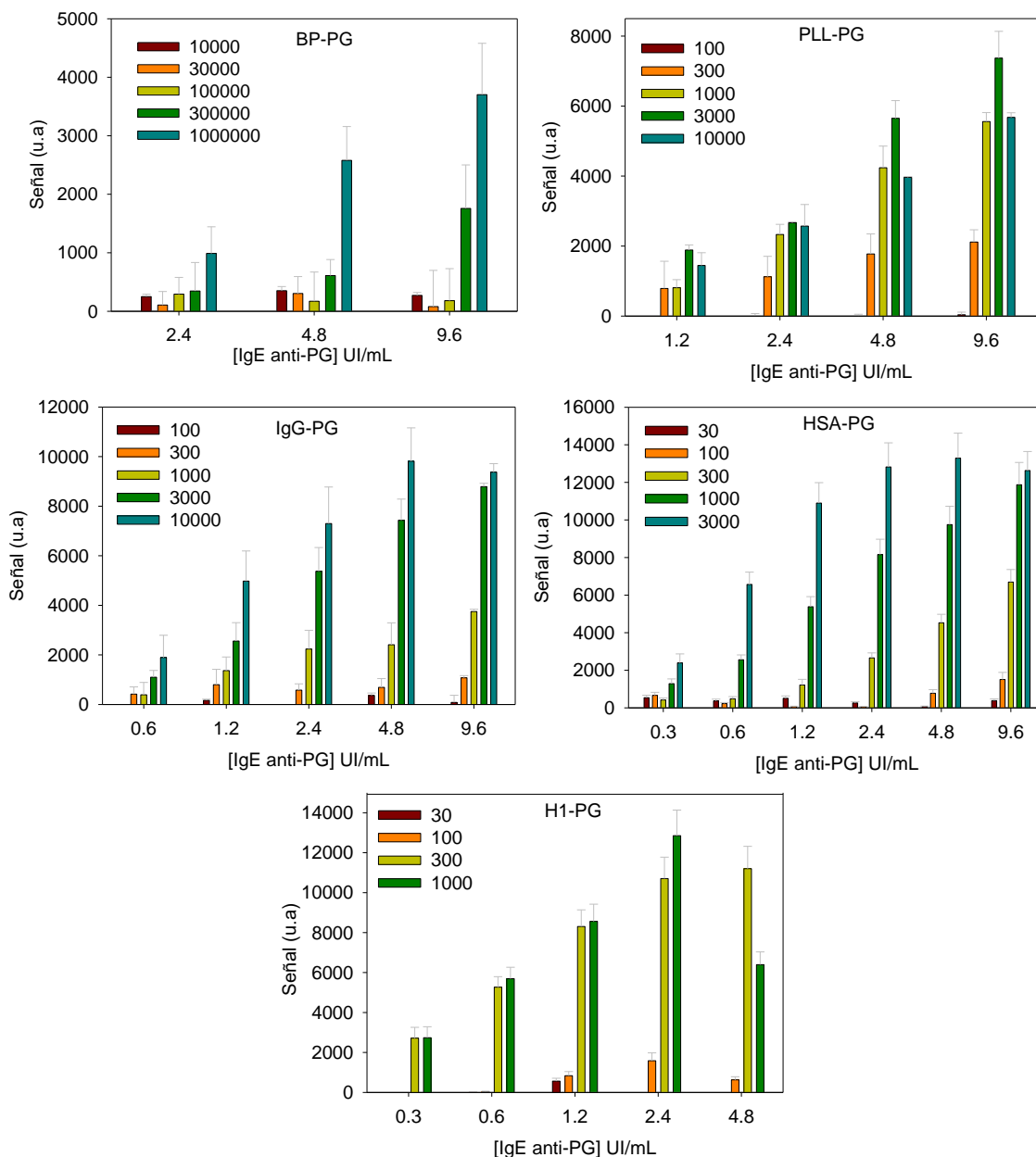


Figura 55. Efecto de la relación molar (β -lactámico/proteína) en el reconocimiento de la IgE específica para los antígenos derivados.

Como se observa en la Figura 55, la señal analítica asociada al reconocimiento antígeno-IgE aumenta conforme incrementó la relación molar empleada en la

conjugación hasta alcanzar el máximo (relación molar de saturación). Una relación molar por encima de este valor no provocó un aumento en las señales, no mejorando por lo tanto el reconocimiento antígeno-IgE. En algunas ocasiones como para la BP, IgG o HSA no fue posible alcanzar esta relación molar de saturación ya que se había alcanzado el límite de solubilidad del antibiótico en las condiciones de conjugación.

En base a las señales máximas obtenidas para cada una de las concentraciones de sIgE evaluadas se seleccionó la relación molar de conjugación. Esta relación molar varió entre los transportadores empleados, siendo 1.000.000, 3000, 10.000, 3000, 300, para la BP, PLL, IgG, HSA y H1, respectivamente. Las elevadas reacciones molares obtenidas indican que el rendimiento de la reacción de conjugación es bajo, ya que hubo que añadir en la mayoría de los casos un exceso de hapteno, más de 50 veces.

Establecida la relación molar óptima, se realizaron curvas de calibrado utilizando cada uno de los antígenos preparados. Para ello, se representó la intensidad de las señales obtenidas frente a la concentración de IgE específica anti-PG. Los resultados obtenidos para cada uno de los antígenos ajustados a una logística de cuatro parámetros se representan en la Figura 56 y en la Tabla 15.

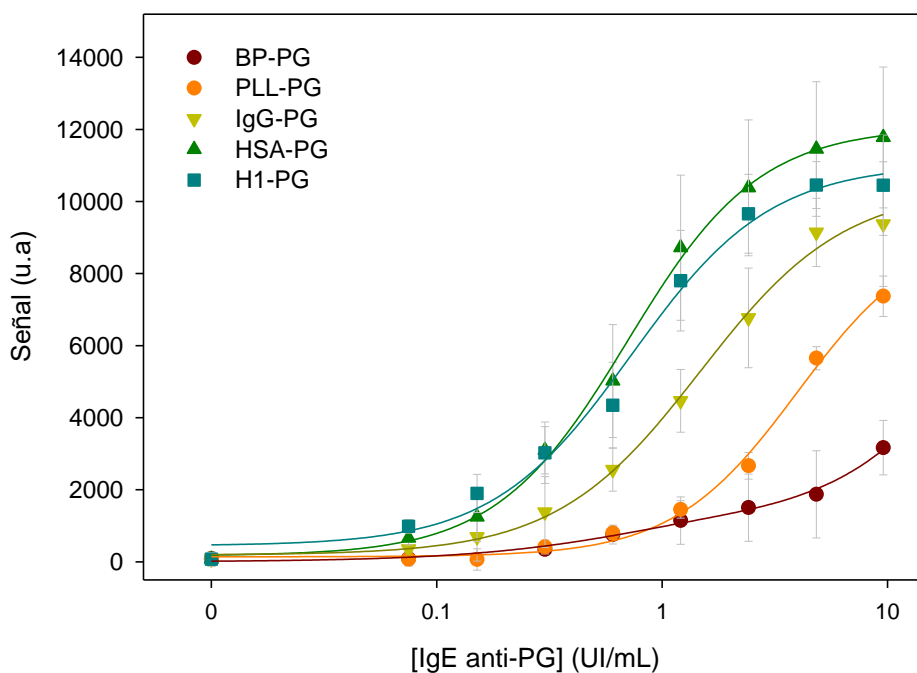


Figura 56. Curva de calibrado para los 5 antígenos de PG seleccionados.

En base a la sensibilidad del ensayo establecida en términos de límite de detección y EC50, se puede afirmar que, aunque la proteína azul es la proteína con mayor número de amino libre (900), fue con la que se obtuvo el ensayo de menor sensibilidad, con un LOQ de 4.7 UI/mL. Esta baja capacidad de reconocimiento de sIgE puede ser debida a que su elevada masa molecular (8000 KDa) disminuye el ratio hapteno/superficie y, por lo tanto, hay un menor número de epítomos accesibles. Por lo tanto, se evidenció que, no es un buen candidato para la preparación de antígenos.

Resultados similares se obtuvieron con PLL, si bien el ensayo presentó mejor sensibilidad (límite de cuantificación 1.7 UI/mL), ésta fue insuficiente atendiendo a los niveles de IgE específica que se encuentran habitualmente en pacientes alérgicos a estos fármacos. La baja sensibilidad obtenida con este polímero de lisinas es destacable ya que es considerado el transportador de referencia en las pruebas *in vitro* actuales.

Los ensayos desarrollados utilizando IgG humana conjugada con PG permitieron cuantificar IgE específica a unos niveles límite de 0.5 UI/mL, concentración ligeramente superior al punto de corte, 0.35 UI/mL, del método de referencia (ImmunoCAP). Por otro lado, los ensayos puestos a punto utilizando HSA y H1 como transportadores alcanzaron un límite de cuantificación de 0.2 UI/mL. Consecuentemente, se seleccionaron ambos antígenos para el análisis de las muestras de suero e identificación de pacientes alérgicos.

Tabla 15. Resumen de las prestaciones analíticas de los ensayos desarrollados utilizando los cinco antígenos estudiados.

PG-lloyl-transportador	LOD (UI/mL)	LOQ (UI/mL)	EC50 (UI/mL)
Proteína azul	0.5	4.7	Fuera de rango
PLL	0.5	1.7	6.8
IgG humana	0.2	0.5	2.3
HSA	0.1	0.2	0.7
Histona H1	0.1	0.2	0.8

Una vez seleccionadas las condiciones de conjugación, se prepararon antígenos de AMX siguiendo las condiciones establecidas para la PG. Tras la realización del ensayo indirecto de cuatro etapas usando GAM-HRP (sección 3.6.3A de Materiales y métodos) usando como muestra un suero humano con elevada concentración de IgE específica anti-AMX (7.02 UI/mL) se observó que los antígenos de AMX presentaban una respuesta mucho más baja que los antígenos de PG a una concentración de sIgE similar (Figura 57). El bajo reconocimiento obtenido, especialmente en el antígeno formado con HSA, fue probablemente debido a un menor rendimiento de conjugación.

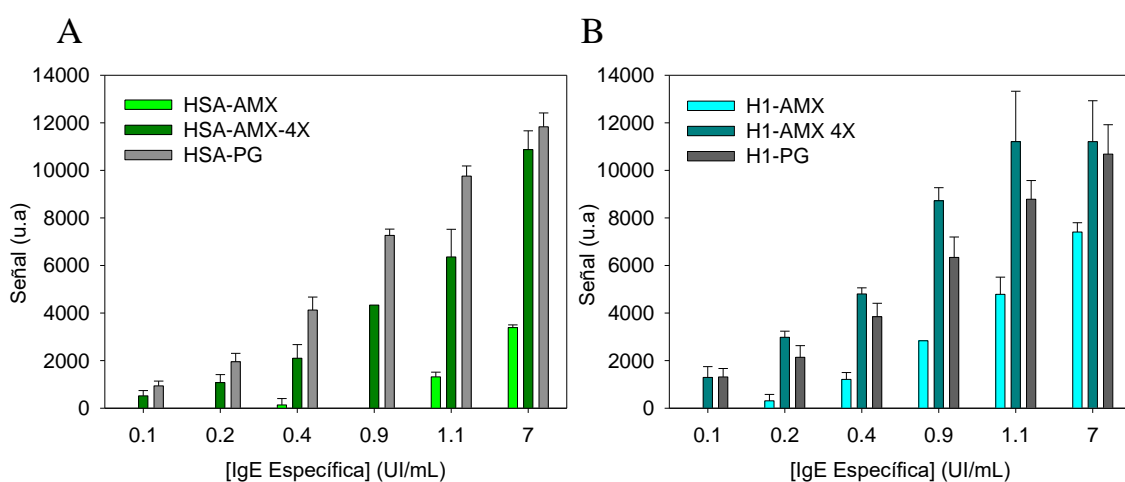


Figura 57. Comparativa del reconocimiento de la IgE por los antígenos de PG y AMX con las proteínas HSA (A) y H1 (B).

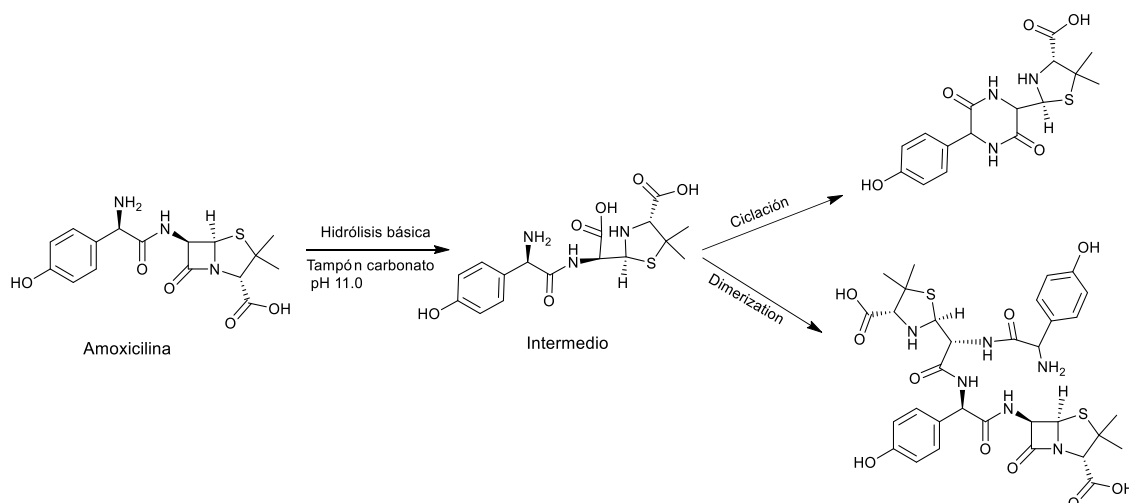


Figura 58. Esquema de reacción de la AMX tras la apertura del anillo β -lactámico.

Si se observa la estructura química de la AMX, ésta exhibe en su cadena lateral una amina primaria. Este grupo funcional puede reaccionar con el carboxilo generado tras la apertura del anillo de su estructura, dando lugar reacciones de ciclación. Alternativamente, el grupo amino puede reaccionar con el grupo carboxilo generado tras la ruptura del anillo de otras moléculas de AMX dando lugar a un proceso de dimerización (Figura 58). Estos procesos secundarios reducen la capacidad de conjugación de la AMX a la proteína transportadora.

Para mejorar este rendimiento de conjugación, se llevó a cabo la adición de AMX recién preparada cada dos horas durante un periodo de 8 horas (H1-AMX-4X y HSA-AMX-4X). Como se observa en la Figura 57, la señal del ensayo utilizando estos antígenos aumentó significativamente, llegando incluso, en el caso del antígeno preparado con histona H1, a mejorar el reconocimiento respecto al antígeno de PG a la misma concentración de IgE.

4.3.1. Caracterización de los antígenos

Los antígenos de HSA y H1 se caracterizaron siguiendo los métodos descritos en la sección 3.4. En primer lugar, se evaluó el porcentaje de conjugación de los antígenos de PG utilizando el método del TNBS que permite cuantificar el número de grupos aminos libres que presenta el transportador antes y después de la conjugación. Así pues, no se puede utilizar cuando el hapteno conjugado presenta en su estructura grupos aminos como es el caso de la AMX.

Como se observa en la Figura 59, el porcentaje de conjugación aumentó conforme creció la relación molar, siendo en los antígenos de HSA, 7, 6, 13, 65, 76 % para las relaciones molares 30, 100, 300, 1000 y 3000, respectivamente. En el caso de los antígenos de H1, los resultados obtenidos fueron similares, 12, 25, 56 y 89 % para 30, 100, 300 y 1000, respectivamente, si bien se observó que el porcentaje de conjugación fue significativamente más alto a relaciones molares más bajas comparado con los resultados obtenidos con los antígenos de HSA.

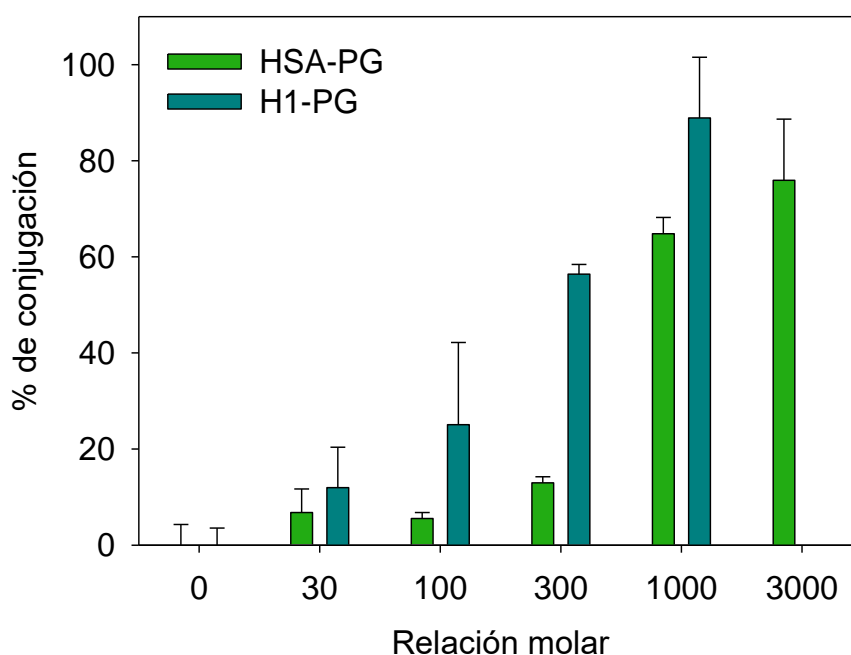


Figura 59. Resultado de la determinación del porcentaje de conjugación para los antígenos de PG utilizando el método del TNBS.

Estos resultados fueron confirmados mediante electroforesis SDS-PAGE, como se muestra en la Figura 60.

Los antígenos de HSA preparados con relaciones molares 30 y 100 (línea 7 y 8), no presentaron diferencias significativas con la proteína sin conjugar (línea 6). Un ligero aumento de la masa molar se observó a las relaciones molares superiores (líneas 9 - 11), alcanzando el máximo a 3000 (línea 11). La banda de la línea 11 se asocia a una masa molecular estimada de 70.000 Da lo que corresponde a un aumento de masa molecular del antígeno de aproximadamente 4000 Da respecto a la masa del transportador. Esto supone una relación molar PG/proteína de 11. Estos resultados revelaron que la eficiencia de conjugación fue baja, (< 1 %). Teniendo en cuenta el número de lisinas que presenta esta proteína (59), y los resultados obtenidos en el TNBS (76 %) cabría esperar que el número de moléculas de penicilina conjugadas fuese mayor. Esto es probablemente debido, a que la mayoría de los grupos lisina no están espacialmente accesibles, dificultando la conjugación de la PG. Si comparamos los resultados obtenidos en este trabajo con los obtenidos por otros autores se observa que el número de moléculas de penicilina conjugada por molécula de HSA fue similar (entre 6 - 8 PG por HSA).

En el caso de los antígenos de H1, se observó que, la proteína sin conjugar (línea 1) mostró dos bandas alrededor de 30 KDa. Esto es debido, por un lado, a su composición estructural que hace que esta proteína corra de manera anómala por el gel, apareciendo en bandas ligeramente superior de lo esperado teniendo en cuenta su masa molecular (21.5 KDa) y, por otro lado, esta proteína es un conjunto de seis isómeros con una secuencia primaria similar. Al igual que ocurría con los antígenos de HSA, los antígenos de H1 de relación molar 30 y 100 (línea 2 y 3) presentaron bandas similares a las de la proteína sin conjugar, mostrando un bajo grado de conjugación, como revelaron los resultados obtenidos con el método TNBS y el bajo reconocimiento obtenido en el ensayo de determinación de IgE (Figura 55). Sin embargo, un aumento en la relación molar produjo una variación considerable de la masa molecular del antígeno. En el caso del antígeno producido a relación molar 300 (línea 4), se observó un aumento de la masa molecular de aproximadamente 10 KDa, que corresponde a 25 - 30 moléculas de penicilina conjugadas por molécula de H1. Un aumento de la relación molar (línea 5), produjo una definición de esa banda evidenciando aún más el incremento de la masa molecular del antígeno.

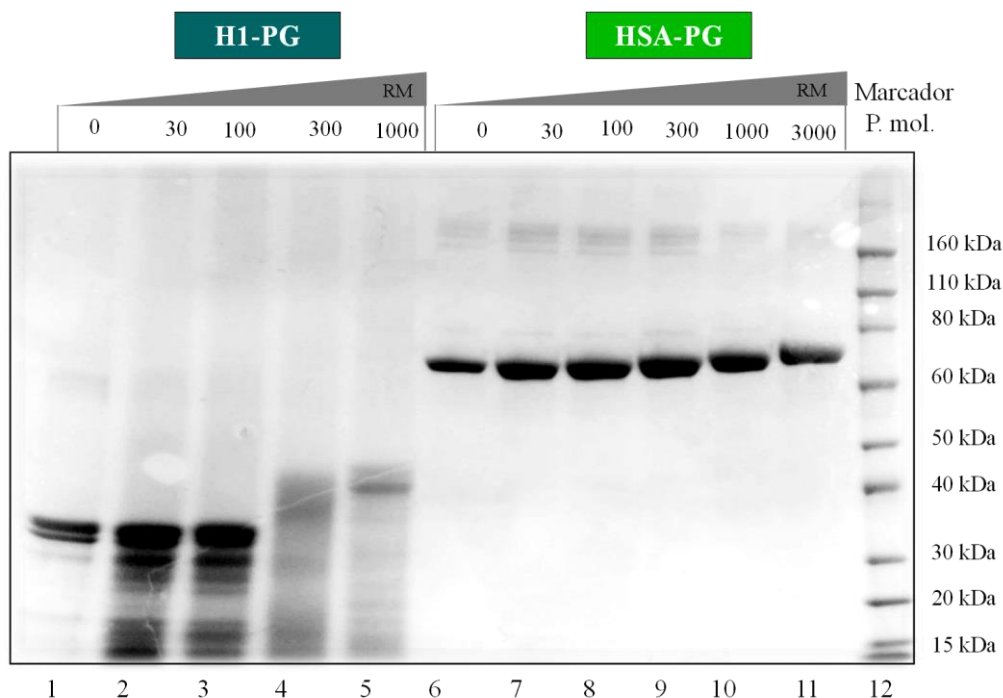


Figura 60. Imagen del gel de electroforesis de los antígenos de HSA-PG y H1-PG preparados a diferentes relaciones molares.

Por otro lado, también se realizó el estudio de caracterización mediante electroforesis para los antígenos de AMX (Figura 61). Como era de esperar, se observó que los antígenos preparados a relación molar 300 y 3000 con H1 y HSA (1x), respectivamente, presentaron un menor aumento de masa molecular, que los antígenos preparados con adiciones sucesivas de AMX recién preparada (4x). Un aumento del número de adiciones (8x) no produjo un mayor aumento en la masa molecular. Al igual que ocurría en el caso de los antígenos de PG, el aumento de la masa molecular del antígeno de H1-AMX-4x fue de 10 KDa, estimándose una modificación de 25-30 residuos de lisina. En el caso del antígeno de HSA, este aumento de la masa molar no fue tan evidente.

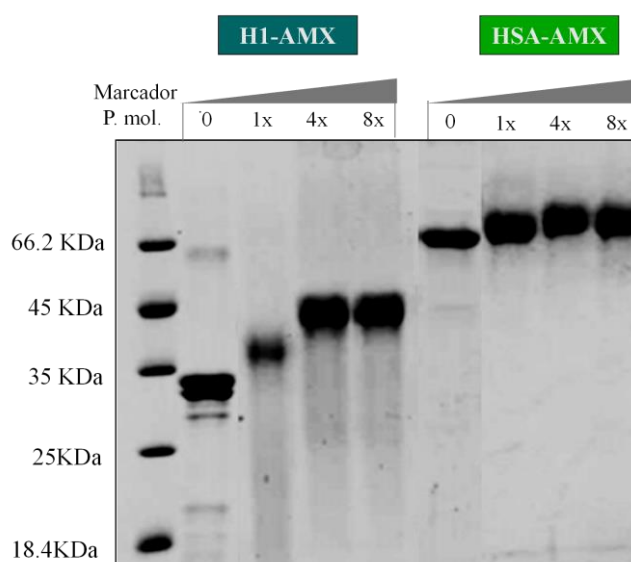


Figura 61. Imagen del gel de electroforesis de los antígenos de HSA-AMX y H1-AMX.

Los antígenos de histona exhiben varias bandas debido a sus diferentes isoformas, como se observa en los geles de electroforesis anteriores. Por ello, se planteó purificar mediante cromatografía de intercambio iónico las poblaciones y así aislar aquellas con mayor número de haptenos unidos.

Los antibióticos β -lactámicos se anclan a las proteínas a través de grupos amino. Esta unión genera un cambio del punto isoeléctrico hacia un pH más ácido. Es por ello que se utilizó la cromatografía de intercambio iónico para purificar las distintas poblaciones de antígeno.

Tabla 16. Valores del pI de los antígenos de HSA y H1.

Proteína	pI teórico	Nº lisinas	Nº Lisinas conjugadas	pI teórico del antígeno
HSA	5.9	60	10	4.9
H1	11.0	63	25	8.5

Basándose en el punto isoeléctrico teórico de los antígenos preparados (Tabla 16), se llevó a cabo la purificación, siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.4.4 de Materiales y Métodos, y utilizando columnas HiTrap S (columna de intercambio catiónico) y HiTrap Q (columna de intercambio aniónico) para el antígeno de histona y HSA, respectivamente.

Al purificar el antígeno H1-PG por cromatografía de intercambio catiónico, se observó que todo el antígeno se encontraba en la fracción no retenida. Este resultado indicó que el antígeno no fue retenido en la columna debido a que su punto isoeléctrico era inferior al tampón de trabajo (7.5). Por lo tanto, el número de moléculas de PG conjugadas debía ser mayor al estimado por electroforesis. Este error en la estimación de la conjugación puede ser consecuencia de que la proteína H1 presenta un patrón electroforético anómalo por su estructura altamente básica. Sin embargo, los antígenos al encontrarse conjugados a estos grupos básicos pueden corregir esta anomalía y correr en función a su masa molecular real.

En base a estos resultados, tanto los antígenos de H1 como los de HSA se purificaron mediante intercambio aniónico. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 62. El antígeno de histona mostró una única banda y el de HSA dos bandas. Sin embargo, la banda perteneciente al antígeno de H1 era más ancha, lo que nos indica un posible solapamiento de poblaciones. Los antígenos de AMX presentaron un comportamiento similar a los antígenos de PG descritos.

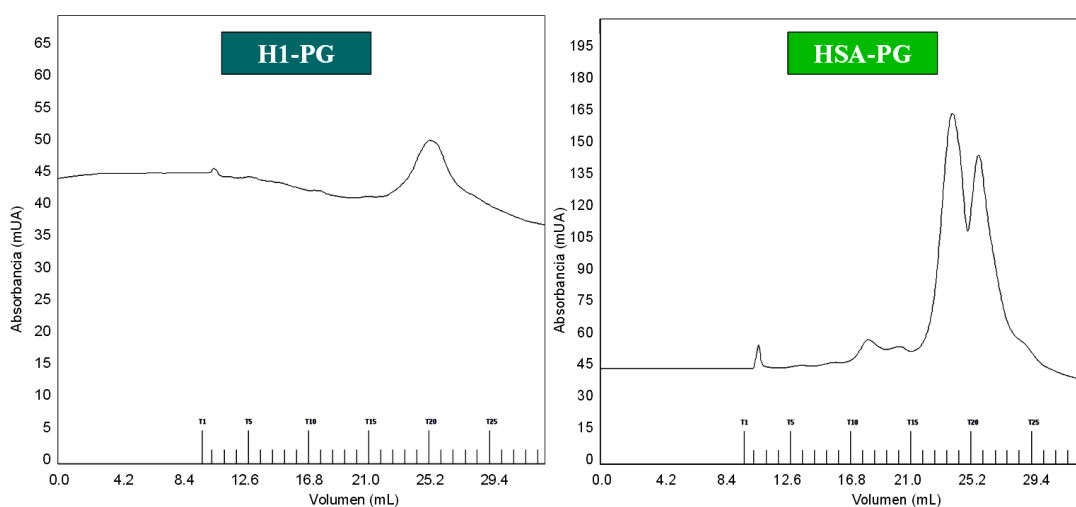


Figura 62. Cromatograma de intercambio iónico de los antígenos H1-PG y HSA-PG por la columna de cromatografía de intercambio iónico.

Con el fin de establecer el patrón de reconocimiento de las diferentes fracciones purificadas (19 - 20 en el caso del antígeno de H1 y 18 - 22 en el caso del antígeno de HSA), éstas se inmovilizaron sobre la superficie del disco y se evaluaron con una muestra con elevada concentración de IgE anti-PG, siguiendo el ensayo indirecto de cuatro etapas usando GAM-HRP (sección 3.6.3A de Materiales y métodos). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 63.

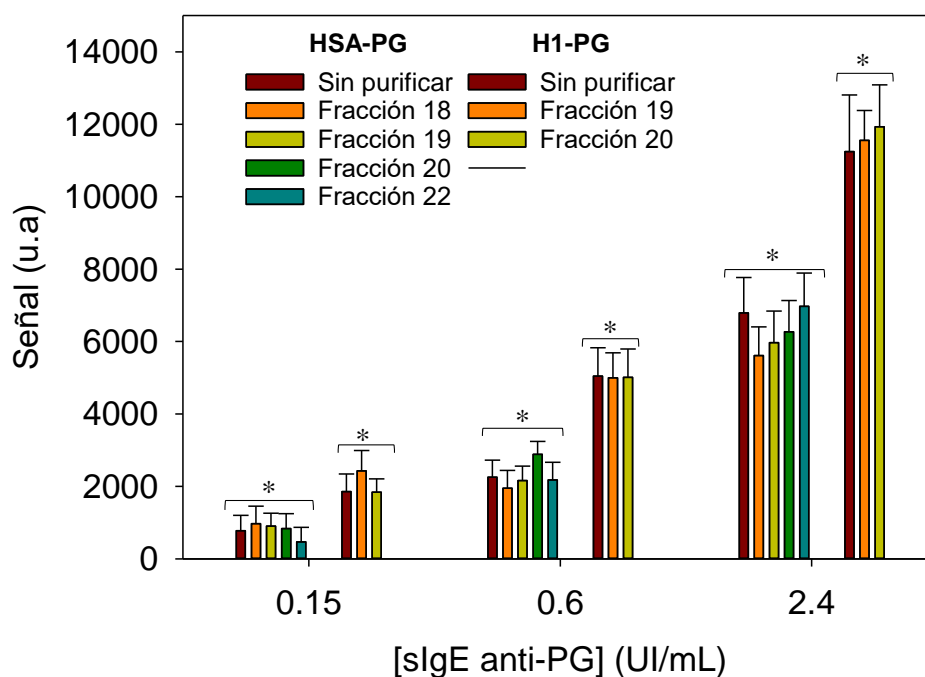


Figura 63. Estudio de la sensibilidad alcanzada con los antígenos purificados.

*No hay diferencias estadísticamente significativas entre poblaciones.

Tras la realización del inmunoensayo se observó que no había diferencias estadísticamente significativas entre las señales de las diferentes fracciones y el antígeno sin purificar. Por lo tanto, al no obtenerse una mejora analítica se procedió a trabajar con el conjunto de poblaciones sin purificar.

La relación molar BL/transportador de los antígenos preparados se calculó también mediante MALDI-TOF. Los antígenos preparados con la proteína HSA (Figura 64 y Tabla 18) presentaron la máxima intensidad a masas moleculares 74.476 y 71.306 Da, para PG y AMX, respectivamente. Esto corresponde a una variación de masa de 7620 Da en el caso de PG y de 4450 Da en el caso de AMX. Por lo tanto, en base a esta diferencia y a los estudios realizados con anterioridad se concluyó que el antígeno de penicilina se encontraba 1.8 veces más conjugado que el de AMX. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el ensayo de reconocimiento (Figura 57A), en el que se observa que antígeno de PG presentó mayor sensibilidad que el antígeno de AMX.

A pesar de que el antígeno de AMX se encuentra menos conjugado, se ha observado que se alcanzó el rendimiento máximo de conjugación para este fármaco, ya que como se comentó anteriormente, un aumento en la relación molar no conllevaba un aumento en la masa molecular del antígeno (Figura 61). Este hecho puede deberse a impedimentos estéricos y repulsión de cargas que puede generar el grupo amino e hidroxilo que presenta este antibiótico en su estructura.

Tabla 17. Relación molar hapteno/HSA de los antígenos β -lactámicos calculada por MALDI-TOF

Antígeno	Masa molecular HSA (Da)	Masa molecular Antígeno (Da)	Diferencia (Da)	Relación molar BL/proteína
HSA-PG	66.856	74.476	7620	21
HSA-AMX	66.856	71.306	4450	12

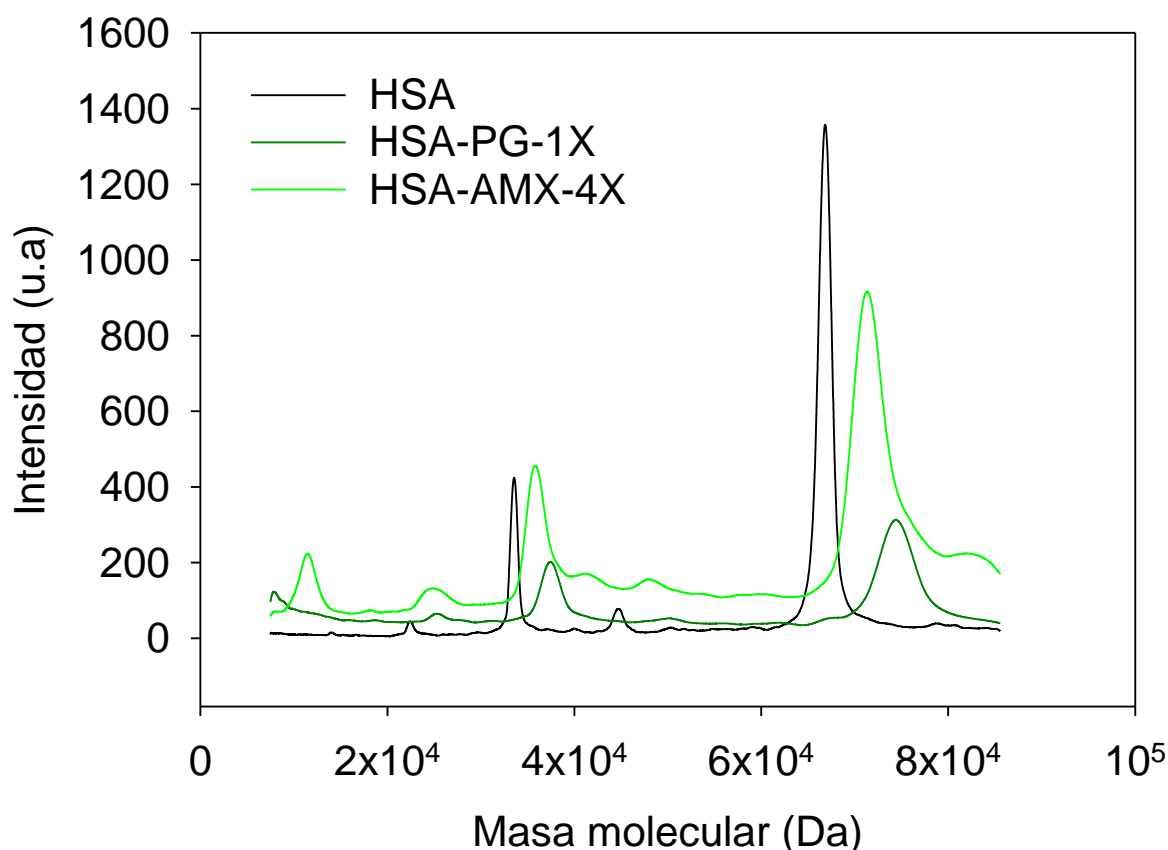


Figura 64. Espectro MALDI-TOF de los antígenos HSA-PG, HSA-AMX y la proteína HSA.

En el caso de los antígenos de H1, la proteína H1 sin conjugar mostró un pico muy intenso a 21.987 Da (Figura 65). Sin embargo, el antígeno H1-PG no exhibió ninguna señal, lo que nos indicó que la morfología de este antígeno evita su vuelo, no pudiendo determinarse su masa molecular mediante esta técnica. El antígeno de H1-AMX-4x, por el contrario, presentó una banda ancha a 39.346 Da provocada por las diferentes poblaciones BL/proteína que conforman el antígeno, como se describió anteriormente. En base a estos resultados se estableció que esta técnica no permite obtener información precisa del grado de conjugación, teniendo que recurrir por lo tanto a otras técnicas.

La proteína H1 no contiene residuos de cisteína a lo largo de su secuencia peptídica. Por lo que no presenta átomos de azufre en su composición elemental. Sin embargo, tanto la PG como la AMX, exhiben en su estructura química un único átomo de azufre en el anillo tiazolidínico, de modo que, se puede estimar el número de haptenos unidos a esta proteína midiendo la variación del porcentaje de azufre en la composición del antígeno.

Para realizar esta evaluación se llevó a cabo el análisis elemental de los antígenos y de la proteína H1 sin modificar, siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.4.6 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 18.

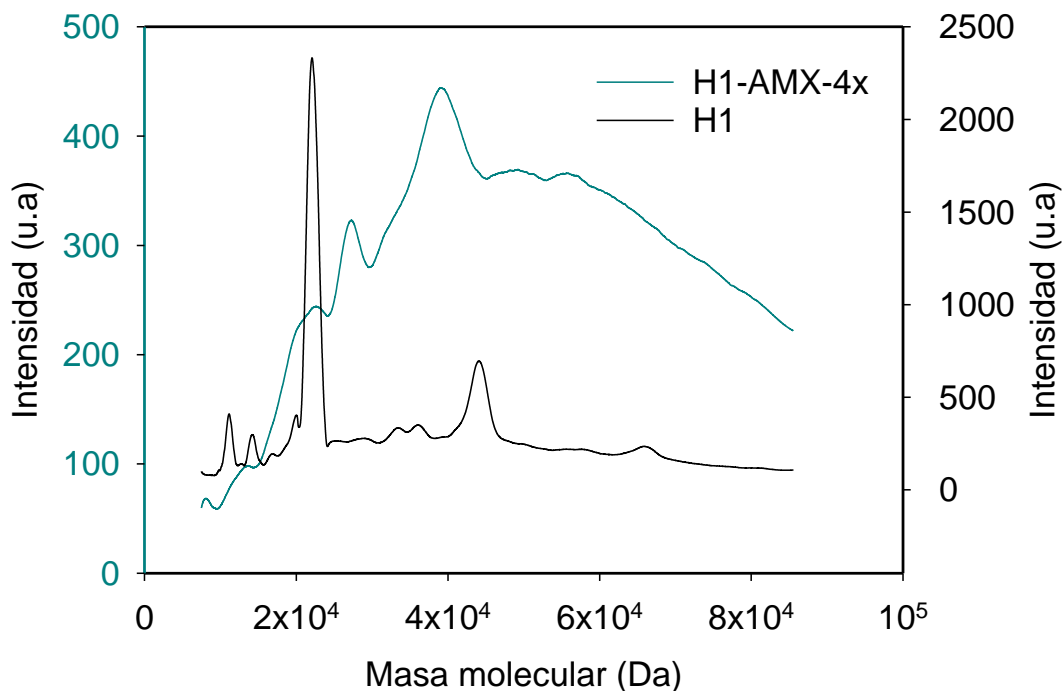


Figura 65. Espectro MALDI-TOF del antígeno H1-AMX y la proteína H1.

Tabla 18. Composición elemental (N, C, H, S) de la proteína H1 y los antígenos H1-PG y H1-AMX-4x.

Antígeno	Masa molecular (Da)	N (%)	C (%)	H (%)	S (%)
H1	21.987	15.2	45.7	7.1	0.0
H1-PG	ND	11.8	48.0	6.3	3.4
H1-AMX	ND	12.4	45.4	6.5	3.2

ND: No determinada

El contenido de azufre en los antígenos de PG y AMX correspondía a una relación molar de 45 y 41, respectivamente, siendo la masa molecular para cada uno de ellos de 41.309 y 41.243 g/mol, respectivamente. Estos datos concuerdan con el bajo punto isoeléctrico de los antígenos (< 7.5) observado en la cromatografía de intercambio iónico, y con los resultados obtenidos mediante las técnicas de electroforesis y MALDI-TOF.

Al comparar el grado de conjugación de los antígenos de H1 y HSA, se observó que los formados con la proteína H1 se encuentran 2.1 y 3.4 veces más conjugados con PG y AMX, respectivamente que los antígenos formados con la proteína HSA.

4.3.2. Reproducibilidad de la preparación de los antígenos

La reproducibilidad en la preparación de antígenos β -lactámicos es clave ya que es importante que el grado de conjugación se mantenga entre los diferentes lotes, para obtener una respuesta homogénea. Para evaluar este parámetro se prepararon 3 lotes de los antígenos H1-PG y H1-AMX-4x, uno por semana, siguiendo el mismo protocolo de conjugación.

Los conjugados de los tres lotes fueron inmovilizados sobre la superficie del disco compacto en formato de micromatriz y evaluados siguiendo el ensayo indirecto de cuatro etapas usando GAM-HRP (sección 3.6.3A de Materiales y métodos). En este estudio se utilizaron diluciones seriadas (1/4) de una muestra representativa y de concentración conocida de IgE específica frente a PG y AMX, siendo ésta 4.37 y 5.09 UI/mL, respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 66.

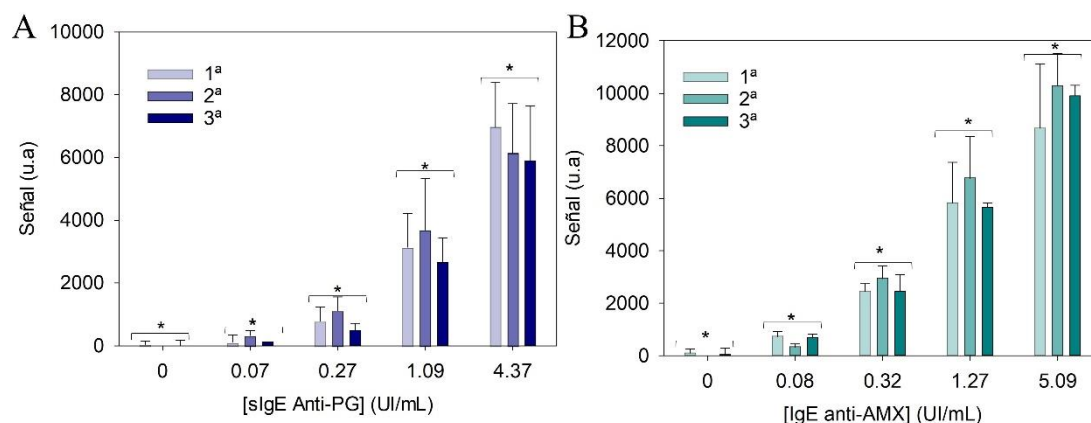


Figura 66. Evaluación de la reproducibilidad de la conjugación de tres lotes de antígenos de PG(A) y AMX(B).

*No hay diferencias estadísticamente significativas.

Como se puede observar, los tres lotes mostraron una respuesta similar para cada una de las concentraciones estudiadas tanto para los antígenos de PG (Figura 66A) como de AMX (Figura 66B). Estos datos se confirmaron con un ANOVA multifactorial de dos

variables, revelando que no existían diferencias estadísticamente significativas entre las señales obtenidas para cada concentración siendo $p > 0.05$, confirmando la buena reproducibilidad en la preparación de los conjugados antigénicos.

4.4. Evaluación y validación de las prestaciones analíticas del ensayo con los antígenos de HSA y H1.

Las prestaciones analíticas del ensayo desarrollado fueron evaluadas con los antígenos de H1 y HSA, determinando la concentración de IgE específica de un conjunto de 101 muestras de suero humano, 52 pacientes alérgicos a AMX y 49 donantes sanos no atópicos. La concentración de IgE específica fue calculada promediando los valores obtenidos al interpolar las señales en la curva de calibrado heteróloga tras analizar cada muestra 10 veces. Los resultados se muestran en las Tablas A2.1 y A2.2.

En relación a la determinación de la IgE específica frente a PG, los ensayos utilizando tanto el antígeno H1 como el HSA detectaron un número similar de pacientes alérgicos, 8 y 7, respectivamente. Sin embargo, en algunas muestras sólo se observó reactividad frente a los antígenos H1, como fue el caso de los pacientes 18, 29 y 41, mientras que la muestra del paciente 49 sólo reaccionó con el antígeno HSA. Además, algunos sueros de pacientes alérgicos que presentaban respuesta frente a los dos antígenos, mostraban un mayor reconocimiento frente al antígeno de H1, como los pacientes 19, y 8, mientras que otros presentaban mayor reconocimiento frente al antígeno de HSA como el paciente 17 y 42. Estos resultados podrían indicar la existencia de dos epítomos o poblaciones de IgE diferentes con distinta afinidad hacia los antígenos, confirmándose de nuevo que la proteína transportadora juega un papel esencial en el reconocimiento antígeno-IgE.

Por otro lado, los resultados relacionados con la determinación de IgE específica a AMX revelaron que el antígeno H1 mostró un resultado positivo en un mayor número de sueros de pacientes que el antígeno HSA, 22 y 7 pacientes alérgicos, respectivamente. Además, los sueros de pacientes que dieron un resultado positivo con el antígeno de HSA, también lo dieron con el de H1, pero con este último la respuesta fue mayor. Estos resultados revelaron que el antígeno H1 muestra una gran similitud estructural con el epítomo principal responsable del proceso de sensibilización. Cabe mencionar que,

algunos pacientes que fueron diagnosticados como negativos en la prueba de punción cutánea, mostraron resultados positivos en el ensayo desarrollado (concentración de IgE específica superior al límite de detección), como fue el caso de los pacientes 21 y 49. Además, otros pacientes como el 17 y 41 fueron negativos a la AMX según las pruebas de punción cutánea, en cambio se detectó IgE específica en suero, lo que apoya el papel complementario de las pruebas *in vitro* para el diagnóstico de alergia a medicamentos. Estos resultados indicaron una buena sensibilidad analítica ya que se permite detectar a pacientes que presentan valores de IgE por debajo del 0.1 UI/mL.

Por otro lado, las 101 muestras analizadas resultaron negativas para los antígenos HSA y H1 de AZT (señal por debajo del LOD), utilizados como controles negativos para comprobar la selectividad de los ensayos. Esta selectividad fue corroborada tras observar que todos los sueros control también mostraron resultados negativos para los antígenos evaluados (Tabla A2.2). La reproducibilidad del ensayo se determinó a partir de la diferencia de la densidad óptica de las réplicas leídas en un mismo array y disco e interdisco (5 discos, 1 array por disco y 2 réplicas por array) y se expresó como desviación estándar relativa (RSD). Las RSD interdisco e intradisco variaron del 5 al 8 % y del 15 al 35 %, respectivamente.

Para validar un método analítico cuantitativo, uno de los parámetros a evaluar, además de la sensibilidad, selectividad y reproducibilidad, es la linealidad del sistema y el intervalo de trabajo. Este estudio consistió en calcular experimentalmente, usando la curva heteróloga anteriormente propuesta, la concentración de IgE específica por disolución seriada (1/2-1/64) de una muestra con 9.6 UI/mL y 7.02 UI/mL de sIgE frente PG y AMX, respectivamente, y comparar los valores de concentración obtenidos con el valor de concentración teórico para cada dilución.

Como se observa en la Figura 67, la concentración de IgE específica tanto de PG como AMX, disminuyó proporcionalmente con la dilución. El porcentaje de recuperación, calculado como el cociente entre [IgE]experimental y [IgE]teórica, para cada una de las diluciones evaluadas se muestra en el recuadro de la Figura 67. Los ensayos con los cuatro antígenos evaluados presentaron para todas diluciones unos buenos porcentajes de recuperación (90 – 117 %), lo cual indica que el método

desarrollado permite la cuantificación de muestras de suero en un amplio rango de concentración de IgE específica.

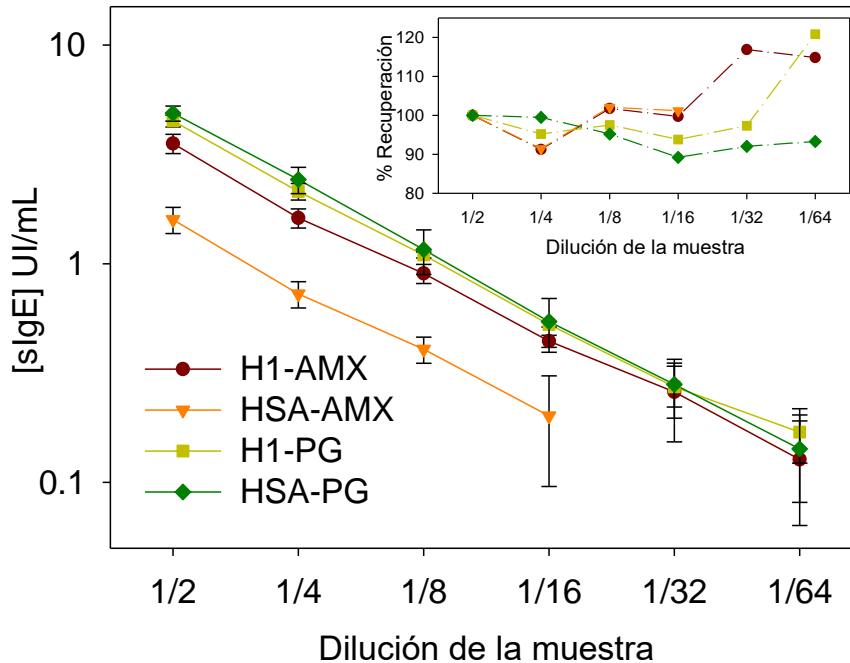


Figura 67. Estudio de linealidad utilizando una muestra positiva de concentración conocida y un conjunto de controles negativos como diluyente. El porcentaje de recuperación para cada dilución representado en la gráfica insertada fue calculado como la relación entre el valor experimental y el valor esperado de acuerdo a la dilución.

Finalmente, se evaluó la exactitud del ensayo calculando el porcentaje de recuperación medio (RM) para cada antígeno, entendiendo como valor verdadero el obtenido con el ensayo ImmunoCAP (Ecuación 5).

$$RM(\%) = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{[sIgE] \text{ obtenido en DVD}}{[sIgE] \text{ según ImmunoCAP}} \times 100}{n} \quad Ec. 5$$

Para ello, se tuvieron en cuenta únicamente aquellas muestras de pacientes que mostraron resultados por encima del límite de detección del ensayo y del sistema de referencia (ImmunoCAP).

La concentración de sIgE obtenida en el ensayo desarrollado en DVD utilizando los antígenos de PG fue considerablemente más baja que la obtenida por el ensayo de referencia, mostrando un valor de recuperación medio de 26 y 27 % para los antígenos

preparados con las proteínas H1 y HSA, respectivamente. Este resultado reveló la baja exactitud del sistema para cuantificar sIgE anti-PG. En el caso de la cuantificación de sIgE a AMX, se observó que el ensayo con el antígeno HSA-AMX mostró una exactitud baja, con un porcentaje de recuperación medio del 35 %, mientras que utilizando el antígeno de H1-AMX-4x, las concentraciones obtenidas se asemejaron más a las del método de referencia, con un porcentaje de recuperación medio del 80 %.

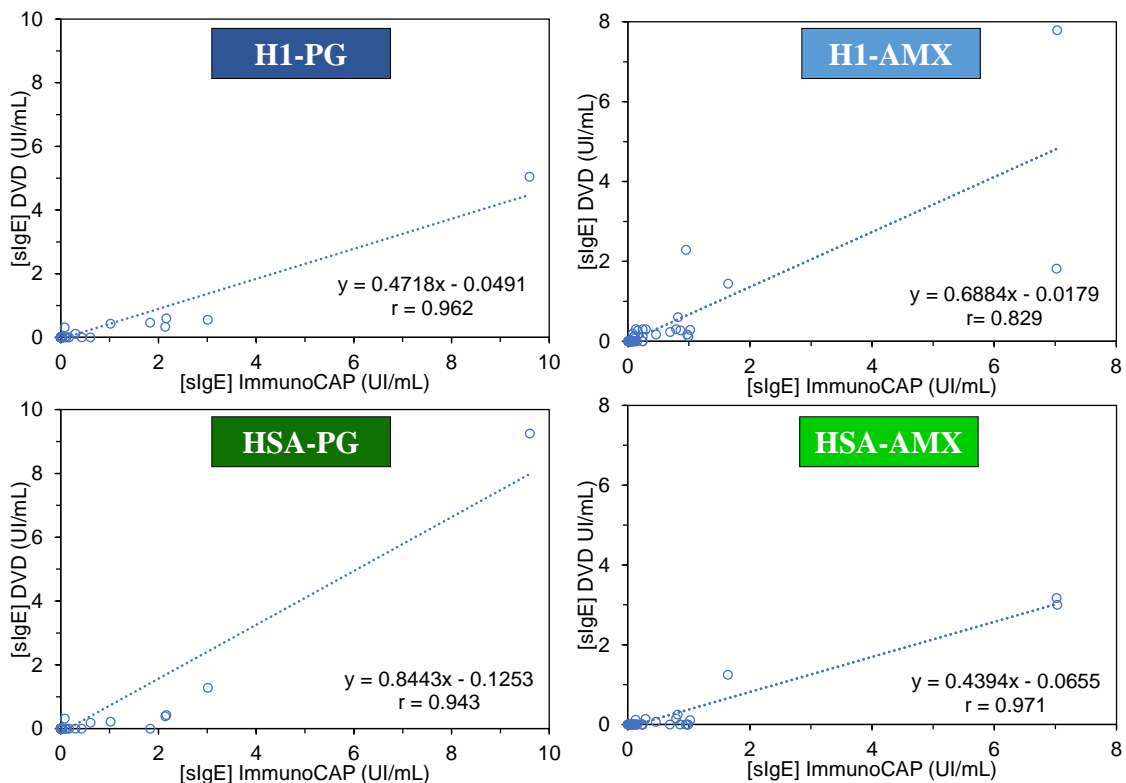


Figura 68. Estudio de correlación entre el ensayo en DVD utilizando calibración heteróloga en PBST e ImmunoCAP para los antígenos H1-PG, H1-AMX, HSA-PG y HSA-AMX.

Para confirmar estos resultados se realizó la correlación de Pearson (Figura 68). Aunque los ensayos con los antígenos H1-PG, HSA-PG y HSA-AMX presentaron una buena correlación ($r > 0.9$), la pendiente de las rectas fue baja (< 0.5), indicando que el ensayo en disco produce una infracuantificación del nivel de IgE en las muestras. Estos resultados concuerdan con los obtenidos con el porcentaje de recuperación medio. En el caso del ensayo con el antígeno H1-AMX tanto la correlación como la pendiente de la recta, muestran resultados pobres, por lo que se concluyó que, aunque el sistema presentó

buena sensibilidad, selectividad, precisión y linealidad, no correlaciona bien con el método de referencia y, por lo tanto, presenta baja exactitud.

4.5. Mejora de las prestaciones analíticas del sistema a través de la calibración del método

4.5.1. Calibración heteróloga

Diversos estudios han determinado que existe una relación entre la concentración de IgE específica con la severidad de los síntomas que presenta el paciente. Por ello, desarrollar un método que presente buena exactitud en la cuantificación de IgE es fundamental. Uno de los factores que puede afectar a la exactitud del ensayo y por lo tanto a la cuantificación de la IgE, es el efecto matriz, ya que el suero sanguíneo es una disolución compleja con múltiples compuestos como proteínas, ácidos grasos, azúcares etc, que pueden interferir en el reconocimiento antígeno/IgE. Para evaluar este efecto se prepararon curvas de calibrado heterólogas, diluyendo los calibradores en PBST y en suero de un paciente con hipogammaglobulinemia (sin IgE) como diluyente. Las señales obtenidas fueron representadas frente a la concentración y ajustadas a una logística de cuatro parámetros como se muestra en la Figura 69.

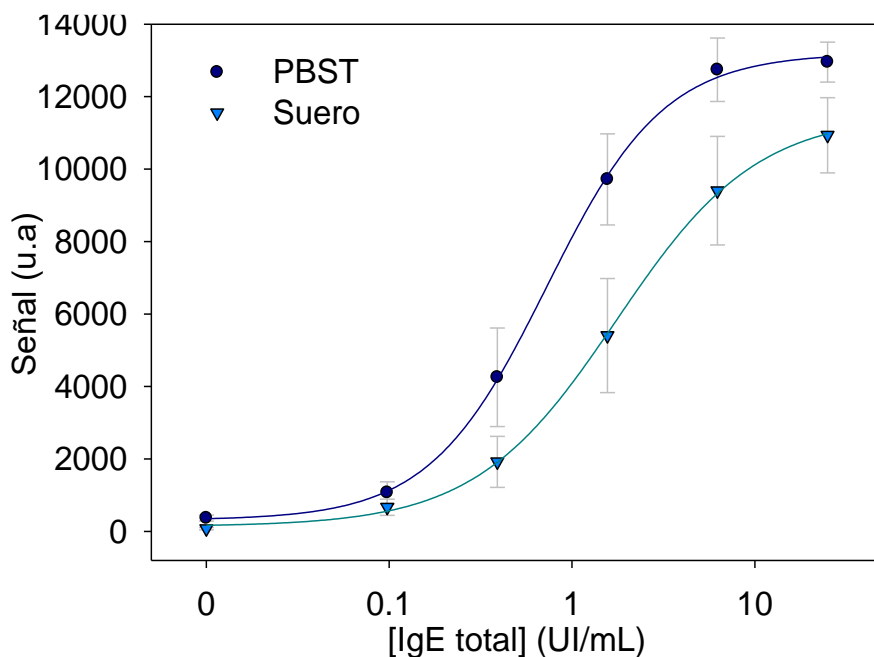


Figura 69. Curva de calibración heteróloga utilizando PBST o suero sin IgE como diluyentes del patrón de IgE total (OMS).

El ensayo realizado en PBST mostró un límite de detección de 0.06 UI/mL, 2 veces más bajo que el que presentó el calibrado en suero sanguíneo (LOD = 0.13 UI/mL). La variación en la sensibilidad del ensayo se confirmó mediante un estudio ANOVA de las pendientes que presentaban los dos ajustes. Este estudio corroboró que existía una diferencia estadísticamente significativa entre ambas curvas de calibrado ($p < 0.005$). Por lo tanto, en base a estos resultados se concluyó que los componentes presentes en el suero sanguíneo reducen la capacidad de reconocimiento de IgE específica hacia el antígeno.

Con el fin de estudiar el efecto de la matriz la sensibilidad del ensayo y la influencia de la dilución del suero en la señal analítica, diferentes proporciones de PBST-suero se doparon con 5.0 UI/mL de IgE total. Posteriormente el reconocimiento se evaluó mediante el inmunoensayo indirecto de 4 etapas descrito en 3.6.3A.

Los resultados representados en la Figura 70 muestran una disminución de la señal del 37 % cuando se utiliza suero humano como diluyente, en comparación con el PBST. Esta señal se recuperó gradualmente en las disoluciones preparadas con mayor proporción de PBST alcanzándose el valor máximo de señal a una dilución 1/8 (v/v), no observándose, con un 95 % de confianza, diferencias estadísticamente significativas entre esta dilución y el PBST ($p = 0.62$).

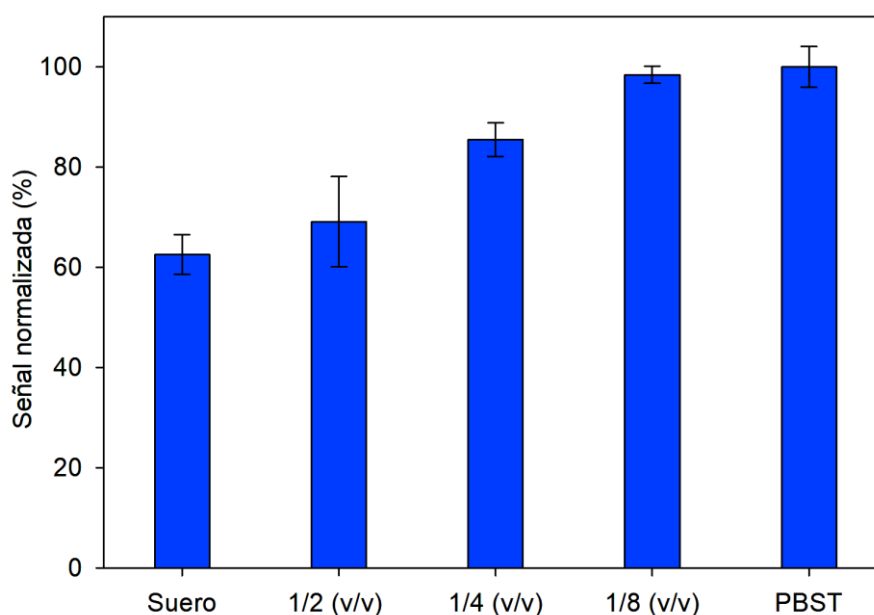


Figura 70. Efecto de la dilución del suero en el ensayo de determinación de IgE total.

En cuanto a la sensibilidad, diluir el suero con PBST 1/4 y 1/8 (v/v) producía una disminución de 1.4 y 2.2 veces el LOD, respectivamente (Tabla 19). Sin embargo, esta mejora en la sensibilidad del ensayo fue inferior al factor de dilución, no resultando por lo tanto práctica la dilución de la muestra.

Tabla 19. Límite de detección obtenido para cada una de las diluciones de la matriz.

Matriz	Factor de dilución	Límite de detección (UI/mL)	LOD x factor (UI/mL)
PBST	-	0.06	-
1/8 (v/v)	1/8	0.06	0.48
1/4 (v/v)	1/4	0.09	0.36
1/2 (v/v)	1/2	0.13	0.26
Suero	-	0.13	0.13

Otra estrategia estudiada para disminuir el efecto matriz sin necesidad de recurrir a la dilución de la muestra consiste en acondicionarla con surfactantes no iónicos, como el Tween 20. Este detergente permite romper los enlaces hidrofóbicos e iónicos que ocurren entre las biomoléculas y los compuestos inmovilizados en la superficie, reduciendo las interacciones inespecíficas y evitando los falsos positivos.²⁰⁵ En este contexto, se estudió el efecto de la adición de Tween 20 en la sensibilidad y especificidad del ensayo. Para ello, una muestra de suero con concentración conocida de IgE total se acondicionó con diferentes concentraciones de Tween 20 (0 – 2 %) y se evaluó siguiendo el ensayo indirecto de cuatro etapas utilizando GAM-HRP (Sección 3.6.3A).

Tras la incubación de la muestra de suero acondicionada y lavado de la superficie del disco con agua desionizada, se observó que el ángulo de contacto de la superficie variaba en función de la concentración de Tween 20 (Figura 71).

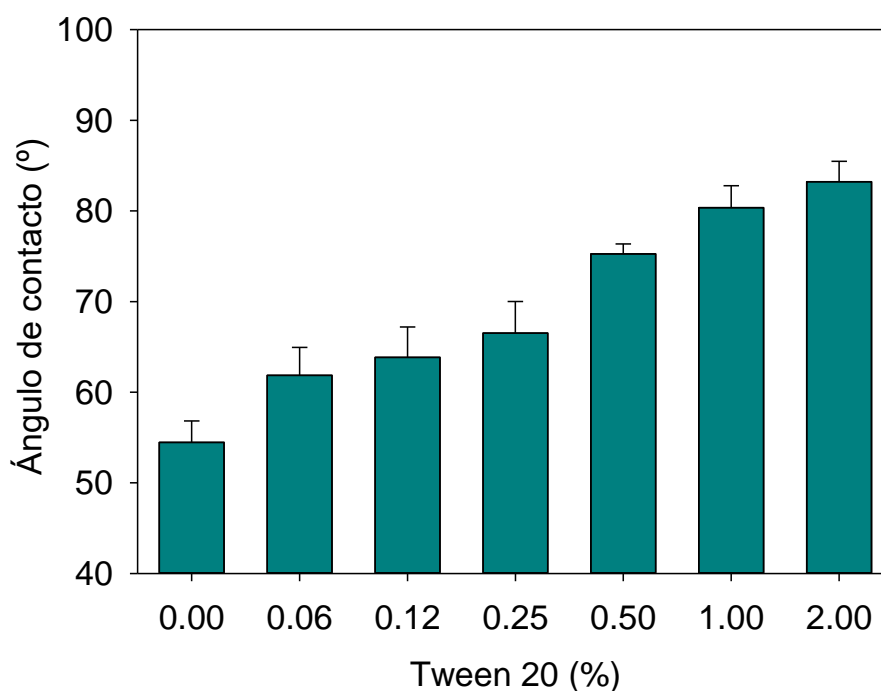


Figura 71. Ángulo de contacto de la superficie tras la incubación de una muestra de suero acondicionada con diferentes concentraciones de Tween 20.

La superficie el disco en la que se incubó la muestra de suero con baja concentración de Tween 20 (0 – 0.25 %) mostraba valores de ángulos de contacto comprendidos entre 55 y 65°. Este cambio en la hidrofobicidad fue consecuencia de la adsorción pasiva de los compuestos de la muestra sobre la superficie. Sin embargo, conforme aumentó la concentración de Tween 20, el ángulo de contacto aumentaba alcanzando el máximo a 1.0 % Tween 20 (80 °). Estos resultados indicaron que a esta concentración de surfactante se había eliminado la adsorción inespecífica de los interferentes sobre la superficie

No obstante, la adsorción inespecífica de los interferentes de la muestra sobre la superficie no afectó a la determinación de IgE. Ya que como se observa en la Figura 72, las señales de los blancos (0 UI/mL de IgE específica) se mantuvieron en todos los casos por debajo del límite de detección. Esto se debe a que, al ser la IgE una de las proteínas minoritarias del suero sanguíneo, éstas no se adsorben sobre la superficie, sino que son las proteínas mayoritarias como la HSA y las alfa globulinas las que se quedan inmovilizadas. Además, una prueba ANOVA multifactorial de dos variables, indicó que para ninguna de las concentraciones de IgE evaluadas existían diferencias estadísticamente significativas entre las señales obtenidas para cada una de las

concentraciones de Tween estudiadas. Estos resultados revelaron que acondicionar la muestra con Tween no influía significativamente en las prestaciones analíticas del ensayo de determinación de IgE específica. Por lo tanto, se concluyó que la exactitud y la sensibilidad analítica del método es independiente del acondicionamiento de la muestra.

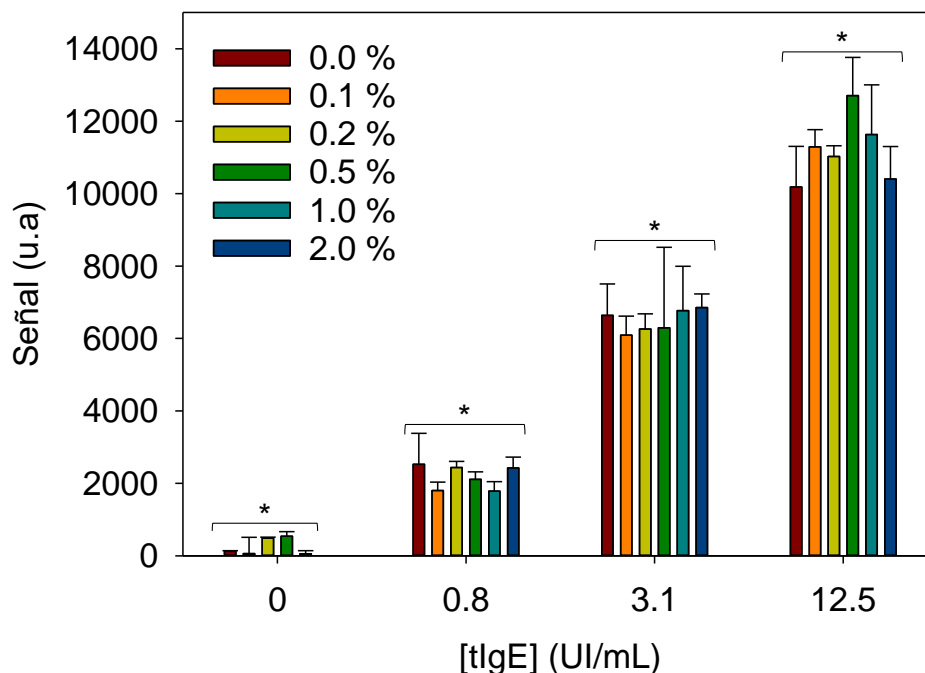


Figura 72. Efecto de la concentración de Tween 20 en la señal de reconocimiento de IgE en muestras de suero sanguíneo.

Una vez establecidas las condiciones del ensayo respecto al acondicionamiento de la muestra y de los calibradores, se cuantificó el contenido de IgE específica de las muestras tanto de pacientes alérgicos como de controles utilizando la calibración heteróloga en suero (Tabla A2.3), y se calculó la correlación y el porcentaje de recuperación que presentaban con respecto al método de referencia (Figura 73). Como se observa en la Figura 73, al igual que ocurría en la calibración heteróloga en PBST, la correlación entre ensayos fue alta ($r > 0.87$).

Respecto a la exactitud del ensayo, el porcentaje de recuperación medio para los antígenos de PG, H1-PG y HSA-PG, y el antígeno de AMX, HSA-AMX mejoraron considerablemente utilizando la calibración heteróloga en suero, siendo éste 76, 77 y 107 %, respectivamente.

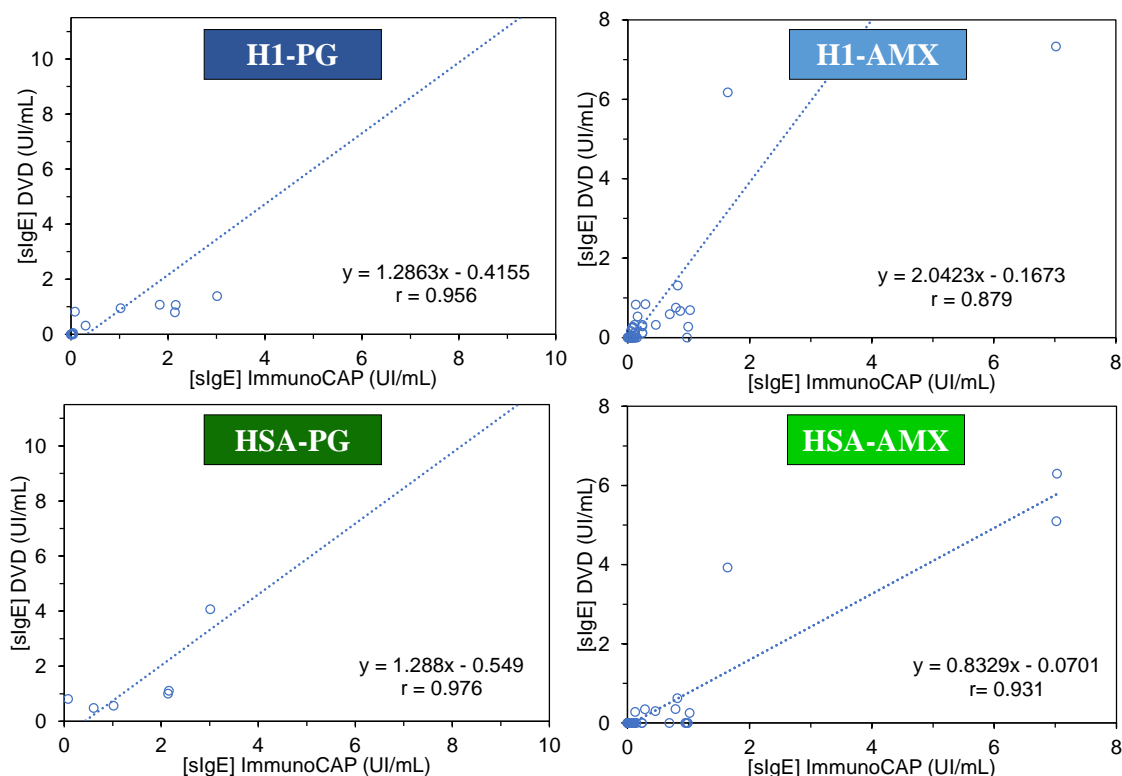


Figura 73. Estudio de correlación entre el sistema en DVD utilizando calibración heteróloga en suero sanguíneo e ImmunoCAP para los antígenos de PG y AMX.

Sin embargo, los valores de sIgE anti-AMX obtenidos utilizando el antígeno H1-AMX fueron considerablemente más altos que los obtenidos mediante ImmunoCAP, con un porcentaje de recuperación de 192 %.

La diferencia entre los porcentajes de recuperación medios obtenidos con los antígenos H1-AMX y HSA-AMX puede deberse a la diferencia del grado de conjugación de éstos, 60 y 20 %, respectivamente. Sin embargo, en la Figura 57, se observó que, para una misma concentración de IgE, el antígeno H1-AMX presentaba una mayor respuesta que el H1-PG, cuyo grado de conjugación era similar, indicando que no solo el grado de conjugación es crítico en el reconocimiento. Las diferencias obtenidas entre estos dos antígenos puede ser consecuencia, por un lado, de que la AMX puede exhibir una mejor disposición espacial y accesibilidad para el reconocimiento de la IgE, y por otro, a que este antígeno puede presentar una mayor similitud al determinante antigénico generado en el proceso de sensibilización de los pacientes. En base a estos resultados se concluye que, el sistema de calibración heterólogo puede generar disparidad en los resultados, ya que no tienen en cuenta el grado de conjugación del antígeno, la disposición espacial del

determinante, ni la afinidad antígeno-anticuerpo. Es por ello, que es necesario establecer antígenos de referencia, cuya respuesta con sIgE de los pacientes esté bien estudiada y que puedan armonizar las respuestas entre ensayos, o utilizar patrones de calibración específicos para cada uno de los alérgenos. A pesar de esta necesidad, actualmente, no se comercializan estándares de calibración específica.

Con respecto a la reproducibilidad de los resultados se observó que, al igual que para el ensayo en el que se utiliza la calibración heteróloga en PBST, se ha obtenido una RSD media de 34 y 36 % para PG y AMX respectivamente.

4.5.2. Calibración homóloga

Con el fin de estandarizar los resultados de los ensayos *in vitro* se planteó estudiar la calibración homóloga como sistema de cuantificación de IgE específica. Para ello, se utilizó como patrón de calibración una muestra representativa de concentración conocida de IgE. Las señales obtenidas para cada concentración tras la realización del ensayo indirecto de cuatro etapas usando GAM-HRP (sección 3.6.3A de Materiales y métodos), utilizando H1-AMX-4X y H1-PG como antígenos, se ajustaron a una curva logística de cuatro parámetros y se compararon con la curva de calibrado heteróloga (Figura 74), realizando una prueba ANOVA de las pendientes y la concentración media efectiva (EC50).

Este estudio reveló que no existían diferencias significativas en términos de sensibilidad (EC50 y pendiente) entre las curvas de calibrado heteróloga y homóloga de sIgE-PG ($p = 0.1590$). Sin embargo, sí había diferencias significativas entre la curva homóloga de sIgE-AMX y la curva heteróloga ($p < 0.005$), siendo la pendiente de la curva y la EC50 entre 1.8-2 veces más baja en la primera. La diferencia de sensibilidad analítica mostrada entre los dos modos de calibración de sIgE-AMX evidenció la necesidad de establecer una calibración homóloga para obtener información cuantitativa fiable.

En cuanto a los límites de detección y cuantificación de las dos estrategias estudiadas, se observó que la calibración homóloga de sIgE-PG mostró resultados similares a los obtenidos por la heteróloga siendo, el LOD y LOQ de 0.10 UI/mL y 0.41 IU/mL, respectivamente. Sin embargo, la calibración homóloga de sIgE-AMX mejoró los límites de detección y cuantificación a 0.06 y 0.22 UI/mL, respectivamente.

La reproducibilidad de las curvas de calibrado homólogas en términos de RSD oscilaron entre 20 y 35 %, en el rango de concentraciones de IgE estudiado.

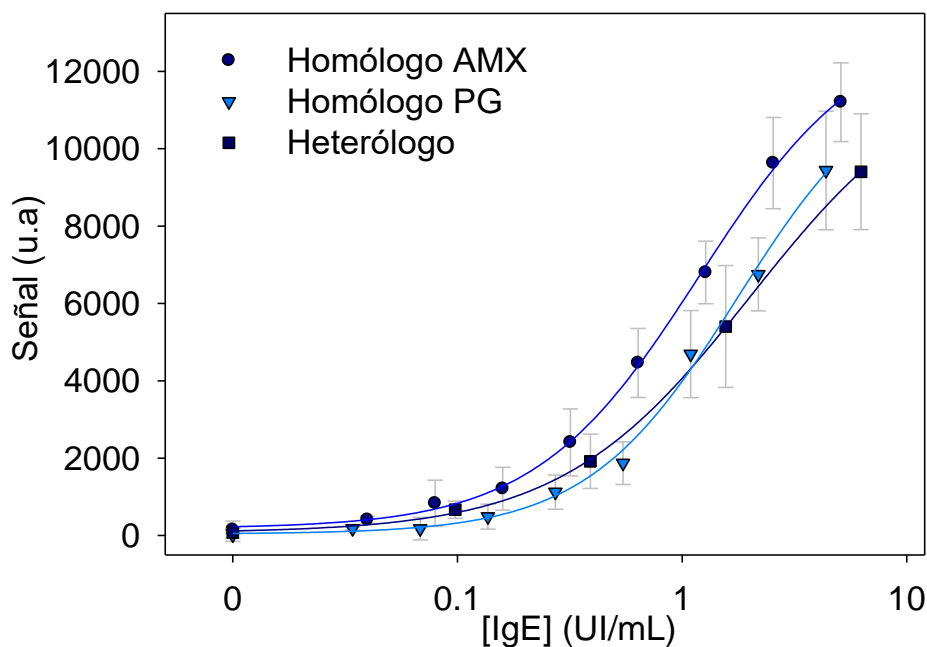


Figura 74. Curvas de calibrado heterólogo (n=15) y homólogo (n=30).

A continuación, se llevó a cabo la cuantificación de las muestras suero de pacientes y controles mediante calibración homóloga. Los resultados se muestran en la Tabla A2.4. Como era de esperar, el valor de recuperación medio de sIgE anti-PG utilizando la calibración homóloga fue similar al obtenido por la calibración heteróloga (70 %), ya que las dos curvas de calibrado no muestran diferencias significativas entre sí. Sin embargo, la cuantificación de IgE anti-AMX mejoró considerablemente utilizando este tipo de calibración, con un porcentaje de recuperación medio de 87 %.

Finalmente, con respecto a la correlación que presenta este sistema de cuantificación con el método de referencia, se observó que para ambos antígenos la r es mayor a 0.93 (Figura 75). Además, la pendiente de ambas rectas, parámetro estrechamente relacionado con la exactitud, fue similar a 1, por lo que se demuestra que la calibración homóloga mejora la exactitud del ensayo y la correlación entre ensayos *in vitro*.

La reproducibilidad en la cuantificación de las muestras en términos de RSD media, fue similar a la obtenida en los demás sistemas de cuantificación externa evaluados, 34 y 35 % para PG y AMX, respectivamente.

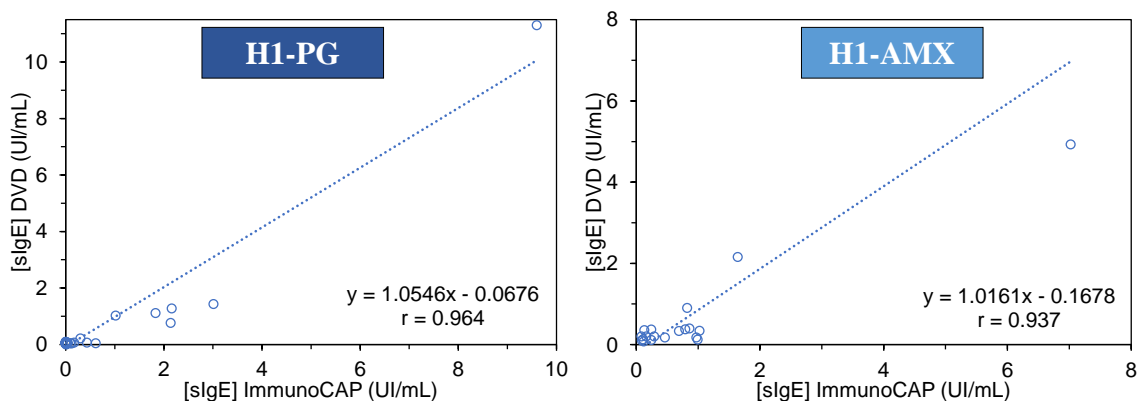


Figura 75. Estudio de correlación entre el sistema en DVD utilizando calibración homóloga e ImmunoCAP para los antígenos H1-PG y H1-AMX.

4.5.3. Calibración interna

De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación de las distintas estrategias de calibración externas se puede establecer que las mejores prestaciones analíticas en términos de exactitud se obtienen con la calibración homóloga. Además, esta estrategia mejora la correlación con el ensayo *in vitro* de diagnóstico de alergias de referencia.

Este sistema de calibración, a pesar de las ventajas que ofrece, presenta como principal limitación la necesidad de contar con grandes volúmenes de suero humano con elevada concentración de IgE específica de cada uno de los alérgenos, para poder realizar calibraciones periódicas que aseguren la exactitud de los resultados. Además, es difícil mantener la representatividad y reproducibilidad entre diferentes lotes de muestra, especialmente para los alérgenos menos comunes o aquellos que como la alergia a fármacos, presenten bajas o mínimas concentraciones de IgE en suero.

Con el fin de solventar esta limitación se han planteado en esta tesis el estudio de dos modos de calibración interna que permiten la normalización de resultados sin la necesidad de utilizar grandes cantidades del patrón de calibración homólogo.

4.5.3.1. Calibración interna homóloga

Una de las estrategias estudiadas en esta tesis consistió en construir una curva de calibrado interna a partir de diferentes concentraciones de control positivo. Entre los diversos compuestos que pueden ser utilizados como control positivo, se optó por usar una IgE recombinante (rIgE) porque ofrece información de todas las etapas del ensayo.

Para llevar a cabo este tipo de calibración, en primer lugar, se evaluó la reproducibilidad de la respuesta del control positivo a diferentes concentraciones (Figura 76). La reproducibilidad, en términos de RSD, se determinó como resultado del análisis de 240 puntos (6 discos, 20 matrices por disco, y 2 réplicas por matriz).

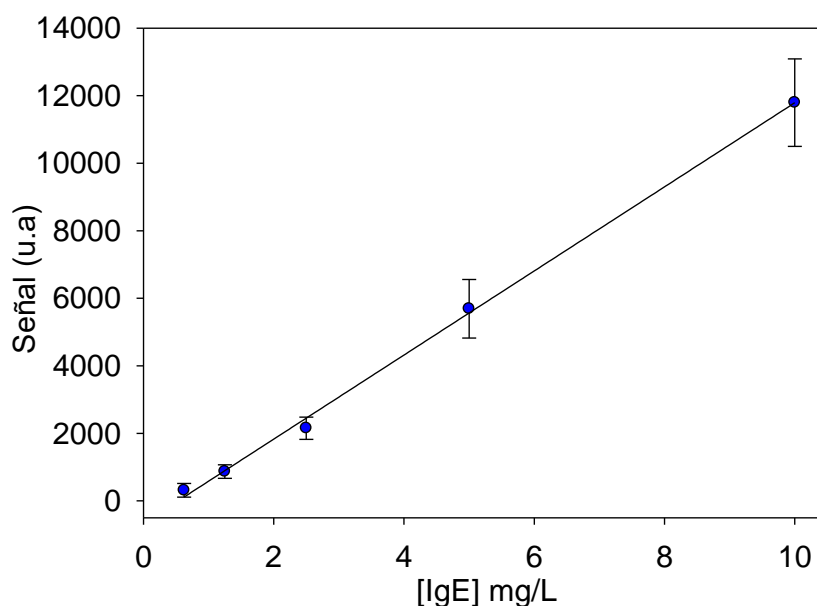


Figura 76. Variabilidad de la respuesta de los controles positivos en el rango lineal.

Los resultados obtenidos mostraron una variación entre el 11 % y el 23 % para las diferentes concentraciones ensayadas. Estos resultados revelan que este control positivo es válido por su robustez, permitiendo realizar calibraciones internas con el fin de corregir y normalizar los errores sistemáticos del ensayo.

Las señales medias obtenidas para cada una de las concentraciones de control positivo se relacionaron con las correspondientes concentraciones de IgE específica de PG y AMX de la curva de calibrado homóloga externa. Así pues, la señal correspondiente a una concentración de rIgE de 5 mg/L (5700 u.a) equivale a una concentración de IgE

específica de PG y AMX de 1.45 y 0.83 UI/mL, respectivamente (ver curva de calibrado homóloga, Figura 74).

A continuación, se llevó a cabo el análisis de las muestras por quintuplicado, cuantificándolas a partir de la curva de calibrado interno. Los resultados se muestran en la Tabla A2.5. El uso de este tipo de calibración interna mejoró la reproducibilidad reduciendo la RSD de 34 a 22 % para la determinación de IgE específica de PG y de 35 a 32 % para la determinación de IgE específica de AMX. Igualmente mejoró la cuantificación alcanzando un porcentaje de recuperación de 85 y 98 % para PG y AMX, respectivamente.

Esta mejora también se vio reflejada en la correlación con el ensayo de referencia, alcanzando una $r > 0.98$ y una pendiente de 1.1 para los dos antígenos, superior a la obtenida con los sistemas de calibración externa (Figura 77).

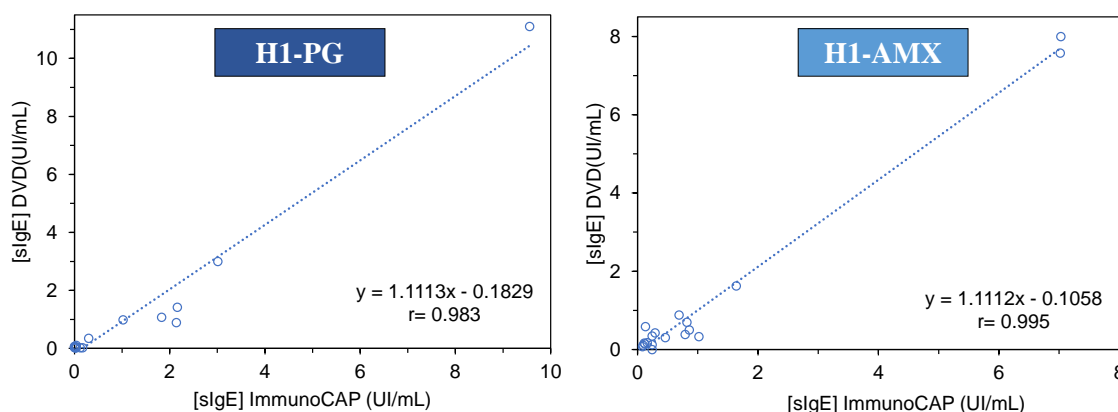


Figura 77. Correlación entre el ensayo en DVD utilizando la calibración homóloga interna en suero sanguíneo e ImmunoCAP para los antígenos H1-PG y H1-AMX

4.5.3.2. Calibración con patrón interno

Otra estrategia de calibración estudiada fue la calibración basada en patrón interno. Este tipo de calibración es ampliamente utilizado en cromatografía y espectroscopía de masas. Este método consiste en añadir un compuesto (patrón interno) a una concentración determinada, tanto en la muestra como en las disoluciones de calibración. Este modo de calibración permite compensar y reducir las desviaciones que puedan producirse en los procesos de medición o errores que puedan afectar al ensayo, como pueden ser errores de pipeteo, preparación de las muestras, variaciones asociadas a

la inmovilización de los antígenos, variaciones de las condiciones ambientales, como humedad relativa y temperatura que pueden afectar al reconocimiento antígeno-anticuerpo, efecto matriz, estabilidad de los reactivos, entre otros.

Para establecer que un compuesto puede ser usado como patrón interno, éste debe cumplir una serie de condiciones, como presentar propiedades fisicoquímicas similares al analito, no debe interferir con la determinación del mismo y no debe estar presente de forma natural en la muestra a analizar. Por ello, se seleccionó una IgE quimérica específica de AZT (qIgE) como patrón interno, ya que presenta una fracción constante de IgE que puede ser reconocida por los anticuerpos de detección, sin embargo, la región Fab es específica de antígenos de AZT, no interfiriendo en la determinación de IgE anti-PG o AMX. Además, como se ha demostrado en la sección 4.4 todas las muestras evaluadas presentaron resultados negativos para este antígeno.

Para confirmar que la qIgE puede ser utilizada como patrón interno y aprovechar al máximo las ventajas de esta estrategia de calibración, se evaluaron los siguientes parámetros: concentración óptima de patrón interno, selectividad del compuesto, compatibilidad con la muestra y estabilidad en muestras de suero humano.

La determinación de la concentración óptima de qIgE se realizó adicionado a un conjunto de muestras de suero de controles no alérgicos a β -lactámicos, diferentes concentraciones de qIgE y seguidamente se evaluaron siguiendo el ensayo indirecto de cuatro etapas usando GAM-HRP (sección 3.6.3A de Materiales y métodos). Los resultados se muestran en la Figura 78.

Se seleccionó como concentración óptima de qIgE el valor de EC₅₀ de la curva, que correspondía con 4.25 UI/mL. Además, el uso de esta concentración de dopado produce una mínima dilución de la muestra, menor al 10 %, y una buena reproducibilidad, siendo el RSD 8 % y 15 % intra e inter-disco, respectivamente.

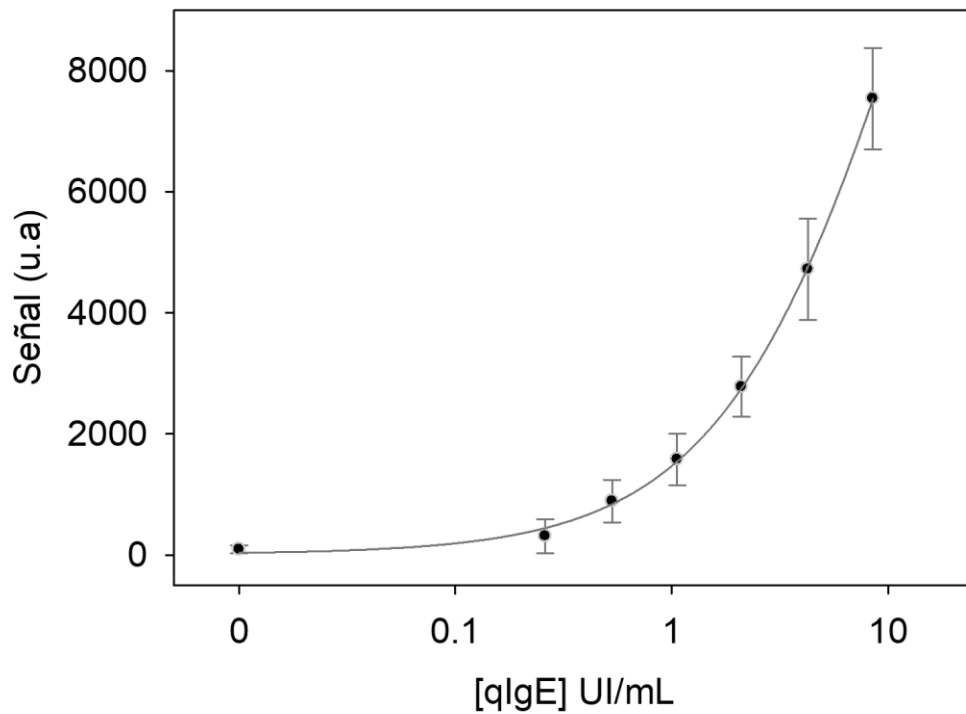


Figura 78. Respuesta analítica del patrón interno frente al antígeno de AZT.

En este mismo estudio se comprobó que el anticuerpo era específico a AZT ya que para ninguna de las concentraciones estudiadas aparecieron señales para los antígenos de AMX y PG. Además, se confirmó este resultado comparando las señales obtenidas tras analizar diluciones seriadas de una muestra de concentración de IgE específica de PG y AMX conocida con y sin adición de patrón interno (Figura 79).

Los resultados mostraron que no había diferencias estadísticamente significativas entre las señales ($p > 0.005$), concluyéndose que utilizar este patrón interno no afecta al reconocimiento específico antígeno/IgE.

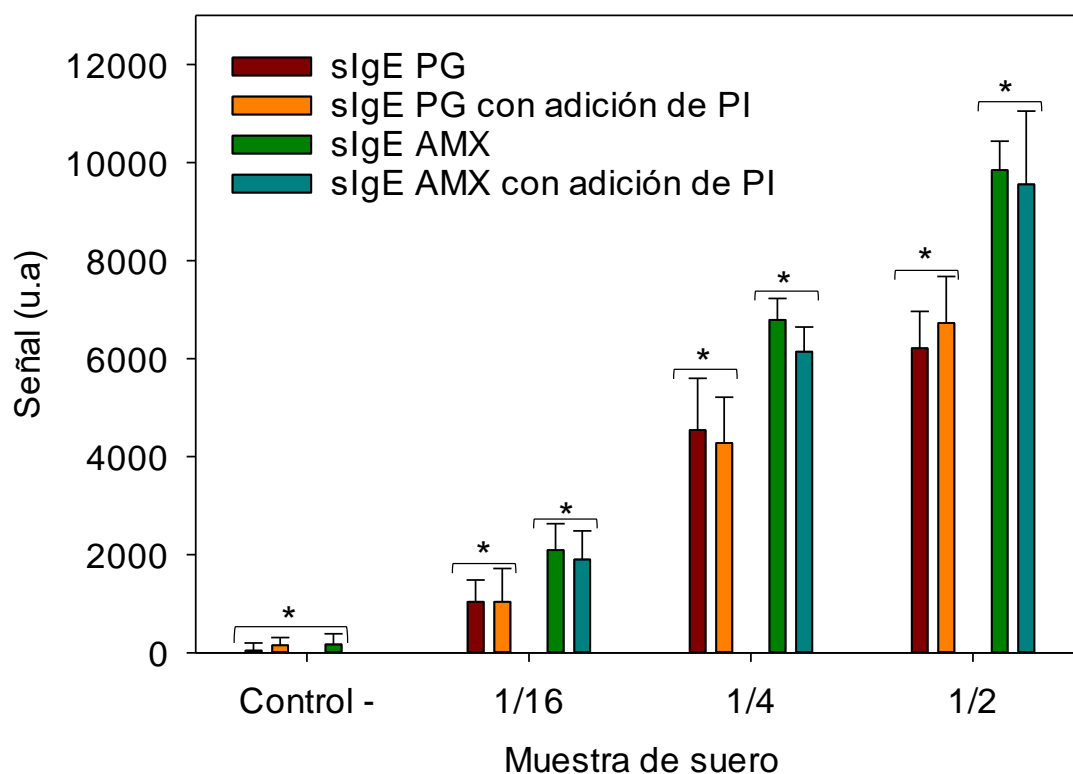


Figura 79. Evaluación de la selectividad del patrón interno.

También se evaluó la estabilidad del patrón interno en suero humano. Para ello, se preparó un conjunto de 16 muestras de suero control con una concentración conocida de 4.5 UI/mL de qIgE y se incubó durante diferentes tiempos. Las señales obtenidas para cada uno de los tiempos evaluados se normalizaron a la señal obtenida a tiempo 0.

Como se muestra en la Figura 80, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la señal normalizada de reconocimiento entre 0 - 4 horas. Sin embargo, transcurridas 8 horas se observó una disminución de un 40 % de la señal analítica. Estos resultados indican que el patrón interno es estable y compatible con muestras de suero humano en las condiciones y duración del ensayo, hasta 4 horas, aunque es recomendable no dilatar demasiado el uso de estos patrones una vez preparados.

Todos estos estudios concluyeron que el uso de qIgE como patrón interno es una estrategia interesante para la cuantificación de IgE específica frente a PG y AMX presentes en muestras de suero sanguíneo.

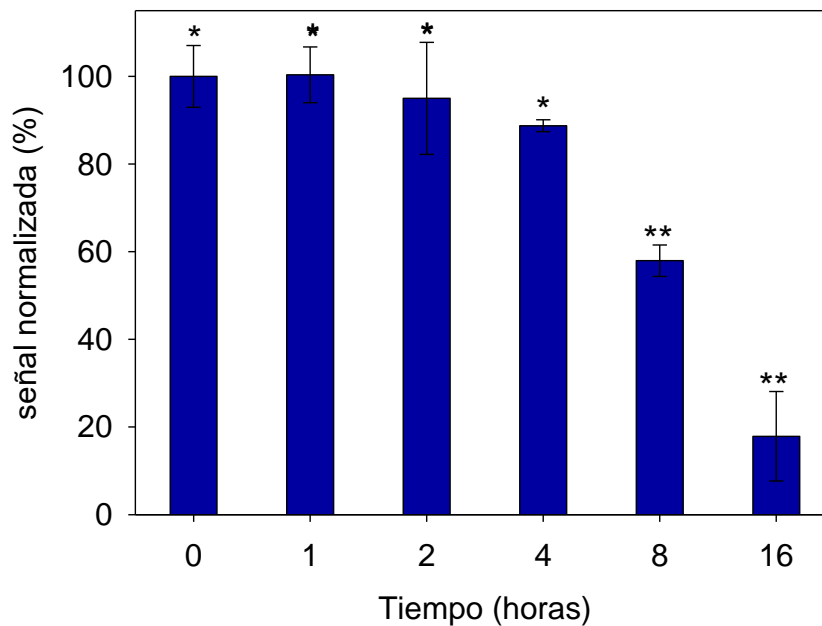


Figura 80. Evaluación de la estabilidad de la IgE quimérica en suero sanguíneo.

Seguidamente, se realizaron las curvas de calibrado normalizadas con patrón interno. Para ello, se prepararon diluciones seriadas del patrón de calibración homólogo con una concentración de qIgE de 4.25 UI/mL y se realizó el ensayo indirecto de cuatro etapas utilizando GAM-HRP descrito en la sección 3.6.3A de Materiales y Métodos. Las señales obtenidas de cada una de las diluciones se normalizaron utilizando la señal obtenida para el antígeno de AZT y posteriormente se ajustaron a una curva logística de cuatro parámetros (Figura 81). Las curvas de calibración homólogas estandarizadas con patrón interno para la determinación de IgE anti-PG y anti-AMX muestran una sensibilidad del ensayo similar a la obtenida en la calibración homóloga externa, siendo el límite de detección 0.12 y 0.06 UI/mL para PG y AMX, respectivamente. En cuanto a la reproducibilidad, la RSD varió entre el 10 % y el 15 %, dos veces inferior a la calibración externa. Esta mejora en la reproducibilidad de los resultados nos proporciona una mayor fiabilidad analítica.

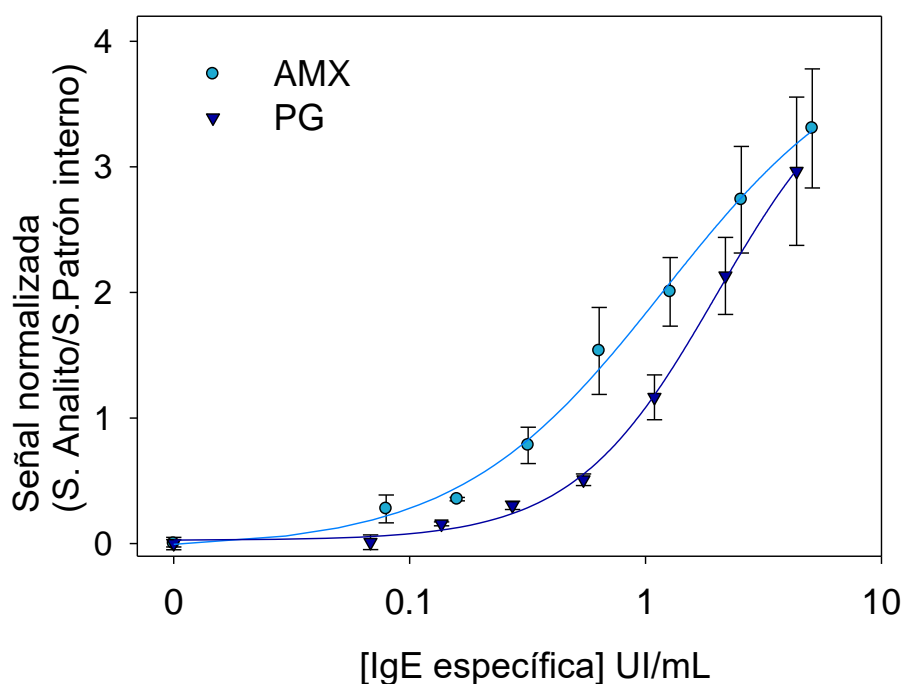


Figura 81. Curvas de calibrado para la cuantificación de IgE específica frente a PG y AMX usando el método del patrón interno.

La robustez de esta estrategia de calibración se examinó mediante dos estudios en paralelo. Por un lado, se determinó si este tipo de calibración permitía corregir los errores experimentales en la cuantificación de IgE asociados a la manipulación de las muestras. Para ello, las muestras de suero que contenían 2.4, 1.2, 0.6 y 0.3 UI/mL de IgE específica frente a PG y 1.76, 0.88, 0.44 y 0.22 UI/mL de IgE específica frente a AMX se doparon con 4.25 UI/mL de patrón interno y se analizaron por triplicado. Seguidamente, estas muestras se diluyeron con suero control, simulando una pérdida de muestra del 50 y 75%. Finalmente, se determinó la concentración de IgE siguiendo la estrategia de calibración homóloga externa y de patrón interno.

Como se muestra la Tabla 20 y la Tabla 21, la cuantificación de la IgE fue posible utilizando una calibración externa, aunque no se corrigieron los errores experimentales asociados a la pérdida de muestra. Por el contrario, la introducción de un estándar interno en la muestra proporcionó una buena determinación de las concentraciones de IgE específica frente a PG y AMX, independientemente del error experimental, exhibiendo una recuperación entre el 71 - 127 %.

Tabla 20. Resultados de la cuantificación de IgE específica de PG mediante calibración homóloga externa y con patrón interno.

dilución de muestra (%)	IgE anti-PG (UI/mL)			
	2.41	1.21	0.60	0.30
0	2.90 ± 0.93 ^a	1.18 ± 0.30	0.76 ± 0.10	0.34 ± 0.11
	2.78 ± 0.40 ^b	1.24 ± 0.19	0.74 ± 0.07	0.29 ± 0.03
	115 ^c	103	123	97
50	1.36 ± 0.44 ^a	0.48 ± 0.12	0.29 ± 0.04	0.08 ± 0.03
	2.71 ± 0.29 ^b	1.33 ± 0.20	0.59 ± 0.05	0.36 ± 0.04
	112 ^c	110	97	120
75	0.39 ± 0.13 ^a	0.22 ± 0.06	0.13 ± 0.02	< LD
	2.15 ± 0.31 ^b	0.86 ± 0.13	0.69 ± 0.06	0.38 ± 0.04
	89 ^c	71	114	127

^a Calibración homóloga externa. ^b Calibración con patrón interno ^c % de recuperación obtenido cuantificando con patrón interno.

Tabla 21. Resultados de la cuantificación de IgE específica de AMX mediante calibración homóloga externa y con patrón interno.

dilución de muestra (%)	IgE anti-AMX (UI/mL)			
	1.76	0.88	0.44	0.22
0	1.77 ± 0.27 ^a	1.08 ± 0.25	0.59 ± 0.13	0.19 ± 0.06
	1.74 ± 0.17 ^b	0.83 ± 0.11	0.51 ± 0.12	0.25 ± 0.05
	99 ^c	95	115	111
50	0.99 ± 0.15 ^a	0.39 ± 0.09	0.25 ± 0.07	< LOD
	1.73 ± 0.17 ^b	0.78 ± 0.11	0.47 ± 0.11	0.24 ± 0.04
	99 ^c	89	108	110
75	0.44 ± 0.07 ^a	0.11 ± 0.03	< LOD	< LOD
	1.82 ± 0.28 ^b	0.79 ± 0.11	0.48 ± 0.11	0.27 ± 0.05
	103 ^c	90	110	123

^a Calibración homóloga externa. ^b Calibración con patrón interno ^c % de recuperación obtenido cuantificando con patrón interno.

Por otro lado, se evaluó si este tipo de calibración corregía los errores en la cuantificación de la sIgE asociados a las diferencias en la composición de las muestras de suero.

Algunos de los sistemas multiplex de detección *in vitro* de sIgE, como es ImmunoCAP ISAC, muestran reactividad cruzada con otros anticuerpos presentes en el suero sanguíneo como IgG o IgM.^{229,230} Esta tendencia por unirse a los antígenos puede

interferir en la unión de la IgE específica que se encuentra en menor concentración en suero, repercutiendo en las prestaciones del ensayo. Además, la concentración de IgG puede diferir entre pacientes, y esta variación puede afectar a la precisión en la cuantificación de sIgE. Como se vio anteriormente, la matriz afecta considerablemente a la determinación de IgE llegando a disminuir en un 50 % la sensibilidad del ensayo, por lo que es necesario estandarizar la matriz con el fin de poder normalizar la respuesta en muestras de pacientes alérgicos y generar valores fiables.

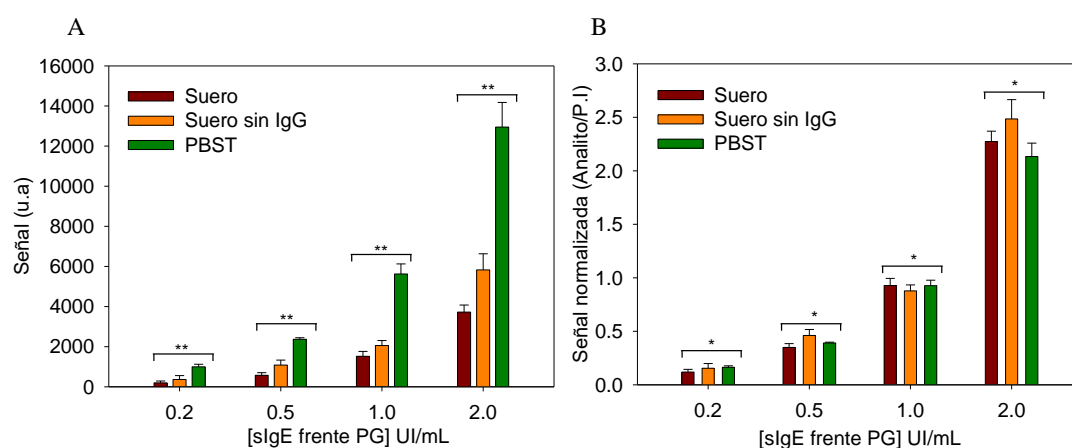


Figura 82. Efecto de la matriz de la muestra de suero en la señal reconocimiento de la sIgE anti-PG (A) Efecto de la matriz de la muestra de suero en la señal de reconocimiento de la sIgE anti-PG tras la normalización con patrón interno (B).

*No existen diferencias estadísticamente significativas ** Existen diferencias estadísticamente significativas

Para este estudio, se utilizó un suero de un paciente con elevada concentración de IgE específica frente a PG (10 UI/mL) diluido en tres matrices diferentes: suero humano sin tratar, suero humano parcialmente deplecionado (libre de IgG) y PBST. Los resultados se muestran en la Figura 82A. Como se observa, la muestra parcialmente deplecionada (suero sin IgG) presentó una mayor señal que la del suero sin tratar. Sin embargo, esta matriz todavía contenía otros interferentes que afectaban al reconocimiento de IgE por el antígeno y por lo tanto a la exactitud y sensibilidad del ensayo, no alcanzándose la señal obtenida por la muestra preparada en PBST. A continuación, las muestras fueron dopadas con el patrón interno y analizadas. Los resultados obtenidos y representados en la Figura 82B mostraron que el uso del patrón interno permitió la normalización del efecto matriz, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre las señales obtenidas

para una misma concentración en las tres matrices ($p = 0.100$). Por lo tanto, los resultados revelaron que esta estrategia de estandarización genera una respuesta única independientemente de la composición de la muestra. Además, estos resultados indicaron la versatilidad del método al permitir evaluar muestras con diferente composición y generar resultados precisos sin necesidad de recalibrar u optimizar el ensayo.

Finalmente, una vez evaluados estos parámetros analíticos, se llevó a cabo la cuantificación de las muestras de suero sanguíneo por quintuplicado utilizando la estrategia de calibración con patrón interno. Los resultados se muestran en la Tabla A2.5.

La estrategia de cuantificación de IgE específica en muestras de suero utilizando la calibración con patrón interno resultó ser exacta, alcanzando valores de recuperación medios de 93 y 106 % para PG y AMX, respectivamente, ligeramente superiores a los obtenidos mediante calibración interna homóloga.

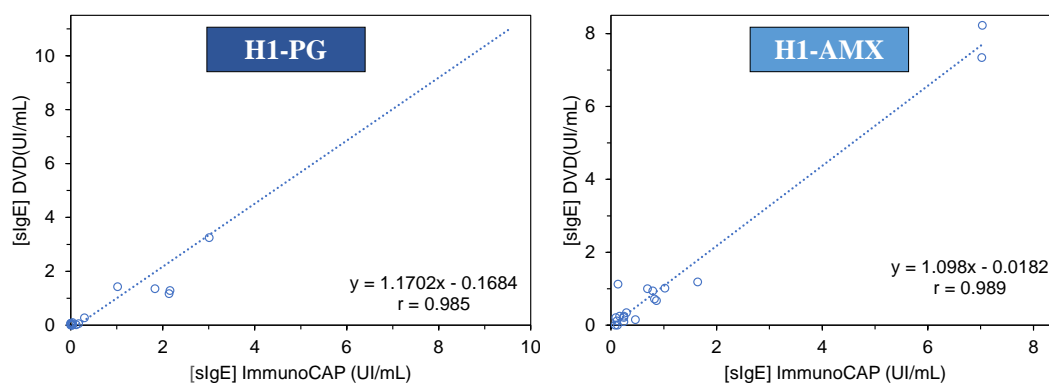


Figura 83. Estudio de correlación entre el ensayo en DVD utilizando calibración con patrón interno e ImmunoCAP para los antígenos H1-PG y H1-AMX.

Con respecto a la correlación de Pearson, se obtuvo un valor de r por encima de 0.98 y una pendiente similar a 1, lo que confirma que esta calibración permite la cuantificación de las muestras con exactitud (Figura 83).

4.5.4. Resumen comparativo de las prestaciones analíticas de los sistemas de calibración estudiados

La precisión y la exactitud del ensayo son los parámetros analíticos que más se ven afectados por la estrategia de calibración. La comparativa de las RSD de los

resultados obtenidos tras aplicar las distintas estrategias de calibración (Figura 84) determinó que, los métodos de calibración externos presentaban una precisión similar, en torno al 35 %. Sin embargo, el uso de calibraciones internas mejora la precisión de los resultados, disminuyendo hasta 2.3 veces la RSD.

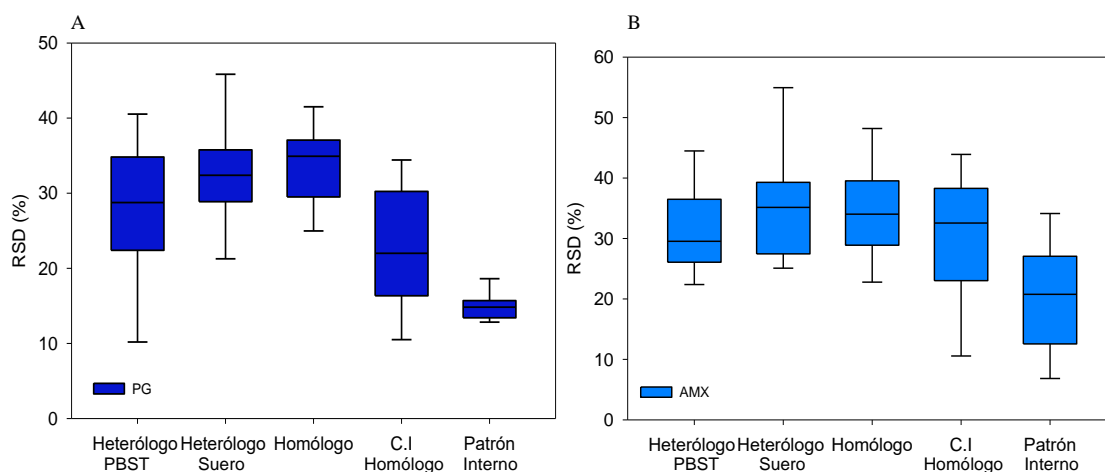


Figura 84. Diagrama de cajas de la RSD obtenida en los estudios de precisión de las diferentes estrategias de calibración estudiadas para la determinación de sIgE de PG (A) y de AMX (B).

La calibración interna basada en controles positivos consigue disminuir la RSD de 35 % a 32 y 20 % para la determinación de IgE específica a AMX y PG, respectivamente. Por el contrario, en el caso de la calibración basada en patrón interno esta diferencia es más notoria, disminuyendo la RSD de 35 % a 22 y 15 % para la determinación de IgE específica de AMX y de PG, respectivamente.

Con respecto a la exactitud se demostró que la estrategia basada en calibración heteróloga presenta una peor exactitud y menor correlación con el método de referencia que las basadas en calibración homóloga, sobre todo, para el antígeno de H1-AMX. Además, las estrategias de calibración interna y patrón interno mejoraron hasta en un 20 % la exactitud del ensayo.

La mejora de estos parámetros analitos se debe a que estas calibraciones consiguen corregir los errores asociados al operador, impresión de los antígenos y otras condiciones externas, como humedad relativa, temperatura, etc, que afectan al ensayo. Además, la calibración con patrón interno permite también corregir las diferencias asociadas a la

composición de la muestra, mejorando la robustez del ensayo con respecto a otros modos de calibración interna (Tabla 22).

Tabla 22. Comparación de las prestaciones analíticas obtenidas con cada uno de los métodos de calibración estudiados.

Estrategia de calibración	BL	LOD (UI/mL)	EC50 (UI/mL)	RSD (%)	Recuperación (%)	Robustez
Heterólogo	PG	0.06	0.8	32	26	-
PBST	AMX	0.06	0.8	31	80	-
Heterólogo	PG	0.12	2.0	34	76	+
Suero	AMX	0.12	2.0	36	192	+
Homólogo	PG	0.14	1.8	34	70	++
	AMX	0.06	1.0	35	88	++
C.I.	PG	0.14	1.8	22	85	+++
Homólogo	AMX	0.06	1.0	32	98	+++
Patrón	PG	0.12	1.5	14	93	++++
interno	AMX	0.06	1.0	20	106	++++

La robustez se ha evaluado atendiendo a 4 parámetros: efecto matriz, naturaleza del antígeno, error del operador e impresión y composición de la muestra.

4.6. Prestaciones clínicas del ensayo

Uno de los puntos más interesantes del inmunoensayo desarrollado con los antígenos de H1 y HSA son las prestaciones clínicas obtenidas. Estas prestaciones fueron evaluadas mediante un análisis ROC (Receiver Operating Characteristic), utilizando el software MedCalc (MedCalc Ltd. Ostende, Bélgica). Como se vio con anterioridad algunos pacientes presentaron mejor reconocimiento para el antígeno HSA-PG, y otros para el H1-PG, por lo que para realizar este estudio se unificaron los resultados, considerando positivos a aquellas muestras de suero que dieron valores de sIgE por encima del límite de detección para alguno de esos dos antígenos.

Los resultados obtenidos mediante el inmunoensayo en disco compacto tanto para PG como para AMX se compararon con los obtenidos con el método de referencia, ImmunoCAP para estos antibióticos (Figura 85).

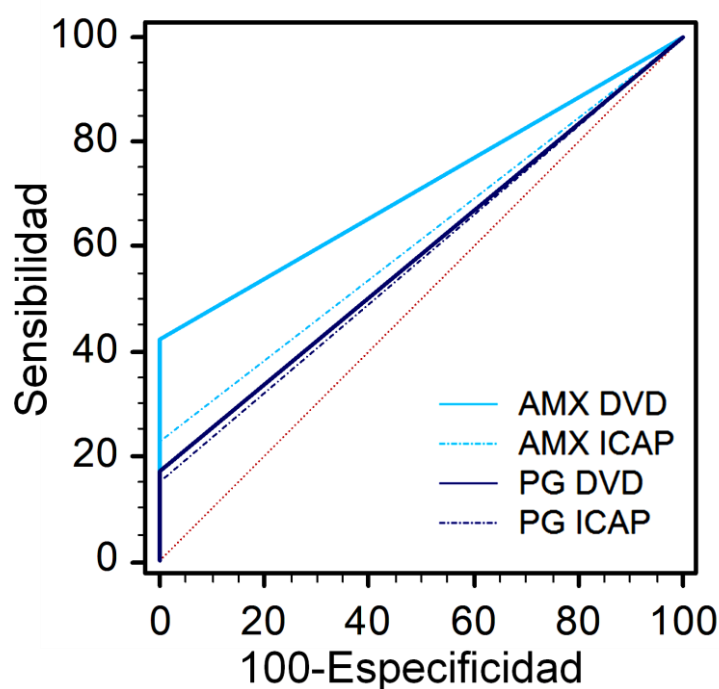


Figura 85. Característica Operativa del Receptor (ROC) de los resultados de determinación de IgE específica frente a PG y AMX de un conjunto de 101 muestras mediante el sistema en DVD e ImmunoCAP.

La sensibilidad del ensayo para AMX (42 %) fue significativamente mejor que la obtenida con ImmunoCAP (23 %). La mejora en la sensibilidad clínica se debió al uso de antígenos derivados de la histona, que probablemente mimetizan mejor el epítipo natural de la reacción alérgica y a la mayor sensibilidad analítica del ensayo (0.06 UI/mL frente a 0.35 UI/mL de ImmunoCAP). Con respecto a PG, se observó que el ensayo en disco compacto presentó una sensibilidad de 17 % frente al 15 % del obtenidos por ImmunoCAP.

La diferencia de la sensibilidad clínica del ensayo de PG y de AMX, 17 % y 40 % respectivamente, se debía principalmente a que los pacientes fueron caracterizados como alérgicos a AMX, ya que es éste el fármaco causante de la reacción alérgica, por lo que se puede afirmar, que los resultados positivos de alergia a PG son debidos a priori a reactividad cruzada.

Cabe mencionar que los ensayos presentaron una excelente especificidad (100 %), y no se detectaron falsos positivos, lo que confirma la validez clínica del ensayo para el diagnóstico *in vitro* de alergia a β -lactámicos.

4.7. Patrones de sensibilización

La determinación de IgE específica de distintos fármacos dentro de la familia de los β -lactámicos proporciona información muy útil sobre la respuesta del paciente y el posible patrón de reconocimiento. Actualmente, cuando un paciente muestra una respuesta alérgica a un antibiótico β -lactámico, se le restringe el uso de todos los fármacos pertenecientes a esta familia y se le suministra otros antibióticos, como fluoroquinolonas, vancomicina, glucopéptidos, aminoglucósidos, que presentan un estrecho espectro de actuación y son más tóxicos y caros. El uso de estos tratamientos alternativos a los β -lactámicos conlleva un aumento de las infecciones y resistencias bacterianas, e incluso a la hospitalización de pacientes. Es por ello necesario esclarecer el patrón de sensibilización para clasificar mejor a los pacientes, y poder así establecer tratamientos alternativos que disminuyan los problemas médicos asociados al uso de otros antibióticos menos eficaces.

A pesar de esta necesidad, los inmunoensayos actuales de diagnóstico *in vitro* de alergia a antibióticos β -lactámicos solo permiten la determinación de IgE específica de 3-5 antibióticos, la mayoría de ellos dentro de la familia de las penicilinas. Los antibióticos β -lactámicos presentan entre sí una estructura química muy parecida por lo que la reactividad cruzada entre diversos fármacos de esta familia es muy común. Diversos estudios realizados con pruebas *in vivo* han demostrado que existen diferentes patrones de reconocimiento, y que la cadena lateral juega un papel crucial en la respuesta inmunitaria. A pesar de la importancia de la cadena lateral, todos los antibióticos β -lactámicos evaluados en las pruebas *in vitro* actuales presentan una cadena lateral muy similar, diferenciándose únicamente en un grupo funcional. La falta de estudios de evaluación de antibióticos β -lactámicos con cadenas laterales diferentes entre sí, hace difícil generar un patrón de reconocimiento claro.

Gracias a la capacidad multiplex del ensayo desarrollado se pudo determinar simultáneamente la reactividad que presentan las muestras de pacientes alérgicos tanto a los antígenos de PG, AMX y AZT, como a otros β -lactámicos de la familia de las penicilinas y de otras subfamilias.

4.7.1. Estudio de reactividad cruzada.

El estudio de la reactividad cruzada para la obtención de los diferentes patrones de reconocimiento asociados a pacientes se llevó a cabo realizando, en primer lugar, una primera aproximación con anticuerpos policlonales obtenidos para penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas y monobactamas. Estos anticuerpos fueron producidos mediante la inmunización de conejos con antígenos de PG, AZT, CFT y MRP, preparados con el determinante mayor y la proteína KLH.

Los anticuerpos contenidos en los sueros de conejo fueron purificados siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.3.1 y titulados mediante el ensayo indirecto de determinación de IgG descrito en la sección 3.6.5. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 86.

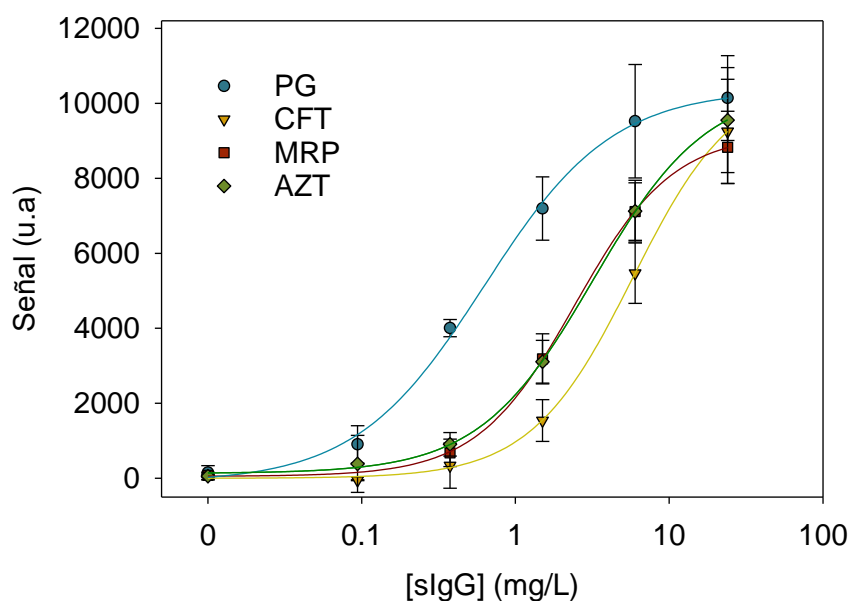


Figura 86. Titulación de los anticuerpos obtenidos tras inmunización.

Los cuatro anticuerpos respondieron de modo selectivo frente al antígeno homólogo, siendo el anticuerpo anti-PG el que exhibió una mayor afinidad aparente, alcanzando un EC50 de 0.6 mg/L. Los anticuerpos anti-MRP y anti-AZT presentaron una afinidad hacia al antígeno similar, siendo el EC50 de 2.8 y 3.0 mg/L, respectivamente. Finalmente, el anticuerpo anti-CFT mostró una menor respuesta que los anticuerpos anteriores, con un EC50 de 5.2 mg/L.

Una vez realizada la titulación de los anticuerpos, se evaluó la selectividad de éstos mediante estudios de reactividad cruzada tanto a antibióticos de su subfamilia, como a otros de las otras 4 subfamilias de β-lactámicos. Para ello, se inmovilizaron en la superficie del disco compacto, un panel de 18 antígenos β-lactámicos: 7 de la familia de las penicilinas, 7 de la familia de las cefalosporinas, 3 de la familia de las carbapenemas (CPM) y 1 de la familia de las monobactamas (MB). Las señales obtenidas tras el ensayo indirecto de determinación de IgG (sección 3.6.5) de cada una de las concentraciones de muestra evaluada se ajustaron a una curva logística de cuatro parámetros y se calculó el porcentaje de reactividad cruzada de cada anticuerpo frente a cada antígeno, de acuerdo a la ecuación 6.

$$R. \text{ Cruzada (\%)} = \frac{EC50 \text{ interferente}}{EC50 \beta \text{ lactámico análogo}} \times 100 \text{ Ec. 6}$$

Tabla 23. Datos de reactividad cruzada mostrada por anticuerpos derivados de diferentes β-lactámicos.

	Fármaco	IgG anti-PG	IgG anti-CFT	IgG anti-MRP	IgG anti-AZT
Penicilinas	AMP	+++	-	-	-
	AMX	+++	-	-	-
	CRB	++++	-	-	-
	MZL	++	-	-	-
	PG	++++	+	-	-
	PPR	++	-	-	-
	PV	++++	+	-	-
	TCC	++	-	-	-
Cefalosporinas	CFC	-	+	-	-
	CFD	-	++	-	++++
	CFL	-	+	-	-
	CFN	++	++	-	+/-
	CFO	-	++	-	+/-
	CFR	-	+	-	-
	CFT	-	++++	-	-
CPM	ERP	-	-	-	-
	IMP	-	-	-	-
	MRP	-	-	++++	-
MB	AZT	-	-	-	++++

(< 10 %); +/- (10 – 20 %); + (20 – 50 %); ++ (50 – 70 %); +++ (70 – 90 %); ++++ (> 90 %)

El porcentaje de reactividad cruzada calculada se relacionó con un código de signos y colores. Así, una reactividad cruzada menor del 10 % fue considerada como

negativa (-) y se le atribuyó el color anaranjado, entre un 10 – 20 % se estableció como reactividad cruzada media (+/-) e identificada con color amarillo, finalmente un valor de reactividad cruzadas mayor de 20 % se consideró como un resultado positivo (+) y se codificó con color verde. La intensidad de este color se incrementó conforme aumenta el porcentaje de reactividad cruzada.

Como se muestra en la Tabla 23, el anticuerpo anti-MRP, derivado de un antibiótico (MRP) perteneciente a la familia de las carbapenemas, reconoce únicamente a su antígeno análogo, por lo que es un suero específico, no reconociendo otros β -lactámicos. Esto es debido a que este fármaco sólo presenta en común con el resto de los antibióticos el anillo β -lactámico. La ausencia de reactividad cruzada de este anticuerpo con otros β -lactámicos indica que el grupo β -lactama no forma parte del epítipo.

En el caso del anticuerpo de AZT, perteneciente a la subfamilia de monobactamas, se observó que presentaba una elevada reactividad cruzada con una de las cefalosporinas, la ceftazidima. Este hecho ya se ha observado en trabajos anteriores en estudios *in vivo*. La elevada reactividad cruzada (92 %) es debido probablemente a que comparten la misma cadena R_1 (Figura 87).

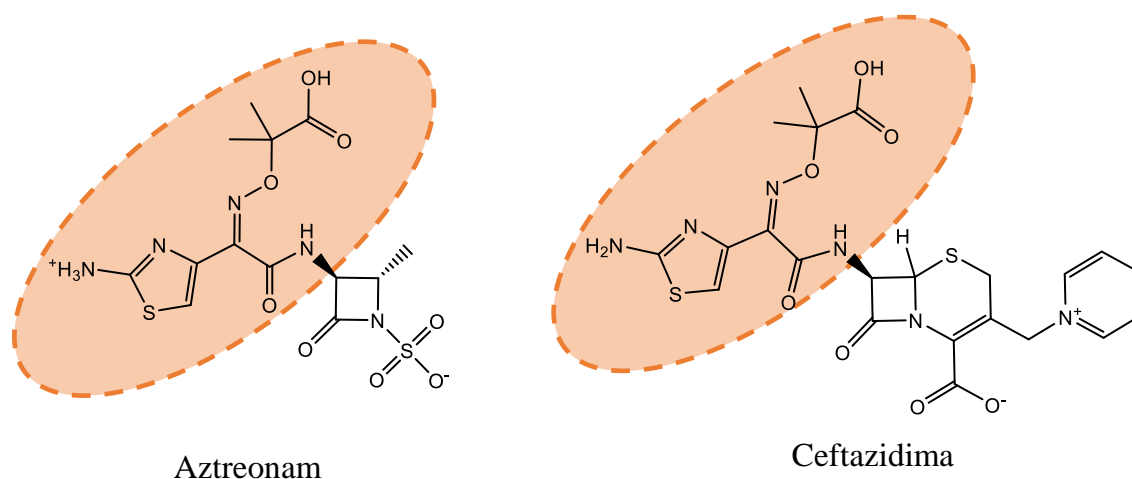


Figura 87. Estructura química Aztreonam y Ceftazidima. En sombreado las cadenas laterales.

En el caso del Anti-CFT, aquellas cefalosporinas con una cadena R_1 similar a la CFT, como como CFD y CFO presentaban una mayor reactividad cruzada con este anticuerpo, que aquellas cefalosporinas que exhibían una cadena lateral R_1 diferente, como el CFC y CFL.

Por el contrario, el anticuerpo anti-PG exhibió reactividad cruzada con todos los miembros de esta familia de fármacos, independientemente de su cadena lateral (> 20 %). Además, la IgG anti-PG presenta una elevada reactividad cruzada (68 %) con cefoxitina (CFN). Atendiendo a la estructura química de estos fármacos (Figura 88) se observó que este antibiótico presenta en su cadena lateral un anillo tiolado de 5 miembros, similar al anillo tiazol presente en todos los antibióticos de la familia de las penicilinas. Ello apunta a que el reconocimiento de la IgG podría darse a través de este anillo.

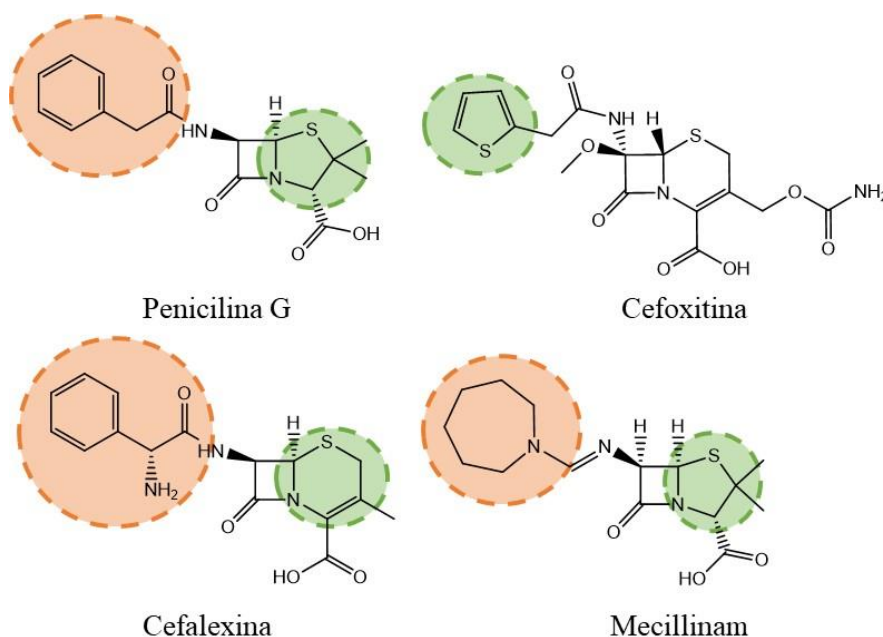


Figura 88. Estructura química de la PG y otros β -lactámicos.

Además, cuando se expone la IgG anti-PG frente a fármacos de otras familias con similar cadena R_1 como CFC y CFL, la reactividad observada fue menor al 10 %. Sin embargo, sí que se observa que el anticuerpo muestra interacción frente al mecillinam (MZL) cuya cadena lateral es diferente a la PG. Estos resultados indican que, para este anticuerpo, la cadena lateral presenta una mínima intervención en el reconocimiento y que el epítipo está formado principalmente por el anillo tiazol.

4.7.2. Mapeo de epítipos del anticuerpo específico frente a la PG

Los datos de reactividad cruzada frente a los diferentes antibióticos β -lactámicos permiten discernir cuales son las regiones de la molécula que pueden estar más implicadas en el reconocimiento por el anticuerpo. Sin embargo, no establece con claridad cuál es el

epítipo responsable del evento alérgico. Para conocer esta información hay que recurrir a otras técnicas más complejas, como RMN-STD. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para identificar y caracterizar interacciones receptor-ligando, principalmente en la industria farmacéutica, donde se ha utilizado para la obtención de nuevos fármacos específicos de alta afinidad a diversas biomoléculas diana, como células, receptores, proteínas, etc. Gracias a la robustez, selectividad y mínima concentración de receptor, del orden de nM, la técnica RMN-STD, se ha aplicado para el diseño y obtención de nuevos fármacos, el cribado de ligandos y el mapeo del epítipo de diversos bioreceptores.

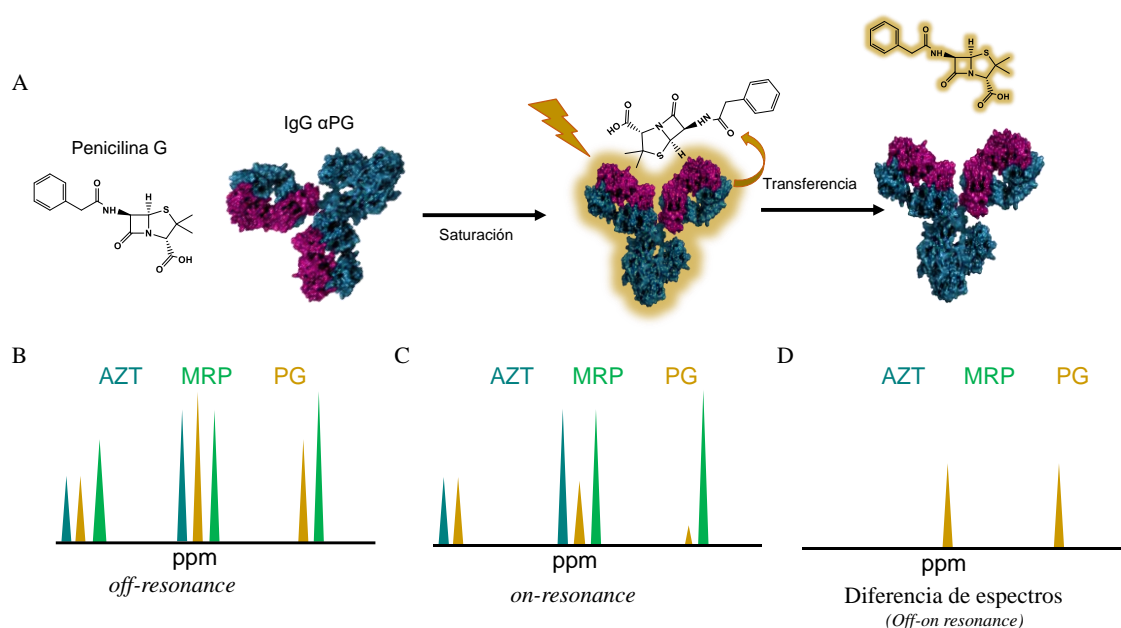


Figura 89. Diagrama del proceso de RMN-STD en la identificación de ligandos.

Proceso de transferencia selectiva de la magnetización de la proteína al ligando (A), espectro de RMN de los ligandos fuera de la resonancia (B), espectro de RMN de los ligandos en resonancia (C), diferencia entre espectros (D).

Esta técnica de resonancia magnética nuclear se basa en la transferencia de la magnetización entre el receptor y el ligando (Figura 89A) y consiste en comparar por diferencia dos espectros, uno obtenido mediante el experimento de RMN en condiciones de equilibrio térmico del ^1H de todas las especies que se encuentran en disolución fuera de la resonancia de las señales de las especies medidas, espectro *off-resonance* (Figura 89B), y un segundo experimento en el que las señales de ^1H de la proteína son saturadas mediante la aplicación de una radiofrecuencia de larga duración y baja potencia en una zona del espectro exclusiva de la biomolécula, espectro *on-resonance* (Figura 89C). Aquellos ligandos que interactúen específicamente con el bioreceptor presentarán

regiones a muy corta distancia, menos de 5 Å de la biomolécula, dando lugar a un proceso de transferencia de magnetización (NOE). Esta transferencia se traduce en una disminución de las señales de los núcleos de ^1H del ligando, en comparación a la obtenida en el espectro *off-resonance*. Sin embargo, aquellos ligandos que no interaccionen con el bioreceptor, no se encontrarán a suficiente distancia de éste, y, por ende, no se llevará a cabo el proceso de transferencia y las señales de los espectros no se verán afectadas. Comparando los espectros *off-resonance* y *on-resonance* se puede establecer que moléculas interaccionan con el receptor (Figura 89D).

Además, la diferencia de intensidad revela qué parte de la molécula se encuentra más cercana al receptor y, por lo tanto, interviene más en el reconocimiento (señales más intensas) y cuales menos (señales menos intensas), por lo que RMN-STD, es una técnica muy útil de mapeo de epítomos de moléculas pequeñas. Es por ello que se utilizó esta técnica para la determinación del epítomo que reconoce el anticuerpo específico a la PG como prueba de concepto. Para realizar este estudio de mapeo, en primer lugar, se seleccionaron los antibióticos a evaluar. Esta selección se realizó teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio de reactividad cruzada y las diferencias estructurales que presentaban las distintas moléculas frente al fármaco análogo. Por lo tanto, los β -lactámicos seleccionados para este estudio fueron: MZL, que exhibe una reactividad cruzada media (65 %) y una misma estructura cíclica pero distinta cadena lateral a la PG; CFN, que al igual que el anterior presenta una reactividad cruzada media (68 %) pero su estructura cíclica es diferente a la penicilina; AMX, cuya reactividad cruzada es media alta (84 %) y muestra similar cadena lateral a la penicilina; y PG, por ser el antibiótico análogo al anticuerpo a evaluar.

La determinación STD se realizó mediante el protocolo descrito en la sección 3.5 de Materiales y Métodos. Las señales de STD obtenidas para cada uno de los ^1H de los antibióticos se expresaron en término de intensidad STD_0 entendiendo esta como:

$$\text{Intensidad relativa (\%)} = \frac{\text{Intensidad del STD}_0 \text{ del } ^1\text{H a evaluar}}{\text{Intensidad máxima de STD}_0 \text{ obtenida}} \times 100 \text{ Ec. 7}$$

Como muestra la Figura 90, tras realizarse el STD relativo para cada fármaco, se observó que el anticuerpo presentó un reconocimiento similar a toda la estructura de PG. Sin embargo, en el caso de la AMX, el reconocimiento se dio principalmente en la estructura bicíclica del fármaco, aunque también reconoció la cadena lateral, pero en

menor proporción. En el caso de CFN y MZL, los datos concordaron con los expuestos anteriormente. La interacción entre el anticuerpo anti-PG y el CFN se produjo principalmente por el anillo tiolado que presenta en la cadena lateral, y la interacción con el MZL se produjo principalmente por la estructura bicíclica típica de la familia de las penicilinas. También fue evaluado el antibiótico MRP, no observándose señales, lo que indica que este fármaco no interacciona con el anticuerpo. Estos datos coinciden con los obtenidos en el ensayo de reactividad cruzada y confirman la selectividad del anticuerpo.

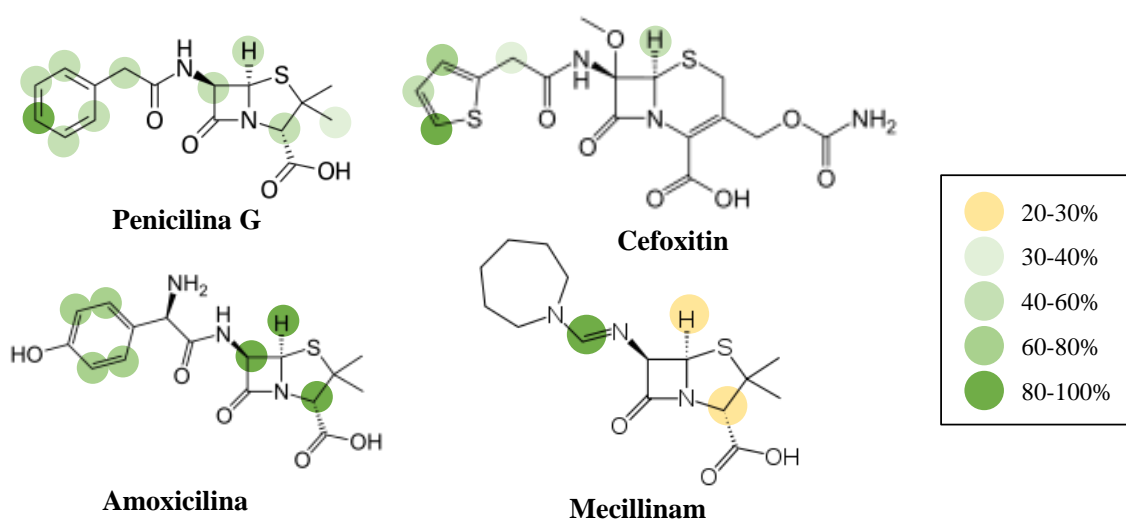


Figura 90. Intensidad relativa obtenida mediante RMN STD entre el anticuerpo IgG anti-PG y los antibióticos β -lactámicos.

4.7.3. Evaluación de la reactividad cruzada con muestras de pacientes alérgicos

Para corroborar los resultados obtenidos anteriormente se evaluaron muestras de suero sanguíneo de pacientes alérgicos a penicilinas con los distintos antígenos β -lactámicos que dieron resultado positivo con IgG anti-PG, siguiendo el ensayo indirecto de cuatro etapas usando GAM-HRP (sección 3.6.3A de Materiales y métodos). Este estudio sólo se realizó con muestras de paciente alérgicos a la familia de las penicilinas puesto que el CFT, el AZT y el MRP, son fármacos menos prescritos y no se pudo disponer de pacientes sensibilizados a estos antibióticos con los que se puedan estudiar y establecer patrones de sensibilización. Las señales obtenidas para cada antígeno fueron cuantificadas mediante calibración heteróloga en suero sanguíneo ya que no existe ningún

material de referencia que permita establecer una calibración homóloga para los antibióticos utilizados en este estudio.

Tabla 24. Concentración de sIgE frente a diversos β -lactámicos en muestras de pacientes con IgE específica frente a PG y AMX.

Paciente	AMX (UI/mL)	PG (UI/mL)	AMP (UI/mL)	PPR (UI/mL)	CRB (UI/mL)	TCC (UI/mL)	CFN (UI/mL)	MZL (UI/mL)
1	0.26 ± 0.08	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
2	<6.5	<6.5	<6.5	1.56 ± 0.57	1.70 ± 0.48	5.08 ± 1.02	0.35 ± 0.11	1.53 ± 0.38
3	0.32 ± 0.10	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
6	0.54 ± 0.16	< LOD	0.47 ± 0.14	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
8	6.18 ± 1.85	1.54 ± 0.35	1.65 ± 0.41	0.35 ± 0.11	1.56 ± 0.49	1.56 ± 0.47	< LOD	0.56 ± 0.18
9	1.30 ± 0.39	< LOD	0.37 ± 0.11	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
16	0.11 ± 0.05	< LOD	0.21 ± 0.09	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
17	0.69 ± 0.21	0.79 ± 0.24	1.03 ± 0.29	0.39 ± 0.18	0.79 ± 0.24	0.60 ± 0.15	0.48 ± 0.14	1.03 ± 0.28
18	0.67 ± 0.27	1.06 ± 0.35	0.33 ± 0.10	2.77 ± 0.47	ND	ND	< LOD	1.32 ± 0.27
19	0.75 ± 0.29	0.97 ± 0.29	1.98 ± 0.42	1.66 ± 0.42	ND	ND	< LOD	0.50 ± 0.17
20	0.83 ± 0.12	0.82 ± 0.30	0.49 ± 0.15	0.35 ± 0.17	0.44 ± 0.11	0.39 ± 0.15	< LOD	0.26 ± 0.12
21	<6.5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
27	0.77 ± 0.15	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
29	0.28 ± 0.12	0.33 ± 0.12	0.37 ± 0.08	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
32	0.47 ± 0.18	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
33	0.43 ± 0.09	< LOD	0.15 ± 0.07	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
37	0.19 ± 0.07	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
40	0.77 ± 0.23	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
43	<6.5	<6.5	<6.5	1.60 ± 0.35	5.13 ± 0.98	2.40 ± 0.72	0.47 ± 0.12	0.90 ± 0.21
52	0.72 ± 0.13	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

Como se observa en la Tabla 24, todas las muestras de pacientes que presentaron una concentración de sIgE anti-PG por encima de 0.35 UI/mL exhibieron reactividad frente a todos los fármacos de la familia de las penicilinas, independientemente de la cadena lateral. Como ocurría al evaluar la sIgG anti-PG de conejo, la IgE de las muestras de suero de pacientes alérgicos interaccionaban con los antígenos preparados con los antibióticos TCC y MZL, cuya cadena lateral presenta poca similitud con la PG o la AMX. Además, se observó que aquellas muestras que presentaban una elevada concentración de sIgE a PG, como es el caso de los pacientes 2, 17 y 43, mostraban reactividad cruzada con el antígeno de CFN. Estos resultados confirmaron la hipótesis de que el reconocimiento IgE-antígeno se produce principalmente por el anillo tiazolidina, común en todos los fármacos de la familia de las penicilinas.

En el caso de los pacientes que presentan IgE específica frente a AMX, pero no frente a PG se observó que existen dos patrones de sensibilización diferentes. El 20 % de

las muestras presentaron reactividad frente a la AMP. Al comparar las estructuras químicas de las aminopenicilinas con PG (Tabla 4), se observa que la única diferencia estructural se encuentra en el grupo amino de la cadena lateral. Así pues, este grupo parece estar fuertemente involucrado en el proceso de sensibilización. Por el contrario, el 60 % de las muestras sólo exhibieron reactividad frente a AMX. Este elevado porcentaje podría deberse a una falta de sensibilidad por el antígeno de AMP. Sin embargo, si se comparan las concentraciones de sIgE obtenidas para el antígeno de AMX con los del antígeno de AMP, se observa que hay muestras con una elevada concentración de IgE anti-AMX (> 3.5 UI/mL) que no presentan reactividad frente al antígeno de AMP, como es el caso del paciente 21. Por el contrario, se observa que otras con una baja concentración de IgE específica frente a AMX (< 0.35 UI/mL), presentan reactividad frente a la AMP, como es el caso de los pacientes 16 y 29. Estos resultados permiten concluir que esta falta de respuesta frente a AMP se debe a un reconocimiento selectivo a AMX.

4.7.4. Evaluación de la reactividad cruzada con otras estructuras hapténicas.

Diversos estudios han esclarecido que el determinante mayor, generado tras la ruptura del anillo β -lactámico es el metabolito mayoritario y por lo tanto el principal causante de la respuesta alérgica. A pesar de ser considerado el determinante antigénico principal, se ha observado que el uso de los determinantes antigénicos minoritarios, “determinantes menores”, son necesarios para mejorar el diagnóstico clínico de este tipo de alergias.

Con el fin de mejorar la sensibilidad clínica del ensayo *in vitro* desarrollado, y elucidar nuevos patrones de sensibilización, se prepararon antígenos con dos tipos de haptenos. Por un lado, el antígeno se obtuvo con el hapteno minoritario más estudiado (*-llanyl*), unido a la proteína mediante el grupo carboxílico libre del anillo tiazolo (Ruta B) y por otro lado un antígeno preparado mediante la conjugación de la PG, por el carbono activado en α de la cadena lateral, con los grupos amino libres de la proteína H1 mediante la reacción de Mannich (ruta C). El producto generado mediante la reacción de Mannich modifica mínimamente la estructura química del antibiótico, sin embargo, cambia su disposición espacial, ampliando el abanico de los patrones de reconocimiento.

Estos antígenos se evaluaron con las 101 muestras de suero humano estudiadas en esta tesis doctoral, siguiendo el ensayo indirecto de cuatro etapas utilizando GAM-HRP (sección 3.6.3^a de Materiales y Métodos). Los resultados de este estudio se compararon con los obtenidos para el antígeno anteriormente descrito H1-PG (ruta A).

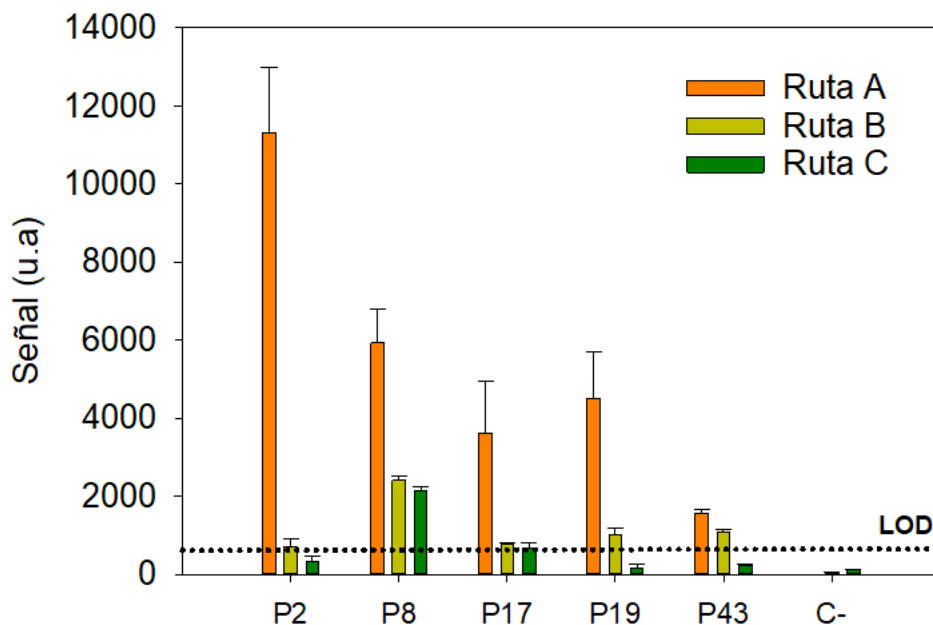


Figura 91. Resultado de analizar las muestras de pacientes alérgicos con antígenos formados por distintas rutas de conjugación.

En la Figura 91 se muestran los resultados de analizar sueros de pacientes positivos a los antígenos preparados con los determinantes menores (ruta B y C). Como se puede observar sólo 5 (P2, P8, P17, P19, P43) de 52 muestras de pacientes alérgicos evaluados mostraron resultados por encima del LOD. Además, las muestras de pacientes que reconocieron los antígenos formados por la ruta B y C también generaron respuesta frente al antígeno preparados mediante la ruta A, sin embargo, esta última fue mayor. En el caso del estudio comparativo de las rutas B y C, se observó que el antígeno preparado por la ruta B exhibía una mejor respuesta frente a la IgE de las muestras de pacientes, que el antígeno preparado mediante la ruta C, ya que para este último sólo la muestra del paciente 8 mostró un resultado positivo.

A pesar de que el uso de los determinantes menores de PG y AMX no mejoró la sensibilidad clínica del ensayo *in vitro* desarrollado, se prepararon antígenos del resto de

β -lactámicos de la familia de las penicilinas (AMX, AMP, CRB, MZL, PPR, TCC) siguiendo la ruta de conjugación B, para ampliar la información analítica.

Los resultados de la evaluación de los antígenos con 101 muestras de suero de pacientes alérgicos y controles, siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.6.3A, revelaron que, únicamente los antígenos preparados con el determinante menor (*-llanyl*) de los antibióticos CRB (H1-CRB-B) y TCL (H1-TCR-B) eran capaces de detectar IgE específica en muestras que resultaban negativas con el determinante mayor (Tabla 25).

Las muestras de suero de los pacientes 2, 17, 19 y 43 que presentaban reactividad frente al determinante mayor, también lo mostraban frente al menor, aunque en menor medida, siendo la concentración de IgE frente a estos antígenos significativamente más baja. Las muestras de los pacientes 33, 45 y 47 no presentaron reactividad frente a ninguno de los antígenos de PG, sin embargo, sí respondieron positivamente para el antígeno H1-CRB-B.

Si observamos la estructura química de PG y CRB (Tabla 4) vemos que el CRB presenta una estructura idéntica a PG, a excepción de un grupo carboxílico en la cadena lateral, por lo que este grupo podría estar implicado en la formación del antígeno (Figura 92). Esta hipótesis se confirmó al observar que sólo los fármacos que presentaban en su cadena lateral un grupo carboxílico, como el TCC mostraban reactividad frente a estas muestras de pacientes.

Tabla 25. Reactividad de las muestras de pacientes alérgicos a los determinantes menores de PG, CRB y TCC.

Pacientes	H1-PG-B	H1-CRB-B	H1-TCC-B
2	0.12 ± 0.07	2.2 ± 0.70	3.46 ± 1.15
8	0.27 ± 0.07	< LOD	< LOD
17	0.11 ± 0.05	0.15 ± 0.08	0.13 ± 0.09
19	0.20 ± 0.08	0.47 ± 0.17	0.24 ± 0.12
33	< LOD	1.68 ± 0.35	0.43 ± 0.15
43	0.17 ± 0.05	0.23 ± 0.14	0.18 ± 0.07
45	< LOD	0.12 ± 0.09	< LOD
47	< LOD	6.4 ± 1.8	5.0 ± 1.9

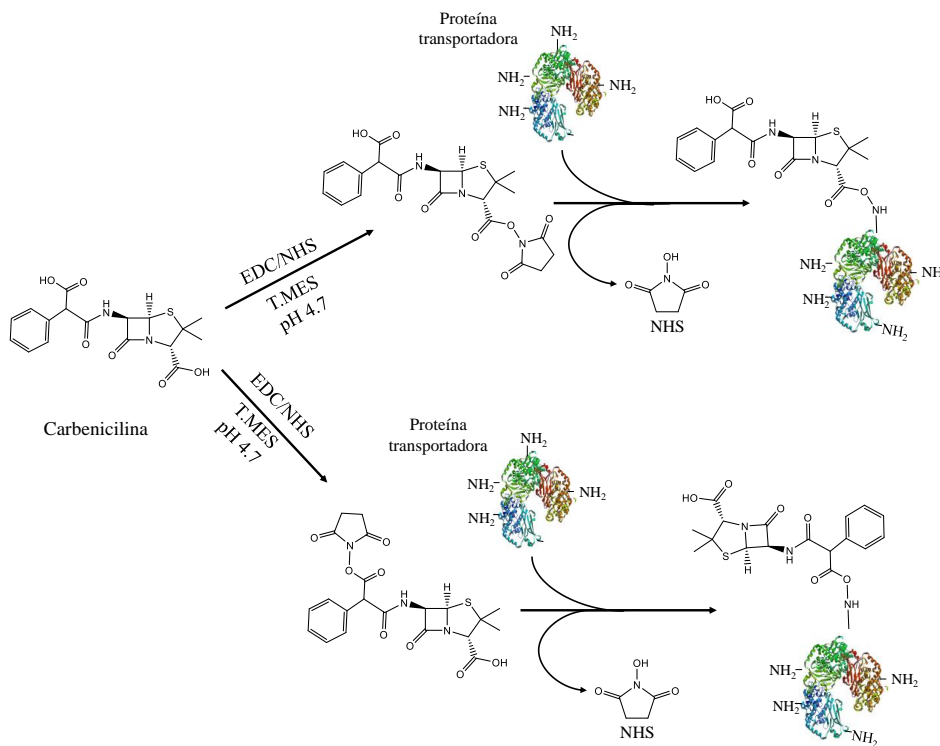


Figura 92. Mecanismo de unión de CRB a los grupos amino de la proteína mediante la química de la carbodiimida.

La incorporación de estos determinantes al panel de antígenos del ensayo de diagnóstico *in vitro* de alergias a β -lactámicos desarrollado, llevaría a un ligero aumento de la sensibilidad clínica, pasando de un 42 % a un 46 %, sin que se viera afectada su especificidad.

Por lo tanto, se ratifica que no sólo la estructura química del antibiótico o el transportador juega un papel esencial en el reconocimiento, sino que la vía de conjugación empleada y por lo tanto la exposición espacial del hapteno, es crucial para disponer de ensayos que permitan un correcto diagnóstico de pacientes.

De acuerdo a los resultados obtenidos tras el análisis de las muestras de pacientes con la batería de antígenos, éstos se clasificaron en cuatro grupos en función de su patrón de sensibilización (Tabla 26):

1. Patrón de sensibilización selectivo: la IgE presente en el suero de pacientes sólo muestra reactividad frente al antígeno de AMX. Este grupo de pacientes

podría tolerar cualquier otro antibiótico β -lactámico, incluso de la familia de las penicilinas.

2. Patrón de sensibilización semi-selectivo: la IgE de las muestras de pacientes reconoce la cadena lateral de las aminopenicilinas. Este grupo de pacientes podría tolerar los antibióticos de la familia de las penicilinas no aminados y cualquiera del resto de las familias que presenten una cadena lateral diferente a las aminopenicilinas.
3. Patrón de sensibilización no-selectivo: la IgE contenida en las muestras de suero de pacientes presenta reactividad frente a todos los miembros de la familia de las penicilinas, y en rara ocasiones a cefalosporinas con grupos tiofeno en su cadena lateral. Este grupo de pacientes podrían tolerar β -lactámicos de otras familias, como las monobactamas, carbapenemas y la mayoría de las cefalosporinas.
4. Patrón de sensibilización carboxílico: la IgE de los pacientes muestra reactividad frente a antígenos preparados mediante la conjugación de los antibióticos a través de su cadena lateral. Este grupo de pacientes al igual que el anterior no muestra una respuesta selectiva, pudiendo reaccionar a cualquier β -lactámico de la familia de las penicilinas.

Tabla 26. Clasificación de pacientes siguiendo el criterio del patrón de reconocimiento.

Paciente	Clase	Paciente	Clase	Paciente	Clase
1	1	18	3	37	1
2	3	19	3	40	1
3	1*	20	3	41	3
6	2	21	1	43	3
8	3	27	1	45	4
9	2*	29	3	47	4
16	2	32	1	49	3
17	3	33	4	52	1

*Muestra reactividad únicamente frente a AMX o AMX/AMP, sin embargo, el fármaco causante de alergia es una cefalosporina con cadena lateral distinta a las penicilinas, por lo que en este caso el patrón de reconocimiento podría ser el anillo β -lactámico.

Esta clasificación es de gran utilidad ya que permitiría establecer posibles tratamientos alternativos, evitando el uso de otros fármacos menos eficaces y seguros sin necesidad a recurrir a pruebas más invasivas como el *prick test* o el ensayo de provocación que podría generar una respuesta anafiláctica o procesos de sensibilización con otros β -lactámicos.

4.8. Comparación de los resultados obtenidos en un inmunoensayo *in vitro* multianalito simultaneo mediante tecnología de disco compacto en dos formatos: manual y semiautomatizado

La automatización es uno de los mayores retos en el desarrollo de un ensayo *in vitro* para la determinación de biomarcadores. Sin embargo, ésta es útil para simplificar las operaciones del ensayo, integrar etapas de tratamiento y preconcentración de muestra y reducir errores asociados a la manipulación de reactivos, generando resultados más precisos y fiables.

Actualmente son pocas las pruebas de diagnóstico *in vitro* de alergias a fármacos que se encuentran automatizadas. La mayoría de ensayos se realizan con equipos muy voluminosos y de elevado coste, entre 15.000 € y más de 100.000 €, lo que implica un aumento del coste del ensayo, estimado en 29.6 € por alergen. Este coste y la nula portabilidad de los equipos conlleva que sólo puedan estar disponibles en grandes hospitales, y no en centros de atención primaria o centros especializados, ocasionando un aumento de las listas de espera y la saturación del sistema sanitario.

La concentración de los biomarcadores relacionados con la respuesta alérgica en suero sanguíneo, como la histamina, triptasa o la IgE, disminuye considerablemente con el tiempo desde que transcurre la respuesta alérgica, por lo que un aumento en las listas de espera puede llevar a un mal diagnóstico y a un aumento de falsos negativos en las pruebas *in vitro*. Esta generación de falsos negativos disminuye la sensibilidad clínica de estas pruebas, lo que conduce a que no sean incluidas en los protocolos regulares de diagnóstico de alergias, teniendo que recurrir a otras pruebas más invasivas y costosas.

En este contexto se desarrolló, en el marco del programa Horizonte 2020, el proyecto COBIOPHAD (Nº688448) cuyo objetivo fue desarrollar un sistema de diagnóstico *in vitro* de alergias a antibióticos β -lactámicos automático, robusto y de bajo coste. Ello incluía la preparación y selección de antígeno, el desarrollo de inmunoensayos

selectivos, el prototipado de un analizador (hardware) y el desarrollo de un software de gestión y análisis de resultados (Figura 93).

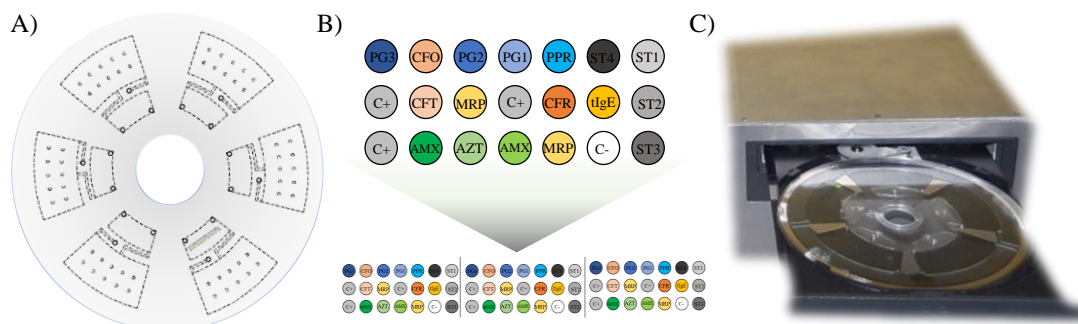


Figura 93. Componentes del ensayo *in vitro* de determinación de IgE específica a β -lactámicos enmarcado en el proyecto COBIOPHAD. Disco microfluídico semiautomatizado (A), esquema del microarray de antígenos (B) y analizador (C).

Tanto la puesta a punto del inmunoensayo como la selección de reactivos del ensayo semiautomatizado se realizó atendiendo a los resultados anteriormente descritos para el ensayo de determinación de sIgE en DVD. Además, aunque el ensayo semiautomatizado en disco desarrollado en el proyecto COBIOPHAD permite la determinación simultánea de un amplio panel de antígenos, en esta tesis nos centramos en la evaluación del reconocimiento que presentan las muestras de pacientes alérgicos y controles frente a H1-PG y H1-AMX.

4.8.1. Evaluación de las muestras de suero utilizando el sistema semiautomatizado basado en disco compacto

El desarrollo de una prueba *in vitro* cuantitativa requiere que los resultados estén expresados en unidades aceptadas por el sistema internacional, que puedan ser entendidas dentro del sector sanitario y comparables con otras pruebas *in vitro*. A pesar de que durante esta tesis se ha demostrado que el uso de una calibración homóloga mejora la correlación entre ensayos y la correcta cuantificación de IgE, actualmente el único patrón internacional aceptado por la OMS es un patrón de IgE total. Esta falta de patrones de calibración de IgE específica ocasiona que el único método de calibración validado se base en una interpolación heteróloga de las señales obtenidas en una curva de IgE total.

La curva de calibración heteróloga se obtuvo utilizando concentraciones crecientes de IgE total (0 - 50 UI/mL), y siguiendo el ensayo indirecto de cuatro etapas utilizando GAM-HRP descrito en el apartado 3.6.3A.

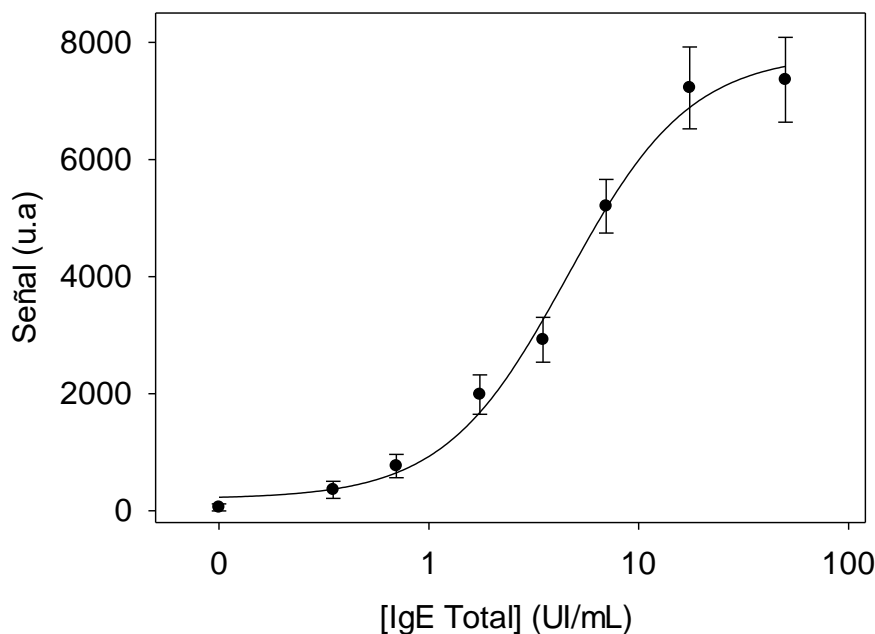


Figura 94. Curva de calibración heteróloga obtenida con el sistema semiautomatizado (n=10).

Este sistema mostró una buena sensibilidad analítica alcanzando un LOD y LOQ de 0.17 y 0.53 UI/mL, respectivamente (Figura 94). Estos valores se encuentran ligeramente por encima de los obtenidos en la calibración heteróloga del ensayo de disco compacto tipo DVD. Por otro lado, al igual que para el sistema en DVD la prueba *in vitro* semiautomatizada mostró un intervalo de trabajo de dos órdenes de magnitud (0.17 - 17.5 UI/mL).

Los resultados del análisis de las muestras de suero, tanto pacientes como controles, por duplicado, se muestran en las Tablas A2.6 y A2.7 del anexo 1. Como se observa en la Tabla, la reproducibilidad de los resultados de cuantificación de sIgE en las muestras de suero (RSD = 20 %) fue 1.7 más baja que la obtenida en el sistema DVD utilizando las calibraciones externas (RSD = 35 %). Por lo que concluyó que, el uso de un ensayo microfluídico mejoró la precisión de la determinación.

Con respecto a la exactitud, el ensayo semiautomatizado infracuantifica la concentración de sIgE presente en las muestras de suero, exhibiendo un porcentaje de recuperación medio de 36 % para ambos antígenos. Para confirmar estos resultados se

llevó a cabo el estudio de correlación de Pearson entre los resultados de sIgE del ensayo *in vitro* semiautomatizado con las concentraciones obtenidas mediante ImmunoCAP. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 95.

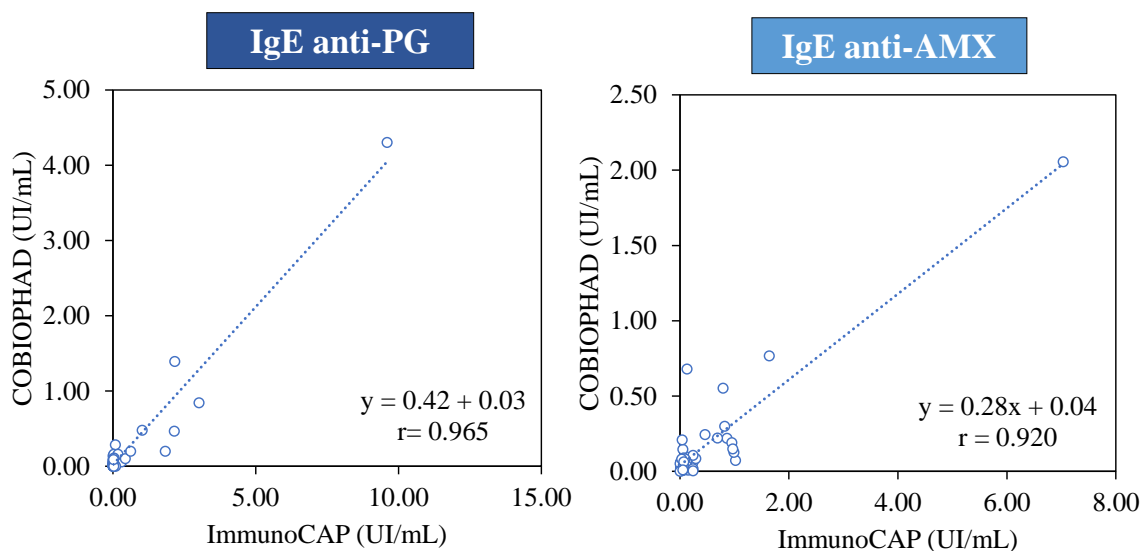


Figura 95. Estudio de correlación entre los resultados de concentración de IgE obtenidos por el sistema semiautomatizado (COBIOPHAD) basado en la tecnología de disco compacto e ImmunoCAP, para los antígenos H1-PG y H1-AMX.

La correlación entre ImmunoCAP y el ensayo semiautomatizado fue alta tanto para determinación de IgE anti-PG como para IgE anti-AMX, siendo $r > 0.9$, sin embargo, la pendiente de la recta fue baja (< 0.45). Estos resultados confirman que el sistema semiautomatizado basado en la tecnología de disco compacto infracuantifica considerablemente la concentración de IgE.

Al comparar los resultados de concentración de IgE específica medidos con el ensayo semiautomatizado con los obtenidos con el ensayo en disco tipo DVD mediante una correlación de Pearson, se observó que al igual que con ImmunoCAP, los dos sistemas correlacionaban bien ($r > 0.9$). Sin embargo, la concentración de IgE medida mediante el sistema semiautomatizado fue significativamente más baja que la obtenida con el ensayo en disco DVD en las mismas condiciones de calibración (calibración heteróloga), siendo la pendiente menor a 0.35, para los dos antígenos (Figura 96).

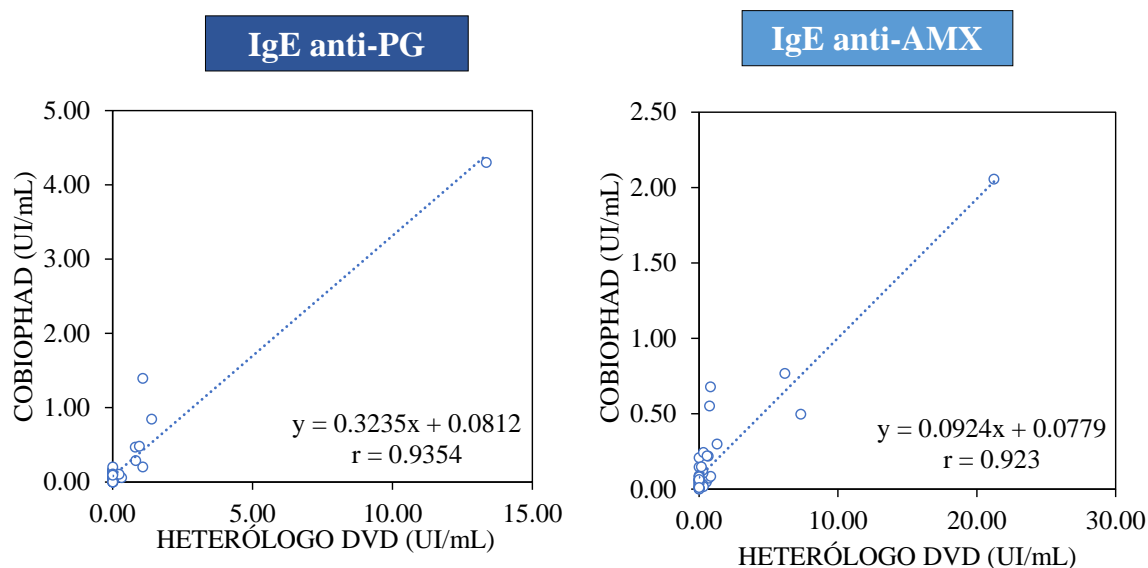


Figura 96. Estudio de correlación entre los resultados de concentración de IgE obtenidos por los sistemas basados en la tecnología de disco compacto manual (DVD) y semiautomatizado (COBIOPHAD), para los antígenos H1-PG y H1-AMX.

Sin embargo, ambos ensayos comparten tiempos de incubación, formato de ensayo, reactivos y antígenos, por lo que la infracuantificación de IgE debía estar provocada por la composición de la superficie. Para comprobar esta hipótesis, se inmovilizó el antígeno de PG (40 mg/L) sobre dos portaobjetos, uno de PC y el otro de COP, material del disco semiautomatizado, y tras una incubación de 16 horas a 37 °C, se llevó a cabo el ensayo indirecto de cuatro etapas usando GAM-HRP, descrito en la sección 3.6.3A, utilizando diferentes concentraciones (0-25 UI/mL) de qIgE anti-PG como muestra. Los resultados obtenidos tras el revelado con TMB se midieron, en este caso, utilizando un escáner documental.

Como se observa en la Figura 97, el ensayo realizado en PC mostró un LOQ más bajo que el obtenido para el ensayo realizado en COP, 0.8 y 2.5 UI/mL, respectivamente. Estaba menor sensibilidad analítica en la superficie de COP puede ser consecuencia a un menor rendimiento de inmovilización de los antígenos, lo cual afectaría a las prestaciones analíticas del ensayo.

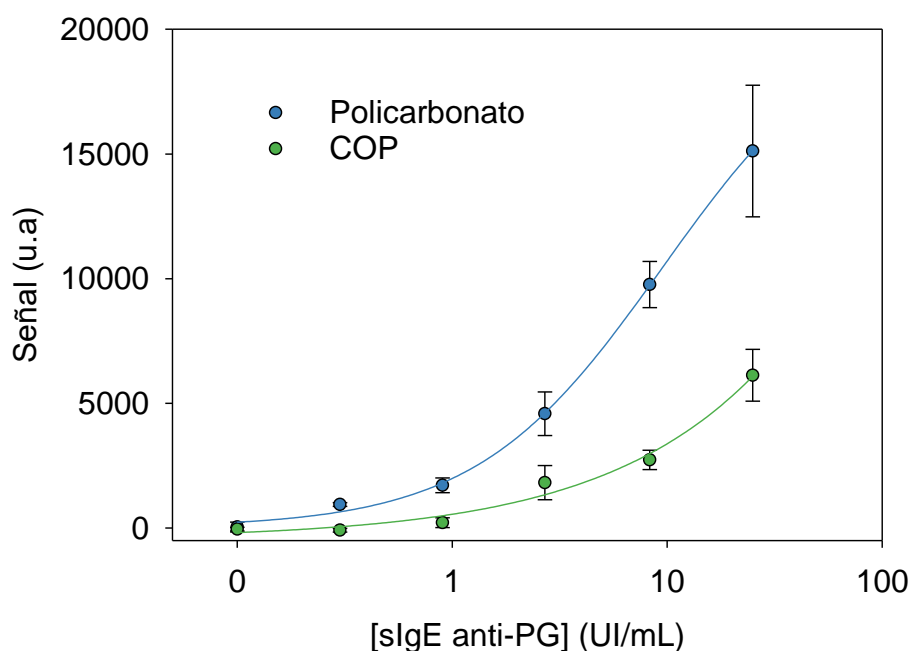


Figura 97. Respuesta de la IgE específica frente a antígenos inmovilizados mediante adsorción pasiva en PC y COP.

4.8.2. Evaluación de las prestaciones clínicas del ensayo *in vitro* semiautomatizado

Las prestaciones clínicas que presenta el ensayo semiautomatizado de diagnóstico *in vitro* de alergias a antibióticos β -lactámicos basado en la tecnología de disco compacto se establecieron tras el análisis de un conjunto de 101 muestras de pacientes alérgicos (52) y controles (49), y se comparó con las prestaciones obtenidas tanto por el ensayo manual desarrollado durante esta tesis doctoral como por el sistema actual de referencia (ImmunoCAP). Estableciendo como valor umbral el LOD del ensayo *in vitro* semiautomatizado, se obtuvo una sensibilidad clínica del 13.5 y 21.2 % para la determinación de IgE específica frente a PG y AMX, respectivamente (Tabla 27), y una especificidad clínica del 100 % para ambos alérgenos.

La comparación de las prestaciones clínicas de los sistemas *in vitro* se determinó mediante las curvas ROC (Figura 98). Las pruebas *in vitro* COBIOPHAD e ImmunoCAP, mostraron similares valores de AUC tanto para AMX como PG y similar sensibilidad clínica, 13.5 % y 15.4 % para el antígeno de PG, y 21.3 % y 23.1 % para el antígeno de AMX, respectivamente. Es importante mencionar que el 75 % de las muestras de suero

de pacientes que mostraron resultados positivos en la prueba *in vitro* ImmunoCAP, también presentaron valores de IgE específica por encima del LOD en el ensayo *in vitro* semiautomatizado. Por lo tanto, podemos concluir que el ensayo semiautomatizado basado en la tecnología de disco compacto es muy prometedor ya que presenta similar sensibilidad y especificidad clínica que el inmunoensayo de referencia, y además permite la determinación multiplex de IgE específica a 10 β -lactámicos diferentes, lo que lleva una reducción del volumen de muestra, tiempo y coste del ensayo.

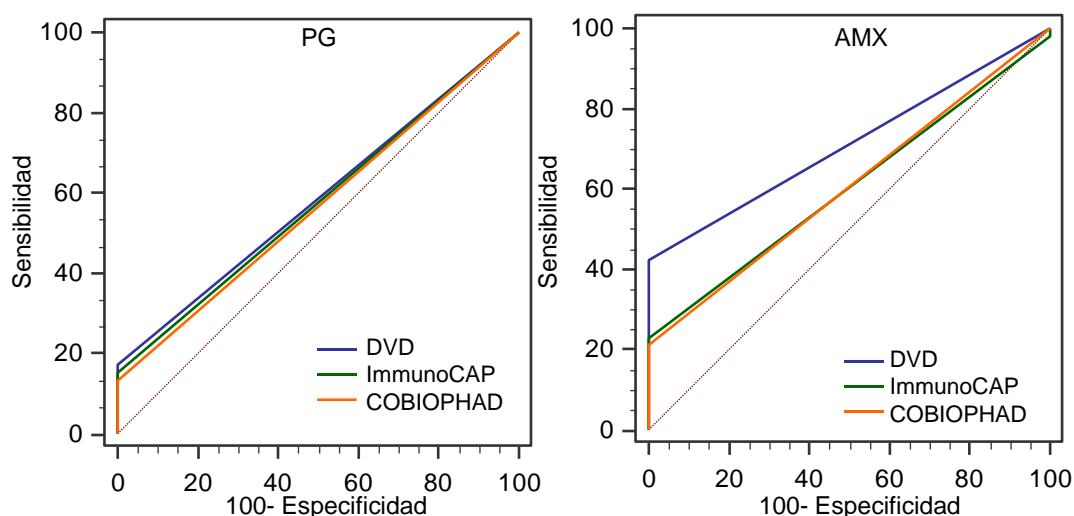


Figura 98. Curva ROC comparativa entre los sistemas basados en disco compacto, manual (DVD) y semiautomatizado (COBIOPHAD), e ImmunoCAP para los antígenos de PG y AMX.

Es importante destacar que mejorar el rendimiento de inmovilización de los antígenos, mediante tratamiento químico de la superficie de COP, o el empleo de PC permitiría alcanzar una sensibilidad clínica similar a la obtenida en DVD. Estos resultados hacen del ensayo de determinación de sIgE basado en la tecnología de disco compacto, un método competitivo con los sistemas *in vitro* de referencia.

Tabla 27. Características y prestaciones clínicas obtenidas para los sistemas de detección de IgE específica a β -lactámicos basados en disco compacto, manual (DVD) y semiautomatizado (COBIOPHAD), e ImmunoCAP.

prueba <i>in vitro</i>	Corte (UI/mL)	IgE anti-PG			IgE anti-AMX		
		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	AUC	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	AUC
ImmunoCAP	0.35	15.4	100	0.577	23.1	100	0.606
DVD	0.12	17.3	100	0.587	42.4	100	0.712
COBIOPHAD	0.17	13.5	100	0.567	21.2	100	0.606

CONCLUSIONES

Las investigaciones realizadas han concluido con el desarrollo del primer inmunoensayo *in vitro* para la determinación simultánea de IgE específica de antibióticos β -lactámicos en suero humano mediante la tecnología de disco compacto. Este desarrollo ha implicado estudiar profusamente el efecto del formato de ensayo en las prestaciones analíticas y diagnósticas de la prueba *in vitro*, preparar, caracterizar y seleccionar antígenos de un amplio panel de antibióticos β -lactámicos y moléculas *carrier*, valorar diferentes estrategias de calibración y cuantificar niveles de IgE específicas y totales en muestras de suero humano de pacientes alérgicos y controles. Las conclusiones más relevantes en relación a los objetivos particulares propuestos en la tesis doctoral han sido las siguientes:

1. La adsorción pasiva de antígenos derivados de antibióticos β -lactámicos en la superficie de policarbonato de un disco compacto es una estrategia de inmovilización sencilla y práctica que proporciona unas muy buenas prestaciones analíticas al ensayo para la determinación de IgE específica en suero sanguíneo frente a las obtenidas por inmovilización covalente y directa de antibióticos β -lactámicos.
2. El formato de ensayo de cuatro etapas y el antígeno derivado de la histona H1 son clave para identificar pacientes alérgicos con niveles muy bajos de IgE específica ($< 0,35$ IU/mL) y discriminar sujetos control.
3. Los antígenos derivados de histona son una alternativa muy prometedora para el desarrollo de ensayos *in vitro* sensibles de alergia a fármacos. Estos antígenos son buenos reactivos para mimetizar la estructura del epítipo mayor causante de la producción de IgE específica a antibióticos β -lactámicos, mejorando el umbral de discriminación de pacientes y controles.
4. El uso de calibradores serológicos específicos de antibióticos β -lactámicos mejora la exactitud y precisión del ensayo desarrollado con respecto a la calibración heteróloga con el calibrador serológico de IgE total.
5. La calibración homóloga en combinación con el uso de una IgE quimérica específica de un antibiótico β -lactámico como patrón interno ha resultado una estrategia fiable para cuantificar IgE específica de penicilinas en suero de pacientes alérgicos. Además,

permite la estandarización de resultados, reduciendo las variaciones asociadas a la manipulación de la muestra.

6. El ensayo multiplex desarrollado ha permitido establecer patrones de sensibilización, valorando simultáneamente la reactividad de las IgE de pacientes alérgicos frente a antígenos de diferentes antibióticos β -lactámicos. Esta información es especialmente útil para la prescripción de antibióticos β -lactámicos alternativos, lo que puede llevar a una reducción de costes derivados del uso de antibióticos menos eficaces y problemas asociados con la resistencia bacteriana.
7. Se ha identificado un nuevo epítipo como resultado de la unión del grupo carboxilato de la cadena lateral de las penicilinas con el grupo amino de la histona H1. Este antígeno aumenta significativamente la sensibilidad diagnóstica del ensayo y pone en valor la necesidad de identificar nuevas estructuras hapténicas que mimeticen mejor los epítipos potenciales de los antibióticos β -lactámicos con el fin de mejorar el diagnóstico *in vitro* de alergia.
8. El uso de plataformas microfluídicas avanzadas en base policarbonato, similares a las fabricadas en el marco del proyecto COBIOPHAD, y compatibles con el lector de disco compacto simplificarían el protocolo analítico, manteniendo las prestaciones analíticas del ensayo. Así pues, esta tesis proporciona las bases para la implementación prospectiva del dispositivo como herramienta analítica para realizar estudios *in vitro* de alergia a fármacos, alimentos y aeroalérgenos, así como para la monitorización del título de anticuerpos tipo IgE en terapias personalizadas basadas en fármacos biológicos derivados de anticuerpos recombinantes humanizados.

En conclusión, se ha desarrollado una metodología de ensayo basada en fundamentos inmunoquímicos y tecnología de disco compacto que proporciona información valiosa y complementaria del nivel de IgE circulante en suero sanguíneo para realizar un diagnóstico *in vitro* de alergia a fármacos más fiable que el de la prueba de referencia. La versatilidad, rapidez y simplicidad del ensayo permite su uso en centros de atención primaria, lo que facilitaría el cribado masivo de alergias, disminuyendo el tiempo que

transcurre entre el diagnóstico clínico y la reacción alérgica. La disminución de los tiempos de espera podría mejorar la sensibilidad diagnóstica, aumentando la fiabilidad y proporcionando las pruebas clínicas necesarias para apoyar la toma de decisiones del alergólogo, y así mejorar el diseño de estrategias terapéuticas personalizadas y avanzar en la identificación de pacientes mal etiquetados como alérgicos a β -lactámicos para proceder a su desetiquetado.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Doña, I.; Blanca-López, N.; Torres, M. J.; García-Campos, J.; García-Núñez, I.; Gómez, F.; Salas, M.; Rondón, C.; Canto, M. G.; Blanca, M. *Drug Hypersensitivity Reactions: Response Patterns, Drug Involved, and Temporal Variations in a Large Series of Patients*; 2012; Vol. 22.
- (2) Greiwe, J.; Bernstein, J. A. In Vitro and In Vivo Tests for Drug Hypersensitivity Reactions. In *Drug Allergy Testing*; Elsevier, 2018; pp 85–95.
- (3) Trubiano, J. A.; Stone, C. A.; Grayson, M. L.; Urbancic, K.; Slavin, M. A.; Thursky, K. A.; Phillips, E. J. The 3 Cs of Antibiotic Allergy—Classification, Cross-Reactivity, and Collaboration. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 2017, 5 (6), 1532–1542..
- (4) Ariza, A.; Fernández, T. D.; Bogas, G.; Torres, M. J.; Mayorga, C. How Mechanism Knowledge Can Help to Management of Drug Hypersensitivity. *Curr Treat Options Allergy* 2020, 7, 14–31.
- (5) Blanca, M.; Romano, A.; Torres, M. J.; Fernández, J.; Mayorga, C.; Rodriguez, J.; Demoly, P.; Bousquet, P. J.; Merk, H. F.; Sanz, M. L.; Ott, H.; Atanasković-Marković, M. Update on the Evaluation of Hypersensitivity Reactions to Betalactams. *Allergy* 2009, 64 (2).
- (6) McNeil, B. D.; Pundir, P.; Meeker, S.; Han, L.; Udem, B. J.; Kulka, M.; Dong, X. Identification of a Mast-Cell-Specific Receptor Crucial for Pseudo-Allergic Drug Reactions. *Nature* 2015, 519 (7542), 237–241..
- (7) Porebski, G.; Kwiecien, K.; Pawica, M.; Kwitniewski, M. Mas-Related G Protein-Coupled Receptor-X2 (MRGPRX2) in Drug Hypersensitivity Reactions. *Front. Immunol.* 2018, 9, 3027.
- (8) Mayorga, C.; Muñoz-Cano, R.; Rodríguez-Nogales, A.; Fernandez-Santamaría, R.; Fernandez, T. D. New Insights of Biomarkers in IgE and Non-IgE-Mediated Drug Hypersensitivity. *Curr. Treat. Options Allergy* 2019, 6 (1), 42–55.
- (9) Subramanian, H.; Gupta, K.; Ali, H. Roles of Mas-Related G Protein–Coupled Receptor X2 on Mast Cell–Mediated Host Defense, Pseudoallergic Drug Reactions, and Chronic Inflammatory Diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Mosby Inc. September 1, 2016, pp 700–710.
- (10) Montañez, M. I.; Mayorga, C.; Bogas, G.; Barrionuevo, E.; Fernandez-Santamaria, R.; Martin-Serrano, A.; Laguna, J. J.; Torres, M. J.; Fernandez, T. D.; Doña, I. Epidemiology, Mechanisms, and Diagnosis of Drug-Induced Anaphylaxis. *Front. Immunol.* 2017, 8 (MAY), 1–10.
- (11) Vassallo, R. Review: IgA Anaphylactic Transfusion Reactions. Part I. Laboratory Diagnosis, Incidence, and Supply of IgA-Deficient Products. *undefined* 2004.
- (12) Sandler, S. G.; Mallory, D.; Malamut, D.; Eckrich, R. IgA Anaphylactic Transfusion Reactions. *Transfus. Med. Rev.* 1995, 9 (1), 1–8.
- (13) Muñoz-Cano, R. M.; Bartra, J.; Picado, C.; Valero, A. Mechanisms of Anaphylaxis beyond IgE. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. ESMON Publicidad S.A. 2016, pp 73–82.
- (14) Finkelman, F. D.; Khodoun, M. V; Strait, R.; Cincinnati, O. Human IgE-Independent Systemic Anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016, 137, 1674–1680.
- (15) Kishimoto, T. K.; Viswanathan, K.; Ganguly, T.; Elankumaran, S.; Smith, S.; Pelzer, K.; Lansing, J. C.; Sriranganathan, N.; Zhao, G.; Galcheva-Gargova, Z.; Al-Hakim, A.; Bailey, G. S.; Fraser, B.; Roy, S.; Rogers-Cotrone, T.; Buhse, L.; Whary, M.; Fox, J.; Nasr,

- M.; Dal Pan, G. J.; Shriver, Z.; Langer, R. S.; Venkataraman, G.; Austen, K. F.; Woodcock, J.; Sasisekharan, R. Contaminated Heparin Associated with Adverse Clinical Events and Activation of the Contact System. *N. Engl. J. Med.* 2008, 358 (23), 2457–2467.
- (16) Mertes, P. M.; Laxenaire, M. C. Anaphylactic and Anaphylactoid Reactions Occurring during Anaesthesia in France. Seventh Epidemiologic Survey (January 2001–December 2002). *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 2004, 23 (12), 1133–1143.
- (17) Pichler, W. J. Immune Pathomechanism and Classification of Drug Hypersensitivity. *Allergy* 2019, 74 (8), all.13765.
- (18) Franceschini, F.; Bottau, P.; Caimmi, S.; Cardinale, F.; Crisafulli, G.; Liotti, L.; Saretta, F.; Bernardini, R.; Mori, F.; Caffarelli, C. Mechanisms of Hypersensitivity Reactions Induced by Drugs. *Acta Biomed* 2019, 90, 44–51.
- (19) Pichler, W. J. Consequences of Drug Binding to Immune Receptors: Immune Stimulation Following Pharmacological Interaction with Immune Receptors (T-Cell Receptor for Antigen or Human Leukocyte Antigen) with Altered Peptide-Human Leukocyte Antigen or Peptide. *Dermatologica Sinica*. No longer published by Elsevier December 1, 2013, pp 181–190.
- (20) Roujeau, J. C. Immune Mechanisms in Drug Allergy. *Allergology International*. Japanese Society of Allergology January 1, 2006, pp 27–33.
- (21) Ariza, A.; Mayorga, C.; Fernández, T. D.; Barbero, N.; Martín-Serrano, A.; Pérez-Sala, D.; Sánchez-Gómez, F. J.; Blanca, M.; Torres, M. J.; Montañez, M. I. Hypersensitivity Reactions to SS-Lactams: Relevance of Hapten-Protein Conjugates. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2015, 25 (1), 12–25.
- (22) Warrington, R. Drug Allergy: Causes and Desensitization. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. Landes Bioscience 2012, pp 1513–1524.
- (23) Matzinger, P. Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annual Review of Immunology*. Annual Reviews Inc. 1994, pp 991–1045.
- (24) Blanca-Lopez, N.; Jimenez-Rodriguez, T. W.; Somoza, M. L.; Gomez, E.; Al-Ahmad, M.; Perez-Sala, D.; Blanca, M. Allergic Reactions to Penicillins and Cephalosporins: Diagnosis, Assessment of Cross-Reactivity and Management. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2019, 15 (7), 707–721.
- (25) Marín, M. Antibióticos Betalactámicos. 2003, 21 (1), 42–55.
- (26) Lima, L. M.; Silva, B. N. M. da; Barbosa, G.; Barreiro, E. J. β -Lactam Antibiotics: An Overview from a Medicinal Chemistry Perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson s.r.l. December 15, 2020, p 112829.
- (27) Montañez, M. I.; Ariza, A.; Mayorga, C.; Fernandez, T. D.; Torres, M. J. Cross-Reactivity in Betalactam Allergy: Alternative Treatments. *Curr. Treat. Options Allergy* 2015, 2 (2), 141–154. <https://doi.org/10.1007/s40521-015-0050-4>.
- (28) Yvon, M.; Anglade, P.; Wal, J. M. Identification of the Binding Sites of Benzyl Penicilloyl, the Allergenic Metabolite of Penicillin, on the Serum Albumin Molecule. *FEBS Lett.* 1990, 263 (2), 237–240.
- (29) Yvon, M.; Wal, J. M. Identification of Lysine Residue 199 of Human Serum Albumin as a Binding Site for Benzylpenicilloyl Groups. *FEBS Lett.* 1988, 239 (2), 237–240.
- (30) LEVINE, B. B.; OVARY, Z. Studies on the Mechanism of the Formation of the Penicillin Antigen. III. The N-(D-Alpha-Benzylpenicilloyl) Group as an Antigenic Determinant Responsible for Hypersensitivity to Penicillin G. *J. Exp. Med.* 1961, 114 (6), 875–904.

-
- (31) Batchelor, F. R.; Dewdney, J. M.; Gazzard, D. Penicillin Allergy: The Formation of the Penicilloyl Determinant. *Nature* 1965, 206 (4982), 362–364.
- (32) Baldo, B. A. IgE and Drug Allergy: Antibody Recognition of ‘Small’ Molecules of Widely Varying Structures and Activities. *Antibodies* 2014, Vol. 3, Pages 56-91 2014, 3 (1), 56–91.
- (33) Geng, B.; Eastman, J. J.; Mori, K.; Braskett, M.; Riedl, M. A. Utility of Minor Determinants for Skin Testing in Inpatient Penicillin Allergy Evaluation. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 2017, 119 (3), 258–261.
- (34) Voelker, D.; Pitlick, M.; Gonzalez-Estrada, A.; Park, M. Minor Determinants of Penicillin and Amoxicillin Are Still Key Components of Penicillin Skin Testing. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 2020.
- (35) Adkinson, N. F.; Mendelson, L. M.; Ressler, C.; Keogh, J. C. Penicillin Minor Determinants: History and Relevance for Current Diagnosis. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. American College of Allergy, Asthma and Immunology November 1, 2018, pp 537–544.
- (36) Bousquet, P. J.; Co-Minh, H. B.; Arnoux, B.; Daures, J. P.; Demoly, P. Importance of Mixture of Minor Determinants and Benzylpenicilloyl Poly-L-Lysine Skin Testing in the Diagnosis of β -Lactam Allergy [3]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. June 2005, pp 1314–1316.
- (37) Matheu, V.; Pérez-Rodríguez, E.; Sánchez-Machin, I.; De La Torre, F.; García-Robaina, J. C.; Bousquet, P. J.; Demoly, P. Major and Minor Determinants Are High-Performance Skin Tests in β -Lactam Allergy Diagnosis [6] (Multiple Letters). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Mosby Inc. 2005, pp 1167–1168.
- (38) Ho, H. P.; Lee, R. J.; Chen, C. Y.; Wang, S. R.; Li, Z. G.; Lee, M. R. Identification of New Minor Metabolites of Penicillin G in Human Serum by Multiple-Stage Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2011, 25 (1), 25–32.
- (39) Matas, S.; Broto, M.; Corominas, M.; Leonart, R.; Babington, R.; Marco, M. P.; Galve, R. Immediate Hypersensitivity to Penicillins. Identification of a New Antigenic Determinant. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018, 148, 17–23.
- (40) Torres, M. J.; Montañez, M. I.; Ariza, A.; Salas, M.; Fernandez, T. D.; Barbero, N.; Mayorga, C.; Blanca, M. The Role of IgE Recognition in Allergic Reactions to Amoxicillin and Clavulanic Acid. *Clin. Exp. Allergy* 2016, 46 (2), 264–274.
- (41) Torres, M. J.; Ariza, A.; Fernández, J.; Moreno, E.; Laguna, J. J.; Montañez, M. I.; Ruiz-Sanchez, A. J.; Blanca, M. Role of Minor Determinants of Amoxicillin in the Diagnosis of Immediate Allergic Reactions to Amoxicillin. *Allergy* 2010, 65 (5), 590–596.
- (42) Nägele, E.; Moritz, R. Structure Elucidation of Degradation Products of the Antibiotic Amoxicillin with Ion Trap MSn and Accurate Mass Determination by ESI TOF. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2005, 16 (10), 1670–1676.
- (43) De Haan, P.; De Jonge, A. J. R.; Verbrugge, T.; Boorsma, D. M. Three Epitope-Specific Monoclonal Antibodies against the Hapten Penicillin. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1985, 76 (1), 42–46.
- (44) Mayorga, C.; Obispo, T.; Jimeno, L.; Blanca, M.; Del Prado, J. M.; Carreira, J.; Garcia, J. J.; Juarez, C. Epitope Mapping of β -Lactam Antibiotics with the Use of Monoclonal Antibodies. *Toxicology*. Elsevier March 31, 1995, pp 225–234.
- (45) Fukushima, H.; Misaki, R.; Takeuchi, M.; Niinomi, Y.; Harada, M. Mouse Anti-

- Benzylpenicilloyl IgE Monoclonal Antibody: Preparation, Characterization and Cross-Reactivity. *Clin. Exp. Immunol.* 1987, 68 (2), 427–436.
- (46) Montañez, M. I.; Najera, F.; Mayorga, C.; Ruiz-Sanchez, A. J.; Vida, Y.; Collado, D.; Blanca, M.; Torres, M. J.; Perez-Inestrosa, E. Recognition of Multiepitope Dendrimeric Antigens by Human Immunoglobulin E. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2015, 11 (3), 579–588.
- (47) Perez-Inestrosa, E.; Suau, R.; Montanez, M. I.; Rodriguez, R.; Mayorga, C.; Torres, M. J.; Blanca, M. Cephalosporin Chemical Reactivity and Its Immunological Implications. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. Lippincott Williams and Wilkins 2005, pp 323–330.
- (48) Romano, A.; Valluzzi, R. L.; Caruso, C.; Maggioletti, M.; Quaratino, D.; Gaeta, F. Cross-Reactivity and Tolerability of Cephalosporins in Patients with IgE-Mediated Hypersensitivity to Penicillins. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 2018, 6 (5), 1662–1672.
- (49) Baldo, B. A. Penicillins and Cephalosporins as Allergens - Structural Aspects of Recognition and Cross-Reactions. *Clinical and Experimental Allergy*. Blackwell Publishing Ltd. 1999, pp 744–749.
- (50) Baldo, B. A.; Pham, N. H. Allergenic Significance of Cephalosporin Side Chains. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Mosby Inc. November 1, 2015, pp 1426–1428.
- (51) Romano, A.; Gaeta, F.; Valluzzi, R. L.; Maggioletti, M.; Zaffiro, A.; Caruso, C.; Quaratino, D. IgE-Mediated Hypersensitivity to Cephalosporins: Cross-Reactivity and Tolerability of Alternative Cephalosporins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015, 136 (3), 685–691.
- (52) Hasdenteufel, F.; Luyasu, S.; Renaudin, J. M.; Trechot, P.; Kanny, G. Anaphylactic Shock Associated with Cefuroxime Axetil: Structure-Activity Relationships. *Ann. Pharmacother.* 2007, 41 (6), 1069–1072.
- (53) Zhao, Z.; Baldo, B. A.; Baumgart, K. W.; Mallon, D. F. J. Fine Structural Recognition Specificities of IgE Antibodies Distinguishing Amoxicilloyl and Amoxicillanyl Determinants in Allergic Subjects. *J. Mol. Recognit.* 2001, 14 (5), 300–307.
- (54) Hasdenteufel, F.; Luyasu, S.; Hougardy, N.; Fisher, M.; Boisbrun, M.; Mertes, P.-M.; Kanny, G. Structure-Activity Relationships and Drug Allergy. *Curr. Clin. Pharmacol.* 2012, 7 (1), 15–27.
- (55) Peña-Mendizabal, E.; Morais, S.; Maquieira, Á. Neo-Antigens for the Serological Diagnosis of IgE-Mediated Drug Allergic Reactions to Antibiotics Cephalosporin, Carbapenem and Monobactam. *Sci. Reports 2020 101* 2020, 10 (1), 1–12.
- (56) Martín-Serrano, A.; Mayorga, C.; Barrionuevo, E.; Pérez, N.; Romano, A.; Moreno, E.; Ariza, A.; Pérez-Inestrosa, E.; Torres, M. J.; Montañez, M. I. Design of an Antigenic Determinant of Cefaclor: Chemical Structure–IgE Recognition Relationship. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2020.
- (57) Edwards, R. G.; Dewdney, J. M.; Dobrzanski, R. J.; Lee, D. Immunogenicity and Allergenicity Studies on Two Beta-Lactam Structures, a Clavam, Clavulanic Acid, and a Carbapenem: Structure-Activity Relationships. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1988, 85 (2), 184–189.
- (58) Shimizu, T.; Souma, S.; Nagakura, N.; Masuzawa, T.; Iwamoto, Y.; Yanagihara, Y. Epitope Analysis of Aztreonam by Anti-aztreonam Monoclonal Antibodies and Possible Consequences in Beta-Lactams Hypersensitivity. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1992, 98 (4), 392–397.

- (59) Sánchez-Morillas, L.; Pérez-Ezquerro, P. R.; Reaño-Martos, M.; Laguna-Martínez, J. J.; Sanz, M. L.; Martínez, L. M. Selective Allergic Reactions to Clavulanic Acid: A Report of 9 Cases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Elsevier July 1, 2010, pp 177–179.
- (60) Torres, M. J.; Ariza, A.; Mayorga, C.; Doña, I.; Blanca-Lopez, N.; Rondon, C.; Blanca, M. Clavulanic Acid Can Be the Component in Amoxicillin-Clavulanic Acid Responsible for Immediate Hypersensitivity Reactions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Mosby Inc. February 1, 2010, pp 502-505.
- (61) Blanca-Lopez, N.; Perez-Alzate, D.; Ruano, F.; Garcimartin, M.; De La Torre, V.; Mayorga, C.; Somoza, M. L.; Perkins, J.; Blanca, M.; Canto, M. G.; Torres, M. J. Selective Immediate Responders to Amoxicillin and Clavulanic Acid Tolerate Penicillin Derivative Administration after Confirming the Diagnosis. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 2015, 70 (8), 1013–1019.
- (62) Blanca, M.; Mayorga, C.; Perez, E.; Suau, R.; Juarez, C.; Vega, J. M.; Carmona, M. J.; Perez-Estrada, M.; Garcia, J. Determination of IgE Antibodies to the Benzyl Penicilloyl Determinant. A Comparison between Poly-L-Lysine and Human Serum Albumin as Carriers. *J. Immunol. Methods* 1992, 153 (1–2), 99–105.
- (63) Ariza, A.; Mayorga, C.; Salas, M.; Doña, I.; Martín-Serrano, Á.; Pérez-Inestrosa, E.; Pérez-Sala, D.; Guzmán, A. E.; Montañez, M. I.; Torres, M. J. The Influence of the Carrier Molecule on Amoxicillin Recognition by Specific IgE in Patients with Immediate Hypersensitivity Reactions to Betalactams. *Sci. Rep.* 2016, 6 (1), 35113.
- (64) Haginaka, J.; Nakagawa, T.; Uno, T. Stability of Clavulanic Acid in Aqueous Solutions. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 1981, 29 (11), 3334–3341.
- (65) Brethauer, S.; Held, M.; Panke, S. Clavulanic Acid Decomposition Is Catalyzed by the Compound Itself and by Its Decomposition Products. *J. Pharm. Sci.* 2008, 97 (8), 3451–3455.
- (66) Haginaka, J.; Yasuda, H.; Uno, T.; Nakagawa, T. Degradation of Clavulanic Acid in Aqueous Alkaline Solution: Isolation and Structural Investigation of Degradation Products. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 1985, 33 (1), 218–224.
- (67) Barbero, N.; Fernández-Santamaría, R.; Mayorga, C.; Martín-Serrano, Á.; Salas, M.; Bogas, G.; Nájera, F.; Pérez-Sala, D.; Pérez-Inestrosa, E.; Fernandez, T. D.; Montañez, M. I.; Torres, M. J. Identification of an Antigenic Determinant of Clavulanic Acid Responsible for IgE-mediated Reactions. *Allergy* 2019, 74 (8), all.13761.
- (68) Garcia, J. J.; Blanca, M.; Moreno, F.; Vega, J. M.; Mayorga, C.; Fernandez, J.; Juarez, C.; Romano, A.; De Ramon, E. Determination of IgE Antibodies to the Benzylpenicilloyl Determinant: A Comparison of the Sensitivity and Specificity of Three Radio Allergo Sorbent Test Methods. *J. Clin. Lab. Anal.* 1997, 11 (5), 251–257.
- (69) Fujiwara, K.; Shin, M.; Miyazaki, T.; Maruta, Y. Immunocytochemistry for Amoxicillin and Its Use for Studying Uptake of the Drug in the Intestine, Liver, and Kidney of Rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011, 55 (1), 62–71.
- (70) Azoury, M. E.; Fili, L.; Bechara, R.; Scornet, N.; de Chaisemartin, L.; Weaver, R. J.; Claude, N.; Maillere, B.; Parronchi, P.; Joseph, D.; Pallardy, M. Identification of T-Cell Epitopes from Benzylpenicillin Conjugated to Human Serum Albumin and Implication in Penicillin Allergy. *Allergy* 2018, 73 (8), 1662–1672.
- (71) Lee, P.; Wu, X. Review: Modifications of Human Serum Albumin and Their Binding Effect. *Curr. Pharm. Des.* 2015, 21 (14), 1862–1865.

- (72) Lafaye, P.; Lapresie, C. Fixation of Penicilloyl Groups to Albumin and Appearance of Anti-Penicilloyl Antibodies to Penicillin-Treated Patients. *J. Clin. Invest.* 1988, 82 (1), 7–12.
- (73) Jenkins, R. E.; Meng, X.; Elliott, V. L.; Kitteringham, N. R.; Pirmohamed, M.; Park, B. K. Characterisation of Flucloxacillin and 5-Hydroxymethyl Flucloxacillin Haptenated HSA in Vitro and in Vivo. *Proteomics - Clin. Appl.* 2009, 3 (6), 720–729.
- (74) Whitaker, P.; Meng, X.; Lavergne, S. N.; El-Ghaiesh, S.; Monshi, M.; Earnshaw, C.; Peckham, D.; Gooi, J.; Conway, S.; Pirmohamed, M.; Jenkins, R. E.; Naisbitt, D. J.; Park, B. K. Mass Spectrometric Characterization of Circulating and Functional Antigens Derived from Piperacillin in Patients with Cystic Fibrosis. *J. Immunol.* 2011, 187 (1), 200–211.
- (75) El-Ghaiesh, S.; Monshi, M. M.; Whitaker, P.; Jenkins, R.; Meng, X.; Farrell, J.; Elsheikh, A.; Peckham, D.; French, N.; Pirmohamed, M.; Park, B. K.; Naisbitt, D. J. Characterization of the Antigen Specificity of T-Cell Clones from Piperacillin-Hypersensitive Patients with Cystic Fibrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2012, 341 (3), 597–610.
- (76) Meng, X.; Jenkins, R. E.; Berry, N. G.; Maggs, J. L.; Farrell, J.; Lane, C. S.; Stachulski, A. V.; French, N. S.; Naisbitt, D. J.; Pirmohamed, M.; Park, B. K. Direct Evidence for the Formation of Diastereoisomeric Benzylpenicilloyl Haptens from Benzylpenicillin and Benzylpenicillic Acid in Patients. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011, 338 (3), 841–849.
- (77) Faulkner, L.; Meng, X.; Park, B. K.; Naisbitt, D. J. The Importance of Hapten-Protein Complex Formation in the Development of Drug Allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. Lippincott Williams and Wilkins 2014, pp 293–300.
- (78) Meng, X.; Earnshaw, C. J.; Taylor, A.; Jenkins, R. E.; Waddington, J. C.; Whitaker, P.; French, N. S.; Naisbitt, D. J.; Park, B. K. Amoxicillin and Clavulanate Form Chemically and Immunologically Distinct Multiple Haptenic Structures in Patients. *Chem. Res. Toxicol* 2016, 29, 12.
- (79) Garzon, D.; Ariza, A.; Regazzoni, L.; Clerici, R.; Altomare, A.; Sirtori, F. R.; Carini, M.; Torres, M. J.; Perez-Sala, D.; Aldini, G. Mass Spectrometric Strategies for the Identification and Characterization of Human Serum Albumin Covalently Adducted by Amoxicillin: Ex Vivo Studies. *Chem. Res. Toxicol.* 2014, 27 (9), 1566–1574.
- (80) Martin, S. F.; Esser, P. R.; Schmucker, S.; Dietz, L.; Naisbitt, D. J.; Park, B. K.; Vocanson, M.; Nicolas, J. F.; Keller, M.; Pichler, W. J.; Peiser, M.; Luch, A.; Wanner, R.; Maggi, E.; Cavani, A.; Rustemeyer, T.; Richter, A.; Thierse, H. J.; Sallusto, F. T-Cell Recognition of Chemicals, Protein Allergens and Drugs: Towards the Development of in Vitro Assays. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG August 18, 2010, pp 4171–4184.
- (81) Jenkins, R. E.; Yaseen, F. S.; Monshi, M. M.; Whitaker, P.; Meng, X.; Farrell, J.; Hamlett, J.; Sanderson, J. P.; El-Ghaiesh, S.; Peckham, D.; Pirmohamed, M.; Park, B. K.; Naisbitt, D. J. β -Lactam Antibiotics Form Distinct Haptenic Structures on Albumin and Activate Drug-Specific T-Lymphocyte Responses in Multiallergic Patients with Cystic Fibrosis. *Chem. Res. Toxicol.* 2013, 26 (6), 963–975.
- (82) Coleman, J. W. Protein Haptenation by Drugs. *Clin. Exp. Allergy, Suppl.* 1998, 28 (4), 79–82.
- (83) Magi, B.; Marzocchi, B.; Bini, L.; Cellesi, C.; Rossolini, A.; Pallini, V. Two-dimensional Electrophoresis of Human Serum Proteins Modified by Ampicillin during Therapeutic Treatment. *Electrophoresis* 1995, 16 (1), 1190–1192.

-
- (84) Ariza, A.; Collado, D.; Vida, Y.; Montañez, M. I.; Pérez-Inestrosa, E.; Blanca, M.; Torres, M. J.; Cañada, F. J.; Pérez-Sala, D. Study of Protein Haptenation by Amoxicillin through the Use of a Biotinylated Antibiotic. *PLoS One* 2014, 9 (3).
- (85) Martín-Serrano, Á.; Gonzalez-Morena, J. M.; Barbero, N.; Ariza, A.; Sánchez Gómez, F. J.; Pérez-Inestrosa, E.; Pérez-Sala, D.; Torres, M. J.; Montañez, M. I.; Yuan, W.; Lockridge, O.; Isabel Montañez, M. Biotin-Labelled Clavulanic Acid to Identify Proteins Target for Haptenation in Serum: Implications in Allergy Studies. 2020, 11.
- (86) Ariza, A.; Garzon, D.; Abánades, D. R.; de los Ríos, V.; Vistoli, G.; Torres, M. J.; Carini, M.; Aldini, G.; Pérez-Sala, D. Protein Haptenation by Amoxicillin: High Resolution Mass Spectrometry Analysis and Identification of Target Proteins in Serum. *J. Proteomics* 2012.
- (87) Sánchez-Gómez, F. J.; González-Morena, J. M.; Vida, Y.; Pérez-Inestrosa, E.; Blanca, M.; Torres, M. J.; Pérez-Sala, D. Amoxicillin Haptenates Intracellular Proteins That Can Be Transported in Exosomes to Target Cells. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 2017, 72 (3), 385–396.
- (88) Mayorga, C.; Sanz, M. L.; Gamboa, P. M.; García, B. E. In Vitro Diagnosis of Immediate Allergic Reactions to Drugs: An Update. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2010, 20 (2), 103–109.
- (89) Lew, A. M. The Effect of Epitope Density and Antibody Affinity on the ELISA as Analysed by Monoclonal Antibodies. *J. Immunol. Methods* 1984, 72 (1), 171–176.
- (90) Lee, D.; Dewdney, J. M.; Edwards, R. G. The Influence of Hapten Density on the Assay of Penicilloylated Proteins in Fluids. *J. Immunol. Methods* 1985, 84 (1–2), 235–243.
- (91) Vemuri, P.; Harris, K. E.; Suh, L. A.; Grammer, L. C. Preparation of Benzylpenicilloyl-Polylysine: A Preliminary Study. *Allergy Asthma Proc.* 2004, 25 (3), 165–168.
- (92) Caneva, E.; Di Gennaro, P.; Farina, F.; Orlandi, M.; Rindone, B.; Falagiani, P. Synthesis and Characterization of a Penicillin-Poly(L-Lysine) Which Recognizes Human IgE Anti-Penicillin Antibodies. *Bioconjug. Chem.* 1993, 4 (5), 309–313.
- (93) Blanca, M. . F. M. . M. F. . P. E. . M. C. . J. C. . & S. R. The Nature of the Carrier in the RAST Assay Influences... - Google Académico. *J. Clin. Immunoass.* 1994, 17, 166–170.
- (94) Zhao, Z.; Batley, M.; D'Ambrosio, C.; Baldo, B. A. In Vitro Reactivity of Penicilloyl and Penicillanyl Albumin and Polylysine Conjugates with IgE-Antibody. *J. Immunol. Methods* 2000, 242 (1–2), 43–51.
- (95) Moreno, E.; Laffond, E.; Munoz-Bellido, F. J.; Gracia, M. T.; Macias, E. M.; Dávila, I. Using β -Lactam Antibiotics in Patients with a History of β -Lactam Allergy: Current Concepts. *Polish Arch. Intern. Med.* 2017, 127 127 (7–8), 540–549.
- (96) Montañez, M. I.; Perez-Inestrosa, E.; Suau, R.; Mayorga, C.; Torres, M. J.; Blanca, M. Dendrimerized Cellulose as a Scaffold for Artificial Antigens with Applications in Drug Allergy Diagnosis. *Biomacromolecules* 2008, 9 (5), 1461–1466.
- (97) Montañez, M. I.; Mayorga, C.; Torres, M. J.; Blanca, M.; Perez-Inestrosa, E. Methodologies to Anchor Dendrimeric Nanoconjugates to Solid Phase: Toward an Efficient in Vitro Detection of Allergy to β -Lactam Antibiotics. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2011, 7 (6), 682–685.
- (98) Mayorga, C.; Perez-Inestrosa, E.; Molina, N.; Montañez, M. I. Development of Nanostructures in the Diagnosis of Drug Hypersensitivity Reactions. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2016, 16 (4), 300–307.
- (99) Sánchez-Sancho, F.; Pérez-Inestrosa, E.; Suau, R.; Mayorga, C.; Torres, M. J.; Blanca, M.

- Dendrimers as Carrier Protein Mimetics for IgE Antibody Recognition. Synthesis and Characterization of Densely Penicilloylated Dendrimers. *Bioconjug. Chem.* 2002, 13 (3), 647–653.
- (100) Molina, N.; Martin-Serrano, A.; Fernandez, T.; Tesfaye, A.; Najera, F.; Torres, M.; Mayorga, C.; Vida, Y.; Montañez, M.; Perez-Inestrosa, E. Dendrimeric Antigens for Drug Allergy Diagnosis: A New Approach for Basophil Activation Tests. *Molecules* 2018, 23 (5), 997.
- (101) Soler, M.; Mesa-Antunez, P.; Estevez, M.-C.; Ruiz-Sanchez, A. J.; Otte, M. A.; Sepulveda, B.; Collado, D.; Mayorga, C.; Torres, M. J.; Perez-Inestrosa, E.; Lechuga, L. M. Highly Sensitive Dendrimer-Based Nanoplasmonic Biosensor for Drug Allergy Diagnosis. *Biosens. Bioelectron.* 2015, 66, 115–123.
- (102) Matthews, O. A.; Shipway, A. N.; Stoddart, J. F. Dendrimers - Branching out from Curiosities into New Technologies. *Progress in Polymer Science (Oxford)*. Elsevier Ltd 1998, pp 1–56.
- (103) Narayanan, V. V.; Newkome, G. R. Supramolecular Chemistry within Dendritic Structures; Springer, Berlin, Heidelberg, 1998; pp 19–77.
- (104) Montanez MI, Mayorga C, Torres MJ, Ruiz-Sanchez AJ, Malkoch M, Hult A, Blanca M, P.-I. E. Dendrimeric Antigens. New Approaches towards Detection of IgE Mediated Drug Allergy Reactions. *Dendrimers Biomed. Appl.* 2013, 91, 84–98.
- (105) J. Ruiz-Sanchez, A.; I. Montanez, M.; Mayorga, C.; J. Torres, M.; S. Kehr, N.; Vida, Y.; Collado, D.; Najera, F.; De Cola, L.; Perez-Inestrosa, E. Dendrimer-Modified Solid Supports: Nanostructured Materials with Potential Drug Allergy Diagnostic Applications *Current medicinal chemistry*, 2012, 19 (29), 4942-4954.
- (106) Torres, J.; Romano, A.; Mayorga, C.; Carmen, M.; Guzman, A. E.; Reche, M.; Juarez, C.; Blanca, M. Diagnostic Evaluation of a Large Group of Patients with Immediate Allergy to Penicillins: The Role of Skin Testing. *Allergy* 2001, 56 (9), 850–856.
- (107) Romano, A.; Gaeta, F.; Poves, M. F. A.; Valluzzi, R. L. Cross-Reactivity among Beta-Lactams. *Current Allergy and Asthma Reports.* 2016, 16 (3), 1-12.
- (108) Romano, A.; Gaeta, F.; Valluzzi, R. L.; Caruso, C.; Rumi, G.; Bousquet, P. J. The Very Limited Usefulness of Skin Testing with Penicilloyl-Polylysine and the Minor Determinant Mixture in Evaluating Nonimmediate Reactions to Penicillins. *Allergy* 2010, 65 (9), 1104–1107.
- (109) Romano, A.; Di Fonso, M.; Viola, M.; Adesi, F. B.; Venuti, A. Selective Hypersensitivity to Piperacillin. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 2000, 55 (8), 787.
- (110) Linares, T.; Marcos, C.; Gavilan, M. J.; Arenas, L. Hypersensitivity to penicillin V with good tolerance to other beta-lactams. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology.* 2007, 17(1), 50.
- (111) Blanca, M.; Carmona, M. J.; Moreno, F.; Mayorga, C.; Garcia, J. Selective Immediate Allergic Response to Penicillin V. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 1996, 51 (12), 961–963.
- (112) Sánchez-Morillas, L.; Rojas-Pérez-Ezquerro, P.; González-Mendiola, R.; Gómez-Tembleque, P.; Laguna-Martínez, J. Selective Sensitization to Penicillin V with Tolerance to Other Betalactams. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 2014, 8 (1), 74–76.
- (113) Torres, M. J.; Blanca, M.; Fernandez, J.; Esteban, A.; Moreno, F.; Vega, J. M.; Garcia, J. Selective Allergic Reaction to Oral Cloxacillin. *Clin. Exp. Allergy.* 1996, 26 (1), 108–111.

-
- (114) Wong, J. C. Y.; Au, E. Y. L.; Li, P. H.; Yeung, H. H. F.; Lau, C.; Wong, J. C. Y. Piperacillin-Tazobactam Allergies: An Exception to Usual Penicillin Allergy. *Allergy. Asthma Immunol. Res.* 2021, 13 (2).
- (115) Pichichero, M. E.; Casey, J. R. Safe Use of Selected Cephalosporins in Penicillin-Allergic Patients: A Meta-Analysis. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery.* 2007, 136 (3), 340-347.
- (116) Bogas, G.; Mayorga, C.; Martín-Serrano, Á.; Fernández-Santamaría, R.; Jiménez-Sánchez, I. M.; Ariza, A.; Barrionuevo, E.; Posadas, T.; Salas, M.; Fernández, T. D.; Torres, M. J.; Montañez, M. I. Penicillin and Cephalosporin Cross-Reactivity: Role of Side Chain and Synthetic Cefadroxil Epitopes. *Clin. Transl. Allergy* 2020, 10 (1), 1–14.
- (117) Miranda, A.; Blanca, M.; Vega, J. M.; Moreno, F.; Carmona, M. J.; Garcia, J. J.; Segurado, E.; Justicia, J. L.; Juarez, C. Cross-Reactivity between a Penicillin and a Cephalosporin with the Same Side Chain. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996, 98 (3), 671–677.
- (118) Audicana, M.; Bernaola, G.; Urrutia, I.; Echechipia, S.; Gastaminza, G.; Muñoz, D.; Fernández, E.; Fernández de Corres, L. Allergic Reactions to Betalactams: Studies in a Group of Patients Allergic to Penicillin and Evaluation of Cross-reactivity with Cephalosporin. *Allergy* 1994, 49 (2), 108–113.
- (119) Romano, A.; Valluzzi, R. L.; Caruso, C.; Zaffiro, A.; Quaratino, D.; Gaeta, F. Tolerability of Cefazolin and Ceftributen in Patients with IgE-Mediated Aminopenicillin Allergy. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 2020, 8 (6), 1989-1993.
- (120) Novalbos, A.; Sastre, J.; Cuesta, J.; De Las Heras, M.; Lluch-Bernal, M.; Bombín, C.; Quirce, S. Lack of Allergic Cross-Reactivity to Cephalosporins among Patients Allergic to Penicillins. *Clin. Exp. Allergy* 2001, 31 (3), 438–443.
- (121) Caimmi, S.; Galéra, C.; Bousquet-Rouanet, L.; Arnoux, B.; Demoly, P.; Bousquet, P.-J. Safety of Cefuroxime as an Alternative in Patients with a Proven Hypersensitivity to Penicillins: A DAHD Cohort Survey. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2010, 153 (1), 53–60.
- (122) Romano, A.; Valluzzi, R. L.; Caruso, C.; Maggioletti, M.; Quaratino, D.; Gaeta, F. Cross-Reactivity and Tolerability of Cephalosporins in Patients with IgE-Mediated Hypersensitivity to Penicillins. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 2018, 6 (5), 1662–1672..
- (123) Sánchez de Vicente, J.; Gamboa, P.; García-Lirio, E.; Irazabal, B.; Jáuregui, I.; Martínez, M. D.; Seguro, A.; Seras, Y.; Galán, C. Tolerance to Cephalosporins and Carbapenems in Penicillin-Allergic Patients. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology.* 2020, 30(1), 75-76.
- (124) Romano, A.; Guéant-Rodriguez, R. M.; Viola, M.; Pettinato, R.; Guéant, J. L. Cross-Reactivity and Tolerability of Cephalosporins in Patients with Immediate Hypersensitivity to Penicillins. *Ann. Intern. Med.* 2004, 141 (1).
- (125) Phillips, E.; Knowles, S. R.; Weber, E. A.; Blackburn, D. Cephalexin Tolerated despite Delayed Aminopenicillin Reactions. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 2001, 56 (8), 790.
- (126) Trcka, J.; Seitz, C. S.; Bröcker, E. B.; Gross, G. E.; Trautmann, A. Aminopenicillin-Induced Exanthema Allows Treatment with Certain Cephalosporins or Phenoxymethyl Penicillin. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007, 60 (1), 107–111.
- (127) Romano, A.; Mayorga, C.; Torres, M. J.; Artesani, M. C.; Suau, R.; Sánchez, F.; Pérez, E.; Venuti, A.; Blanca, M. Immediate Allergic Reactions to Cephalosporins: Cross-Reactivity and Selective Responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000, 106 (6), 1177–1183.

- (128) Antunez, C.; Blanca-Lopez, N.; Torres, M. J.; Mayorga, C.; Perez-Inestrosa, E.; Montañez, M. I.; Fernandez, T.; Blanca, M. Immediate Allergic Reactions to Cephalosporins: Evaluation of Cross-Reactivity with a Panel of Penicillins and Cephalosporins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006, *117* (2), 404–410.
- (129) Yuson, C.; Kumar, K.; Le, A.; Ahmadie, A.; Banovic, T.; Heddle, R.; Kette, F.; Smith, W.; Hissaria, P. Immediate Cephalosporin Allergy. *Intern. Med. J.* 2019, *49* (8), 985–993.
- (130) Gaeta, F.; Valluzzi, R. L.; Alonzi, C.; Maggioletti, M.; Caruso, C.; Romano, A. Tolerability of Aztreonam and Carbapenems in Patients with IgE-Mediated Hypersensitivity to Penicillins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015, *135* (4).
- (131) Atanasković-Marković, M.; Gaeta, F.; Medjo, B.; Viola, M.; Nestorović, B.; Romano, A. Tolerability of Meropenem in Children with IgE-Mediated Hypersensitivity to Penicillins. *Allergy* 2008, *63* (2), 237–240.
- (132) Romano, A.; Viola, M.; Guéant-Rodriguez, R. M.; Gaeta, F.; Valluzzi, R.; Guéant, J. L. Brief Communication: Tolerability of Meropenem in Patients with IgE-Mediated Hypersensitivity to Penicillins. *Ann. Intern. Med.* 2007, *146* (4), 266–269.
- (133) Atanasković-Marković, M.; Gaeta, F.; Gavrović-Jankulović, M.; Veličković, T. Č.; Valluzzi, R. L.; Romano, A. Tolerability of Imipenem in Children with IgE-Mediated Hypersensitivity to Penicillins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2009, *124* (1), 167-169
- (134) Romano, A.; Viola, M.; Guéant-Rodriguez, R.-M.; Gaeta, F.; Pettinato, R.; Guéant, J.-L. Imipenem in Patients with Immediate Hypersensitivity to Penicillins. *N. Engl. J. Med.* 2006, *354* (26), 2835–2837.
- (135) Romano, A.; Gaeta, F.; Valluzzi, R. L.; Caruso, C.; Rumi, G.; Bousquet, P. J. IgE-Mediated Hypersensitivity to Cephalosporins: Cross-Reactivity and Tolerability of Penicillins, Monobactams, and Carbapenems. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010, *126* (5), 994–999.
- (136) Noguerado-Mellado, B.; Pinto Fernández, C.; Pineda-Pineda, R.; Martínez Lezcano, P.; Álvarez-Perea, A.; De Barrio Fernández, M. Cross-Reactivity between Carbapenems: Two Case Reports. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 2014, *2* (6), 816–817.
- (137) Franklin Adkinson, N. Immunogenicity and Cross-Allergenicity of Aztreonam. *Am. J. Med.* 1990, *88* (3 SUPPL. 3), S12–S15.
- (138) Gueant, J.-L.; Gueant-Rodriguez, R.-M.; Viola, M.; Luigi Valluzzi, R.; Romano, A. IgE-Mediated Hypersensitivity to Cephalosporins. *Curr. Pharm. Des.* 2006, *12* (26), 3335–3345.
- (139) Vega, J. M.; Blanca, M.; García, J. J.; Miranda, A.; Carmona, M. J.; García, A.; Moya, M. C.; Sanchez, F.; Terrados, S. Tolerance to Aztreonam in Patients Allergic to Betalactam Antibiotics. *Allergy* 1991, *46* (3), 196–202.
- (140) Romano, A.; Gaeta, F.; Valluzzi, R. L.; Maggioletti, M.; Caruso, C.; Quarantino, D. Cross-Reactivity and Tolerability of Aztreonam and Cephalosporins in Subjects with a T Cell-Mediated Hypersensitivity to Penicillins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016, *138* (1), 179–186.
- (141) Doña, I.; Barrionuevo, E.; Blanca-Lopez, N.; Torres, M. J.; Fernandez, T. D.; Mayorga, C.; Canto, G.; Blanca, M. Trends in hypersensitivity drug reactions: more drugs, more response patterns, more heterogeneity. *J. Investig Allergol Clin Immunol.* 2014, *24*(3), 143-53.

-
- (142) Abrams, E. M.; Wakeman, A.; Gerstner, T. V.; Warrington, R. J.; Singer, A. G. Prevalence of Beta-Lactam Allergy: A Retrospective Chart Review of Drug Allergy Assessment in a Predominantly Pediatric Population. *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* 2016, 12, 59.
- (143) Macy, E.; Contreras, R. Health Care Use and Serious Infection Prevalence Associated with Penicillin & "Allergy" in Hospitalized Patients: A Cohort Study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014, 133 (3), 790–796.
- (144) Torres, M. J.; Moreno, E.; Fernandez-Santamaría, R.; Doña, I.; Fernandez, T. D. Diagnostic Approximation to Delabeling Beta-Lactam Allergic Patients. *Curr Treat Options Allergy* 2019, 6, 56–70.
- (145) Abrams, E. M.; Atkinson, A. R.; Wong, T.; Ben-Shoshan, M. The Importance of Delabeling β -Lactam Allergy in Children. *J. Pediatr.* 2019, 204, 291–297.
- (146) Blumenthal, K. G.; Shenoy, E. S.; Varughese, C. A.; Hurwitz, S.; Hooper, D. C.; Banerji, A. Impact of a Clinical Guideline for Prescribing Antibiotics to Inpatients Reporting Penicillin or Cephalosporin Allergy. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 2015, 115 (4), 294–300.
- (147) Ariza, A.; Mayorga, C.; Bogas, G.; Barrionuevo, E.; Torres, M. J.; Doña, I.; Fernandez, T. D. Advances and Novel Developments in Drug Hypersensitivity Diagnosis. *Allergy* 2020, 75(12), 3112–3123.
- (148) Romano, A.; Atanaskovic-Markovic, M.; Barbaud, A.; Bircher, A. J.; Brockow, K.; Caubet, J.; Celik, G.; Cernadas, J.; Chiriac, A.; Demoly, P.; Garvey, L. H.; Mayorga, C.; Nakonechna, A.; Whitaker, P.; Torres, M. J. Towards a More Precise Diagnosis of Hypersensitivity to Beta-lactams — an EAACI Position Paper. *Allergy* 2020, 75 (6), 1300–1315.
- (149) Doña, I.; Torres, M. J.; Montañez, M. I.; Fernández, T. D. In Vitro Diagnostic Testing for Antibiotic Allergy. *Allergy, Asthma Immunol. Res.* 2017, 9 (4), 288–298.
- (150) Fernandez, T. D.; Mayorga, C.; Salas, M.; Barrionuevo, E.; Posadas, T.; Ariza, A.; Laguna, J. J.; Moreno, E.; Torres, M. J.; Doña, I.; Montañez, M. I. Evolution of Diagnostic Approaches in Betalactam Hypersensitivity. *Expert Review of Clinical Pharmacology.* 2017, 10(6), 671–683.
- (151) Silviu-Dan, F.; McPhillips, S.; Warrington, R. J. The Frequency of Skin Test Reactions to Side-Chain Penicillin Determinants. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1993, 91 (3), 694–701.
- (152) Torres, J.; Romano, A.; Mayorga, C.; Carmen, M.; Guzman, A. E.; Reche, M.; Juarez, C.; Blanca, M. Diagnostic Evaluation of a Large Group of Patients with Immediate Allergy to Penicillins: The Role of Skin Testing. *Allergy* 2001, 56 (9), 850–856.
- (153) Moreno, E.; Laffond, E.; Muñoz-Bellido, F.; Gracia, M. T.; Macías, E.; Moreno, A.; Dávila, I. Performance in Real Life of the European Network on Drug Allergy Algorithm in Immediate Reactions to Beta-Lactam Antibiotics. *Allergy* 2016, 71 (12), 1787–1790.
- (154) Manuyakorn, W.; Singvijarn, P.; Benjaponpitak, S.; Kamchaisatian, W.; Rerkpattanapipat, T.; Sasisakulporn, C.; Jotikasthira, W. Skin Testing with β -Lactam Antibiotics for Diagnosis of β -Lactam Hypersensitivity in Children. *Asian Pacific J. Allergy Immunol.* 2016, 34 (3), 242–247.
- (155) Sobrino, M.; Muñoz-Bellido, F. J.; Macías, E.; Lázaro-Sastre, M.; de Arriba-Méndez, S.; Dávila, I. A Prospective Study of Costs Associated with the Evaluation of β -Lactam Allergy in Children. *Journal of Pediatrics.* 2020, pp 108–113.
- (156) Kuruvilla, M.; Khan, D. A. Anaphylaxis to Drugs. *Immunology and Allergy Clinics of*

- North America*. 2015, 35 (2), 303-319.
- (157) Aberer, W.; Bircher, A.; Romano, A.; Blanca, M.; Campi, P.; Fernandez, J.; Brockow, K.; Pichler, W. J.; Demoly, P. Drug Provocation Testing in the Diagnosis of Drug Hypersensitivity Reactions: General Considerations. *Allergy*. 2003, 58 (9), 854-863. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2003.00279.x>.
- (158) Bousquet, P. J.; Pipet, A.; Bousquet-Rouanet, L.; Demoly, P. Oral Challenges Are Needed in the Diagnosis of β -Lactam Hypersensitivity. *Clin. Exp. Allergy* 2008, 38 (1), 185-190.
- (159) Soyer, O.; Sahiner, U. M.; Sekerel, B. E. Pro and Contra: Provocation Tests in Drug Hypersensitivity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. 18 (7), 1437.
- (160) Mayorga, C.; Celik, G.; Rouzair, P.; Whitaker, P.; Bonadonna, P.; Rodrigues-Cernadas, J.; Vultaggio, A.; Brockow, K.; Caubet, J. C.; Makowska, J.; Nakonechna, A.; Romano, A.; Montañez, M. I.; Laguna, J. J.; Zaroni, G.; Gueant, J. L.; Oude Elberink, H.; Fernandez, J.; Viel, S.; Demoly, P.; Torres, M. J. In Vitro Tests for Drug Hypersensitivity Reactions: An ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group Position Paper. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 2016, 71 (8), 1103-1134.
- (161) Luque, I.; Leyva, L.; José Torres, M.; Rosal, M.; Mayorga, C.; Segura, J. M.; Blanca, M.; Juárez, C. In Vitro T-Cell Responses to β -Lactam Drugs in Immediate and Nonimmediate Allergic Reactions. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 2001, 56 (7), 611-618.
- (162) Torres, M. J.; Padial, A.; Mayorga, C.; Fernández, T.; Sanchez-Sabate, E.; Cornejo-Garcia, J. A.; Antúnez, C.; Blanca, M. The Diagnostic Interpretation of Basophil Activation Test in Immediate Allergic Reactions to Betalactams. *Clin. Exp. Allergy* 2004, 34 (11), 1768-1775.
- (163) Hoffmann, H. J.; Santos, A. F.; Mayorga, C.; Nopp, A.; Eberlein, B.; Ferrer, M.; Rouzair, P.; Ebo, D. G.; Sabato, V.; Sanz, M. L.; Pecaric-Petkovic, T.; Patil, S. U.; Hausmann, O. V.; Shreffler, W. G.; Korosec, P.; Knol, E. F. The Clinical Utility of Basophil Activation Testing in Diagnosis and Monitoring of Allergic Disease. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 2015, 70 (11), 1393-1405.
- (164) Hoffmann, H. J.; Knol, E. F.; Ferrer, M.; Mayorga, L.; Sabato, V.; Santos, A. F.; Eberlein, B.; Nopp, A.; MacGlashan, D. Pros and Cons of Clinical Basophil Testing (BAT). *Current Allergy and Asthma Reports*. 2016. 16 (8), 1-12.
- (165) Sanz, M. L.; Gamboa, P. M.; Antépara, I.; Uasuf, C.; Vila, L.; Garcia-Avilés, C.; Chazot, M.; De Weck, A. L. Flow Cytometric Basophil Activation Test by Detection of CD63 Expression in Patients with Immediate-Type Reactions to Betalactam Antibiotics. *Clin. Exp. Allergy* 2002, 32 (2), 277-286.
- (166) Abuaf, N.; Rostane, H.; Rajoely, B.; Gaouar, H.; Autegarden, J. E.; Leynadier, F.; Girot, R. Comparison of Two Basophil Activation Markers CD63 and CD203c in the Diagnosis of Amoxicillin Allergy. *Clin. Exp. Allergy* 2008, 38 (6), 921-928.
- (167) Eberlein, B.; Suárez, I. L.; Darsow, U.; Ruëff, F.; Behrendt, H.; Ring, J. A New Basophil Activation Test Using CD63 and CCR3 in Allergy to Antibiotics. *Clin. Exp. Allergy* 2010, 40 (3), 411-418.
- (168) Mayorga, C.; Doña, I.; Perez-Inestrosa, E.; Fernández, T. D.; Torres, M. J. The Value of in Vitro Tests to Diminish Drug Challenges. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18 (6).
- (169) Kleine Budde, I.; De Heer, P. G.; Van Der Zee, J. S.; Aalberse, R. C. The Stripped Basophil Histamine Release Bioassay as a Tool for the Detection of Allergen-Specific IgE in Serum. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2001, 126 (4), 277-285.

- (170) Pineda, F.; Ariza, A.; Mayorga, C.; Arribas, F.; González-Mendiola, R.; Blanca-López, N.; Davila, G.; Cabañes, N.; Canto, G.; Laguna, J. J.; Senent, C.; Stahl-Skov, P.; Palacios, R.; Blanca, M.; Torres, M. J. Role of Histamine Release Test for the Evaluation of Patients with Immediate Hypersensitivity Reactions to Clavulanic Acid. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2016, *168* (4), 233–240.
- (171) Yman, L. Standardization of in Vitro Methods. *Allergy* 2001, *56* (s67), 70–74.
- (172) Kleine-Tebbe, J.; Poulsen, L. K.; Hamilton, R. G. Quality Management in IgE-Based Allergy Diagnostics. *LaboratoriumsMedizin* 2016, *40* (2), 81–96.
- (173) Fontaine, C.; Mayorga, C.; Bousquet, P. J.; Arnoux, B.; Torres, M. J.; Blanca, M.; Demoly, P. Relevance of the Determination of Serum-Specific IgE Antibodies in the Diagnosis of Immediate β -Lactam Allergy. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 2007, *62* (1), 47–52.
- (174) Ewan, P. W.; Coote, D. Evaluation of a Capsulated Hydrophilic Carrier Polymer (the ImmunoCAP) for Measurement of Specific IgE Antibodies. *Allergy* 1990, *45* (1), 22–29.
- (175) Johansson, S. G. O.; Adédoyin, J.; Van Hage, M.; Grönneberg, R.; Nopp, A. False-Positive Penicillin Immunoassay: An Unnoticed Common Problem. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013, *132* (1), 235–237.
- (176) Vultaggio, A.; Matucci, A.; Virgili, G.; Rossi, O.; Filippi, L.; Parronchi, P.; Romagnani, S.; Maggi, E. Influence of Total Serum IgE Levels on the in Vitro Detection of β -Lactams-Specific IgE Antibodies. *Clin. Exp. Allergy* 2009, *39* (6), 838–844.
- (177) Vultaggio, A.; Virgili, G.; Gaeta, F.; Romano, A.; Maggi, E.; Matucci, A. High Serum β -Lactams Specific/Total IgE Ratio Is Associated with Immediate Reactions to β -Lactams Antibiotics. *PLoS One* 2015, *10* (4).
- (178) Sanz, M. L.; García, B. E.; Prieto, I.; Tabar, A.; Oehling, A. Specific IgE Determination in the Diagnosis of β -Lactam Allergy. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 1996, *6* (2), 89–93.
- (179) Blanca, M.; Mayorga, C.; Torres, M. J.; Reche, M.; Moya, C.; Rodriguez, J. L.; Romano, A.; Juarez, C. Clinical Evaluation of Pharmacia CAP SystemTM RAST FEIA Amoxicilloyl and Benzylpenicilloyl in Patients with Penicillin Allergy. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 2001, *56* (9), 862–870.
- (180) Doña, I.; Pérez-Sánchez, N.; Barrionuevo, E.; Fernandez, R.; Montañez, M. I.; Sanchez, M. I.; Molina, A.; Mayorga, C.; Torres Jaén, M. J. Comparison Between ImmunoCAP And RAST For Diagnosis Of Hypersensitivity To Betalactams. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2018, *141* (2), AB36.
- (181) Kosnik, M.; Silar, M.; Zidarn, M.; Korosec, P. Comparison of the Diagnostic Value of Two Assays for Specific Immunoglobulin E in Suspected Beta Lactam Allergy. *Med. Pregl. Rev.* 2017, *70* (7–8), 209–215.
- (182) García-Avilés, C.; Sanz, M. L.; Gamboa, P. M.; Urrutia, I.; Antépara, I.; Jauregui, I.; De Weck, A. L. Antigen Specific Quantification of Sulfidoleukotrienes in Patients Allergic to Betalactam Antibiotics. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2005, *15* (1), 37–45.
- (183) Laboratorian Information <https://www.siemens-healthineers.com/es/laboratory-diagnostics/assays-by-diseases-conditions/allergy/laboratorian-information> (accessed Sep 2, 2021).
- (184) Sato, S.; Ogura, K.; Takahashi, K.; Sato, Y.; Yanagida, N.; Ebisawa, M. Usefulness of Antigen-Specific IgE Probability Curves Derived from the 3gAllergy Assay in Diagnosing Egg, Cow's Milk, and Wheat Allergies. *Allergol. Int.* 2017, *66* (2), 296–301.

- (185) HYTEC 288 Plus | Fully Automated Immunoassay Instrument <https://www.hycorbiomedical.com/hytech> (accessed Sep 2, 2021).
- (186) Allergie | Diagnostik | Dr. Fooke-Achterrath Laboratorien GmbH | Neuss <https://www.fooke-labs.de/> (accessed Sep 2, 2021).
- (187) Polycheck® – Diagnostics made in Germany <https://polycheck.de/> (accessed Sep 2, 2021).
- (188) Aberer, W.; Kränke, B.; Hager, A.; Wick, G. In Vitro Allergy Testing Needs Better Standardization -Test Results from Different Laboratories Lack Comparability Mostly Due to Missing Effective Standards. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1995, *108* (1), 82–88.
- (189) Mark, D.; Haeberle, S.; Roth, G.; Stetten, F. Von; Zengerle, R. Microfluidic Lab-on-a-Chip Platforms: Requirements, Characteristics and Applications. *Chem. Soc. Rev.* 2010, *39* (3), 1153–1182.
- (190) Miyazaki, C. M.; Carthy, E.; Kinahan, D. J. Biosensing on the Centrifugal Microfluidic Lab-on-a-Disc Platform. *Process. 2020, Vol. 8, Page 1360* 2020, *8* (11), 1360.
- (191) Lee, B. S.; Lee, Y. U.; Kim, H. S.; Kim, T. H.; Park, J.; Lee, J. G.; Kim, J.; Kim, H.; Lee, W. G.; Cho, Y. K. Fully Integrated Lab-on-a-Disc for Simultaneous Analysis of Biochemistry and Immunoassay from Whole Blood. *Lab Chip* 2011, *11* (1), 70–78.
- (192) Nguyen, H. Van; Nguyen, V. D.; Nguyen, H. Q.; Chau, T. H. T.; Lee, E. Y.; Seo, T. S. Nucleic Acid Diagnostics on the Total Integrated Lab-on-a-Disc for Point-of-Care Testing. *Biosens. Bioelectron.* 2019, *114*, 111466.
- (193) Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Disc-Based Microarrays: Principles and Analytical Applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 2016, *408*(17), 4523–4534.
- (194) Sauer, U. Analytical Protein Microarrays: Advancements towards Clinical Applications. *Sensors (Switzerland)*. 2017. *17* (2), 256.
- (195) Clancy, K. F. A.; Dery, S.; Laforte, V.; Shetty, P.; Juncker, D.; Nicolau, D. V. Protein Microarray Spots Are Modulated by Patterning Method, Surface Chemistry and Processing Conditions. *Biosens. Bioelectron.* 2019, *130*, 397–407.
- (196) Peris, E.; Bañuls, M. J.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Photoattachment of Thiolated DNA Probes on SU-8 Spin-Coated Blu-Ray Disk Surfaces for Biosensing. *J. Mater. Chem. B* 2013, *1* (45), 6245–6253.
- (197) Morais, S.; Tortajada-Genaro, L. A.; Arandis-Chover, T.; Puchades, R.; Maquieira, A. Multiplexed Microimmunoassays on a Digital Versatile Disk. *Anal. Chem.* 2009, *81* (14), 5646–5654.
- (198) Dobosz, P.; Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, A. Nanogold Bioconjugates for Direct and Sensitive Multiplexed Immunosensing. *Biosens. Bioelectron.* 2015, *69*, 294–300
- (199) Dobosz, P.; Morais, S.; Bonet, E.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Massive Immuno Multiresidue Screening of Water Pollutants. *Anal. Chem.* 2015, *87* (19), 9817–9824.
- (200) Pastor-Navarro, N.; Brun, E. M.; Gallego-Iglesias, E.; Maquieira, Á.; Puchades, R. Development of Immunoassays to Determine Sulfamethoxazole Residues in Wastewaters. *J. Environ. Monit.* 2009, *11* (5), 1094–1100.
- (201) Tamarit-López, J.; Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Direct Hapten-Linked Multiplexed Immunoassays on Polycarbonate Surface. *Biosens. Bioelectron.* 2011, *26* (5), 2694–2698.
- (202) Navarro, P.; Morais, S.; Gabaldón, J. A.; Pérez, A. J.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Arrays on Disc for Screening and Quantification of Pollutants. *Anal. Chim. Acta* 2013, *784*, 59–

- 64.
- (203) Morais, S.; Tamarit-López, J.; Carrascosa, J.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Analytical Prospect of Compact Disk Technology in Immunosensing. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, *391* (8), 2837–2844.
- (204) Arnandis-Chover, T.; Morais, S.; González-Martínez, M. Á.; Puchades, R.; Maquieira, Á. High Density MicroArrays on Blu-Ray Discs for Massive Screening. *Biosens. Bioelectron.* 2014, *51*, 109–114.
- (205) Mas, S.; Badran, A. A.; Juárez, M. J.; Fernández de Rojas, D. H.; Morais, S.; Maquieira, Á. Highly Sensitive Optoelectrical Biosensor for Multiplex Allergy Diagnosis. *Biosens. Bioelectron.* 2020, *166*, 112438.
- (206) do Nascimento, N. M.; Juste-Dolz, A.; Grau-García, E.; Román-Ivorra, J. A.; Puchades, R.; Maquieira, A.; Morais, S.; Gimenez-Romero, D. Label-Free Piezoelectric Biosensor for Prognosis and Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus. *Biosens. Bioelectron.* 2017, *90*, 166–173.
- (207) Weng, S.; Li, X.; Niu, M.; Ge, B.; Yu, H. Z. Blu-Ray Technology-Based Quantitative Assays for Cardiac Markers: From Disc Activation to Multiplex Detection. *Anal. Chem.* 2016, *88* (13), 6889–6896.
- (208) Li, X.; Weng, S.; Ge, B.; Yao, Z.; Yu, H. Z. DVD Technology-Based Molecular Diagnosis Platform: Quantitative Pregnancy Test on a Disc. *Lab Chip* 2014, *14* (10), 1686–1694.
- (209) Bañuls, M. J.; González-Pedro, M. V.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Influenza A Virus Infection Diagnosis Based on DVD Reader Technology. *Anal. Methods* 2012, *4* (10), 3133–3139.
- (210) Li, Y.; Ou, L. M. L.; Yu, H. Z. Digitized Molecular Diagnostics: Reading Disk-Based Bioassays with Standard Computer Drives. *Anal. Chem.* 2008, *80* (21), 8216–8223.
- (211) Bañuls, M. J.; García-Piñón, F.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Chemical Derivatization of Compact Disc Polycarbonate Surfaces for SNPs Detection. *Bioconjug. Chem.* 2008, *19* (3), 665–672.
- (212) Lázaro, A.; Yamanaka, E. S.; Maquieira, Á.; Tortajada-Genaro, L. A. Allele-Specific Ligation and Recombinase Polymerase Amplification for the Detection of Single Nucleotide Polymorphisms. *Sensors Actuators, B Chem.* 2019, *298*, 126877.
- (213) Badran, A. A.; Morais, S.; Maquieira, Á. Simultaneous Determination of Four Food Allergens Using Compact Disc Immunoassaying Technology. *Anal. Bioanal. Chem.* 2017, *409* (9), 2261–2268.
- (214) Sancho-Fornes, G.; Avella-Oliver, M.; Carrascosa, J.; Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Enhancing the Sensitivity in Optical Biosensing by Striped Arrays and Frequency-Domain Analysis. *Sensors Actuators, B Chem.* 2019, *281*, 432–438.
- (215) Tortajada-Genaro, L. A.; Santiago-Felipe, S.; Morais, S.; Joséantonio, J.; Gabaldón, G.; Puchades, R.; Ngel Maquieira, A. Multiplex DNA Detection of Food Allergens on a Digital Versatile Disk. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2012, *60* (1), 36-43.
- (216) Santiago-Felipe, S.; Tortajada-Genaro, L. A.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Parallel Solid-Phase Isothermal Amplification and Detection of Multiple DNA Targets in Microliter-Sized Wells of a Digital Versatile Disc. *Microchim. Acta* 2016, *183* (3), 1195–1202.
- (217) Zhang, L.; Wang, H.; Zhang, X.; Li, X.; Yu, H. Z. Indirect Competitive Immunoassay on a Blu-Ray Disc for Digitized Quantitation of Food Toxins. *ACS Sensors* 2020, *5* (4), 1239–1245.

- (218) Zhang, L.; Wong, J. X. H.; Li, X.; Li, Y.; Yu, H.-Z. Detection and Quantitation of Heavy Metal Ions on Bona Fide DVDs Using DNA Molecular Beacon Probes. *Anal. Chem* 2015, 87, 15.
- (219) Santiago-Felipe, S.; Tortajada-Genaro, L. A.; Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, Á. One-Pot Isothermal DNA Amplification - Hybridisation and Detection by a Disc-Based Method. *Sensors Actuators, B Chem.* 2014, 204, 273–281.
- (220) Santiago-Felipe, S.; Tortajada-Genaro, L. A.; Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Isothermal DNA Amplification Strategies for Duplex Microorganism Detection. *Food Chem.* 2015, 174, 509–515.
- (221) Tortajada-Genaro, L. A.; Rodrigo, A.; Hevia, E.; Mena, S.; Niños, R.; Maquieira, Á. Microarray on Digital Versatile Disc for Identification and Genotyping of Salmonella and Campylobacter in Meat Products. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407 (24).
- (222) Lucas-Garrote, B.; Morais, S.; Maquieira, Á. Dual Signal Amplification for Highly Sensitive Hybridization Microassays on Chemically Activated Surfaces. *Sensors Actuators, B Chem.* 2017, 246, 1108–1115.
- (223) Arandis-Chover, T.; Morais, S.; Tortajada-Genaro, L. A.; Puchades, R.; Maquieira, A. ´; Berganza, J.; Olabarria, G. Detection of Food-Borne Pathogens with DNA Arrays on Disk. *Talanta.* 2012, 101, 405-412.
- (224) Tamarit-López, J.; Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Oxygen Plasma Treated Interactive Polycarbonate DNA Microarraying Platform. *Bioconjug. Chem.* 2011, 22 (12), 2573–2580.
- (225) Peris, E.; Bañuls, M. J.; Puchades, R.; Maquieira, Á. Photoattachment of Thiolated DNA Probes on SU-8 Spin-Coated Blu-Ray Disk Surfaces for Biosensing. *J. Mater. Chem. B* 2013, 1 (45), 6245–6253.
- (226) Zhang, L.; Li, X.; Li, Y.; Shi, X.; Yu, H. Z. Indirect Competitive Assays on DVD for Direct Multiplex Detection of Drugs of Abuse in Oral Fluids. *Anal. Chem.* 2015, 87 (3), 1896–1902.
- (227) Offermann, N.; Plum, M.; Hübner, U.; Rathloff, K.; Braren, I.; Fooke, M.; Spillner, E. Human Serum Substitution by Artificial Sera of Scalable Allergen Reactivity Based on Polyclonal Antibodies and Chimeras of Human Fc γ RI and IgE Domains. *Allergy* 2016, 71 (12), 1794–1799.
- (228) Sashidhar, R. B.; Capoor, A. K.; Ramana, D. Quantitation of ϵ -Amino Group Using Amino Acids as Reference Standards by Trinitrobenzene Sulfonic Acid. A Simple Spectrophotometric Method for the Estimation of Hapten to Carrier Protein Ratio. *J. Immunol. Methods* 1994, 167 (1–2), 121–127.
- (229) van Hage, M.; Hamsten, C.; Valenta, R. ImmunoCAP Assays: Pros and Cons in Allergology. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017, 140 (4), 974–977.
- (230) Larimore, K.; Nguyen, T.; Badillo, B.; Lau, K.; Zori, R.; Shepherd, G.; Zoog, S. J.; Weng, H. H.; Gupta, S. Depletion of Interfering IgG and IgM Is Critical to Determine the Role of IgE in Pegvaliase-Associated Hypersensitivity. *J. Immunol. Methods* 2019, 468, 20–28.
- (231) Dehlink, E.; Platzer, B.; Baker, A. H.; Larosa, J.; Pardo, M. A Soluble Form of the High Affinity IgE Receptor, Fc-Epsilon-RI, Circulates in Human Serum. *Circ. Hum. Serum. PLoS ONE* 2011, 6 (4), 19098.

ANEXO 1

Caracterización clínica de los pacientes
alérgicos y controles

Tabla A1.1. Historial clínico de los pacientes alérgicos a antibióticos β -lactámicos.

Nº	Nº FE	Ref.	Sexo	Fecha nacimiento	Fecha de la reacción	Fecha del estudio	Fármaco causante	Síntomas	Tiempo	Alérgeno	Tolerancia
1	1	JPM	V	1947	25/11/2015	24/06/2016	Augmentine iv	Anafilaxia	Inmediata	Anillo vs CL	ND
2	3	JSOJ	V	1969	03/03/2013	12/09/2016	Augmentine iv	Anafilaxia	Inmediata	Anillo	ND
3	4	MJQR	M	1944	05/07/2016	30/09/2016	Cefuroxima vo	Anafilaxia	Inmediata	Anillo	ND
4	5	AFM	V	1950	01/02/2012	01/12/2016	Augmentine vo	Cutánea	ND	Anillo	ND
5	7	BAM	M	1962	01/09/2004	09/11/2016	Augmentine vo	Anafilaxia	Inmediata	Anillo	ND
6	9	MAHB	M	1978	22/06/2015	10/11/2016	Augmentine vo	Anafilaxia	Inmediata	Cadena lateral	CFR
7	10	BGD	V	1967	10/09/2016	14/11/2016	Augmentine vo	Cutánea	Tardía	Cadena lateral	CFR
8	11	ACB	V	1936	20/09/2016	18/11/2016	Augmentine iv	Anafilaxia	Inmediata	Cadena lateral	CFR
9	13	EVO	M	1939	28/10/2016	02/12/2016	Cefazolina iv	Anafilaxia	Inmediata	Anillo	ND
10	14	JMR	V	1972	2012	13/12/2016	Augmentine vo	Cutánea	Inmediata	Anillo	ND
11	16	MDAP	M	1962	03/10/2016	16/12/2016	Amoxicilina vo	Cutánea	Inmediata	Cadena lateral	CFR
12	20	BGS	M	1989	18/09/2013	20/04/2017	Amoxicilina vo	Cutánea	Inmediata	Cadena lateral	CFR
13	22	EGM	M	1983	2015	23/12/2016	Augmentine vo	Anafilaxia	Inmediata	Cadena lateral	CFR
14	23	CPP	M	1975	2009	09/01/2017	Augmentine iv	Anafilaxia	Inmediata	Cadena lateral	CFR
15	24	ATS	M	1963	11/02/2010	25/01/2017	Amoxicilina vo	Anafilaxia	Inmediata	Anillo vs CL	ND
16	25	JACM	V	1960	01/02/2017	22/03/2017	Augmentine vo	Anafilaxia	Inmediata	Anillo vs CL	ND
17	27	FSM	V	1949	23/06/2016	10/02/2017	Augmentine vo	Cutánea	Tardía	Cadena lateral	CFR
18	29	DGM	M	1948	28/11/2016	17/02/2017	Augmentine iv	Anafilaxia	Inmediata	Cadena lateral	CFR
19	30	MORH	M	1967	17/11/2016	24/02/2017	Amoxicilina vo	Anafilaxia	Inmediata	Cadena lateral	CFR
20	35	MTCA	M	1960	29/11/2012	26/04/2017	Augmentine vo	Anafilaxia	Inmediata	Cadena lateral	CFR
21	36	RAA	V	1956	25/03/2017	02/05/2017	Augmentine vo	Cutánea	Tardía	Cadena lateral	CFR
22	41	JBML	V	1962	25/05/2016	05/05/2017	Amoxicilina vo	Anafilaxia	Inmediata	Cadena lateral	CFR
23	45	MCR	M	1971	26/01/2012	17/05/2017	Amoxicilina vo	Cutánea	Inmediata	Cadena lateral	CFR
24	47	MEFR	M	1964	01/03/2017	23/06/2017	Augmentine vo	Cutánea	Inmediata	Cadena lateral	CFR
25	48	JMN	V	1978	20/03/2017	07/07/2017	Amoxicilina vo	Cutánea	ND	Cadena lateral	CFR
26	49	PRR	M	1955	24/03/2017	14/07/2017	Augmentine vo	Cutánea	Inmediata	Cadena lateral	CFR

ND = No determinado

Tabla A1.1. Historial clínico de los pacientes alérgicos a antibióticos β -lactámicos (continuación).

Nº	Nº FE	Ref.	Sexo	Fecha nacimiento	Fecha de la reacción	Fecha del estudio	Fármaco causante	Síntomas	Tiempo	Alérgeno	Tolerancia
27	50	RPL	M	1961	06/05/2017	14/07/2017	Augmentine vo	Cutánea	Inmediata	Cadena lateral	CFR
28	51	ICC	M	1948	01/09/2016	21/07/2017	Amoxicilina vo	Inespecific	Inmediata	Cadena lateral	CFR
29	54	FAL	V	1953	02/03/2017	24/10/2017	Augmentine iv	Cutánea	Inmediata	Cadena lateral	CFR
30	55	MPCS	M	1978	27/10/2016	24/10/2017	Augmentine vo	Anafilaxia	Inmediata	Cadena lateral	CFR
31	56	ECG	V	1951	08/09/2016	25/10/2017	Amoxicilina vo	Cutánea	Inmediata	Anillo	ND
32	57	BLM	V	1964	08/09/2017	26/10/2017	Augmentine vo	Anafilaxia	Inmediata	Cadena lateral	CFR
33	58	JFB	V	1976	01/10/2017	24/11/2017	Amoxicilina vo	Cutánea	Inmediata	Cadena lateral	CFR
34	59	IPC	M	1971	01/01/2016	29/11/2017	Amoxicilina vo	Cutánea	Inmediata	Cadena lateral	Penilevel
35	61	JCBF	V	1961	27/12/2016	11/12/2017	Amoxicilina vo	Anafilaxia	Inmediata	Anillo vs CL	ND
36	63	LMFR	V	1979	30/09/2017	13/12/2017	Augmentine vo	Anafilaxia	Inmediata	Anillo vs CL	ND
37	65	MES	M	1989	19/12/2012	18/12/2017	Augmentine vo	Cutánea	Inmediata	Cadena lateral	Penilevel
38	66	RMSJ	M	1971	11/07/2017	03/01/2018	Augmentine vo	Cutánea	Inmediata	Cadena lateral	CFR
39	68	JMIP	V	1968	19/01/2018	20/02/2018	Amoxicilina vo	Cutánea	ND	Cadena lateral	CFR
40	70	JMRD	V	1982	10/12/2017	06/03/2018	Amoxicilina vo	Cutánea	Tardía	Cadena lateral	CFR
41	71	JMAA	V	1982	24/02/2017	06/03/2018	Amoxicilina vo	Anafilaxia	Inmediata	Anillo	ND
42	73	MDPC	M	1951	10/10/2017	13/03/2018	Amoxicilina vo	Cutánea	Inmediata	Cadena lateral	Cefditoreno
43	74	LTG	M	1982	09/02/2018	13/04/2018	Augmentine vo	Cutánea	Inmediata	Anillo	ND
44	76	VCG	M	1963	21/10/2017	11/05/2018	Augmentine vo	Cutánea	ND	Cadena lateral	CFR
45	77	ABSF	M	1972	16/04/2018	17/05/2018	Augmentine vo	Anafilaxia	Inmediata	Anillo	CFR
46	80	SNC	M	1970	01/05/2018	25/06/2018	Amoxicilina vo	Cutánea	Inmediata	Cadena lateral	ND
47	81	MLLF	M	1985	18/02/2009	31/07/2018	Augmentine vo	Anafilaxia	Inmediata	Anillo	ND
48	82	MPDM	M	1951	27/03/2018	03/07/2018	Augmentine vo	Anafilaxia	Inmediata	CL vs Anillo	ND
49	83	AAS	V	1997	28/12/2017	11/07/2018	Amoxicilina vo	Cutánea	ND	Cadena lateral	CFR
50	92	IMR	M	1944	14/11/2018	08/01/2019	Augmentine iv	Cutánea	Inmediata	Cadena lateral	Cefditoreno
51	96	JHV	M	1955	27/01/2019	14/03/2019	Augmentine vo	Anafilaxia	ND	Cadena lateral	CFR
52	98	APS	V	1963	08/02/2019	08/04/2019	Amoxicilina vo	Cutánea	Inmediata	Cadena lateral	CCFR

ND = No determinado

Tabla A1.2. Resultados del ensayo de punción cutánea de los pacientes alérgicos.

Nº	Nº FE	Ref.	Test de punción cutánea															
			MDM	PPL	PG	AMP	AMX	A/C	CVL	CFR	CFT	CFZ	CFO	PPR	IMP	MRP	ERT	AZT
1	1	JPM	N	N	N	N	P	P	P	P	N	ND	ND	N	N	ND	ND	N
2	3	JSOJ	ND	P	ND	ND	ND	ND	ND	P	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	4	MJQR	ND	ND	ND	ND	P	P	ND	ND	P	ND	ND	ND	P	P	ND	ND
4	5	AFM	ND	ND	P	P	P	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	7	BAM	N	N	N	P	P	P	ND	N	P	ND	P	P	P	ND	ND	P
6	9	MAHB	N	N	N	P	P	P	N	N	N	ND	ND	N	P	ND	ND	P
7	10	BGD	N	N	N	P	P	P	ND	N	ND	ND	N	ND	ND	N	N	ND
8	11	ACB	N	N	N	P	P	P	ND	N	ND	ND	ND	N	N	ND	ND	ND
9	13	EVO	N	N	N	P	P	P	ND	N	N	ND	ND	P	N	P	ND	ND
10	14	JMR	N	N	P	P	P	P	ND	N	N	ND	ND	N	ND	N	ND	ND
11	16	MDAP	ND	ND	ND	P	P	P	ND	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	20	BGS	N	N	N	N	P	P	ND	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	22	EGM	N	N	N	N	N	ND	N	N	N	ND	ND	N	N	ND	ND	N
14	23	CPP	P	P	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15	24	ATS	N	N	N	P	P	P	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	25	JACM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17	27	FSM	N	N	N	N	N	N	ND	N	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	29	DGM	N	N	N	P	P	P	N	N	N	ND	ND	ND	N	N	ND	ND
19	30	MORH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	N	N	ND	ND	ND	ND	N	ND	ND
20	35	MTCA	N	N	N	ND	P	ND	ND	N	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21	36	RAA	N	N	N	N	N	N	ND	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22	41	JBML	N	N	N	N	P	N	ND	N	ND	ND	ND	ND	P	ND	ND	ND
23	45	MCR	N	N	N	N	P	P	ND	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24	47	MEFR	N	N	N	P	P	P	N	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
25	48	JMN	N	N	N	N	P	P	ND	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
26	49	PRR	N	N	ND	ND	P	P	ND	N	N	ND	ND	ND	ND	N	ND	ND

ND = No determinado; P = Positivo; N = Negativo; A/C = Amoxicilina/clavulánico

Tabla A1.2. Resultados del ensayo de punción cutánea de los pacientes alérgicos (continuación).

Nº	Nº FE	Ref.	Test de punción cutánea															
			MDM	PPL	PG	AMP	AMX	A/C	CVL	CFR	CFT	CFZ	CFO	PPR	IMP	MRP	ERT	AZT
27	50	RPL	N	N	N	P	P	P	ND	N	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
28	51	ICC	N	N	N	N	N	ND	ND	N	N	ND	ND	ND	ND	N	ND	N
29	54	FAL	N	N	N	P	P	P	ND	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
30	55	MPCS	ND	ND	N	P	P	ND	ND	ND	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
31	56	ECG	N	N	ND	ND	N	ND	N	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
32	57	BLM	ND	ND	P	ND	ND	P	ND	ND	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
33	58	JFB	N	N	N	P	P	P	ND	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
34	59	IPC	ND	ND	ND	ND	P	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
35	61	JCBF	N	N	P	ND	P	P	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
36	63	LMFR	N	N	N	ND	P	P	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
37	65	MES	N	N	ND	ND	P	P	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
38	66	RMSJ	N	N	N	P	P	P	N	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
39	68	JMIP	N	N	P	P	P	P	ND	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
40	70	JMRD	N	N	N	N	P	P	N	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
41	71	JMAA	N	N	N	N	N	N	ND	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	P
42	73	MDPC	N	N	N	N	P	P	N	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
43	74	LTG	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	N	N	ND	ND	N	ND	P	ND	ND
44	76	VCG	N	N	N	N	P	P	ND	N	N	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND
45	77	ABSF	N	N	P	ND	P	ND	ND	N	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
46	80	SNC	N	N	P	P	P	P	ND	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
47	81	MLLF	N	N	P	P	P	P	ND	N	N	ND	ND	ND	ND	N	ND	ND
48	82	MPDM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	P	ND	ND	ND	ND	ND	N	ND	P
49	83	AAS	N	N	N	N	ND	ND	ND	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
50	92	IMR	N	N	P	P	P	P	N	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
51	96	JHV	N	P	N	N	N	N	ND	N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
52	98	APS	N	N	N	P	P	P	ND	N	N	ND	P	N	N	ND	ND	ND

ND = No determinado; P = Positivo; N = Negativo; A/C = Amoxicilina/clavulánico

Tabla A1.3. Resultados de los ensayos *in vitro*, test de basófilos y de determinación de sIgE de los pacientes alérgicos.

Nº	Nº FE	Ref.	Test de activación de bsófilos (BAT)							Test PROV +	IgE Total (UI/mL)	IgE Específica (sIgE) (UI/mL)				
			AMX	A/C	CFR	CFT	CVL	PV	PG			PG	PV	AMP	AMX	CFC
1	1	JPM	N	N	N	ND	N	ND	ND	ND	265	0,04	0,01	ND	0,09	0,03
2	3	JSOJ	P	P	ND	ND	ND	ND	ND	ND	44	13,6	13,2	13,2	10,2	1,58
3	4	MJQR	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	129	0,01	0,03	0,05	0,11	0,01
4	5	AFM	ND	ND	P	P	ND	ND	ND	ND	105	0	0,02	0,02	0,02	0,03
5	7	BAM	N	ND	ND	ND	N	ND	ND	ND	23,9	0	0,01	0,03	0,01	0,04
6	9	MAHB	ND	P	N	ND	ND	ND	ND	ND	13,7	0,03	0	0,38	0,16	0,04
7	10	BGD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	14,3	0	0	0,03	0,01	0,02
8	11	ACB	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7686	2,16	1,91	1,64	1,64	0,79
9	13	EVO	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	86,8	0	0	ND	0,82	0,23
10	14	JMR	ND	N	N	ND	ND	ND	ND	ND	146	0,02	0,03	0,09	0,05	0,03
11	16	MDAP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1078	0,03	0,02	0,11	0,11	0,11
12	20	BGS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	95,3	0	0,03	0,02	0,01	0
13	22	EGM	ND	P	ND	ND	ND	ND	ND	ND	32,1	0	0	0,02	0,01	0,01
14	23	CPP	ND	P	N	ND	ND	ND	P	ND	298	0,02	0,02	0,06	0,07	0,04
15	24	ATS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	174	0,01	0,04	0,06	0,04	0,04
16	25	JACM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1207	0,04	0,07	0,14	0,24	0,2
17	27	FSM	ND	P	ND	ND	ND	N	ND	ND	2000	1,83	2,48	1,86	1,52	0,24
18	29	DGM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,83	0,97	1,91	0,86	0,14
19	30	MORH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	35,6	1,02	0,97	0,88	0,79	0,01
20	35	MTCA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	29,8	0,08	0,06	0,07	0,13	0
21	36	RAA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	124	0	0	0,03	0,95	0,02
22	41	JBML	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	206	0,02	0,04	0,05	0,05	0,03
23	45	MCR	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	114	0,01	0,01	0,04	0,1	0,01
24	47	MEFR	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	126	0,02	0,03	0,05	0,04	0,01
25	48	JMN	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	353	0	0,03	0,08	0,15	0,02
26	49	PRR	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	11,5	0	0	0,03	0,01	0,01

ND = No determinado; P = Positivo; N = Negativo; A/C = Amoxicilina/clavulánico

Tabla A1.3. Resultados de los ensayos *in vitro*, test de basófilos y de determinación de sIgE de los pacientes alérgicos (continuación).

Nº	Nº FE	Ref.	Test de activación de bsófilos (BAT)							Test PROV +	IgE Total (UI/mL)	IgE Específica (sIgE) (UI/mL)				
			AMX	A/C	CFR	CFT	CVL	PV	PG			PG	PV	AMP	AMX	CFC
27	50	RPL	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	287	0,12	0,37	0,1	0,29	0,1
28	51	ICC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	273	0,03	0,15	ND	0,07	0,12
29	54	FAL	ND	N	N	ND	ND	ND	ND	ND	144	0,3	0,27	0,16	0,24	0,12
30	55	MPCS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	63,3	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01
31	56	ECG	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	AMX	54,7	0,02	0,11	0,17	0,12	0
32	57	BLM	ND	ND	N	N	ND	ND	ND	ND	228	0,03	0,03	0,09	0,08	0,07
33	58	JFB	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1610	0,17	0,3	0,43	0,46	0,26
34	59	IPC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	33,9	0	0	0,03	0,02	0,01
35	61	JCBF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	23	0	0	0,03	0,03	0
36	63	LMFR	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	40,7	0	0,01	0,03	0,03	0,01
37	65	MES	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	75,7	0	0,01	0,04	0,12	0,07
38	66	RMSJ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	772	0,01	0,03	ND	0,07	0,04
39	68	JMIP	P	ND	N	ND	ND	ND	ND	ND	28,9	0	0	ND	0,09	0
40	70	JMRD	P	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	18,1	0,03	0,05	ND	0,24	0,03
41	71	JMAA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	135	0,43	0,69	ND	0,99	0,01
42	73	MDPC	P	ND	N	ND	ND	ND	ND	ND	18,8	0	0	ND	0	0
43	74	LTG	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	434	3,01	3,76	ND	7,02	0,14
44	76	VCG	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	130	0	0	ND	0,01	0,03
45	77	ABSF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	267	0,03	0,21	ND	0,24	0,08
46	80	SNC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19,1	0	0	ND	0,03	0,02
47	81	MLLF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4,4	0,09	0,06	ND	0,06	0,03
48	82	MPDM	P	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	55	0,01	0,38	ND	0,05	0,02
49	83	AAS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	224	0,61	0,81	ND	0,97	0,06
50	92	IMR	P	ND	N	ND	ND	ND	ND	ND	10,1	0	0	ND	0	0,01
51	96	JHV	P	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	361	0,02	0,01	0,05	0,05	0,03
52	98	APS	P	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	91,1	0,01	0,01	0,03	0,69	0,04

ND = No determinado; P = Positivo; N = Negativo; A/C = Amoxicilina/clavulánico

Tabla A1.4. Caracterización clínica de los controles utilizados durante esta tesis doctoral.

Nº	NºFE	Ref.	Sexo	Fecha nacimiento	Fármaco causante	IgE Total (UI/mL)	IgE Específica (sIgE) (UI/mL)					Test de punción cutánea						Tolerancia	
							PG	PV	AMP	AMX	CFC	MDM	PPL	PG	AMP	AMX	A/C		CFR
1	1	ACL	V	1997	Augmentine iv	18,5	0	0	0,01	0,01	0,01	ND	ND	ND	ND	N	N	ND	A/C
2	2	AVM	M	1986	Augmentine vo	62,8	0	0	0,04	0,01	0,02	ND	ND	ND	ND	N	ND	ND	A/C
3	3	LFRG	V	1963	Peni im	50,2	0	0	0,02	0,01	0,01	N	N	N	N	N	N	ND	A/C
4	4	BVA	M	1983	Augmentine vo	5,32	0	0	0,02	0,01	0,01	N	N	N	N	N	N	N	A/C, CFR
5	5	CRM	M	1939	Peni im	23,3	0	0	0,03	0,01	0,02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	AMX
6	6	EBS	M	1947	ND	125	0,01	0,05	0,05	0,06	0,04	N	N	N	N	N	N	ND	AMX
7	7	RDS	M	1954	Peni im	90,6	0,02	0	0,03	0,01	0,03	N	N	N	N	N	N	ND	AMX
8	8	MRN	M	1958	Peni im	13,8	0	0	0,03	0,01	0,01	N	N	N	N	N	N	ND	PG
9	9	AAC	V	1936	Peni im	285	0,01	0,01	0,09	0,03	0,05	N	N	N	N	N	N	ND	AMX
10	10	JOH	M	1962	Cefuroxima vo	2	0	0	0,01	0	0,01	N	N	N	N	N	N	ND	AMX
11	11	GVPC	V	1956	Peni im	413	0,01	0	0,08	0,05	0,07	N	N	N	N	N	N	ND	PG
12	12	MFA	V	1955	Amoxi vo	26	0	0	0,03	0,01	0	N	N	N	N	N	N	ND	CFR, CFC
13	13	JGL	V	1942	Ceftriaxona iv	319	0,01	0,01	0,1	0,07	0,06	N	N	N	N	N	N	ND	CFT
14	14	AGH	V	1992	ND	153	0	0	0,04	0,03	0,02	N	N	N	N	N	N	ND	AMX
15	15	JFG	V	1972	Augmentine vo	310	0,01	0,1	0,04	0,06	0,05	N	N	N	N	N	N	ND	AMX
16	16	IMM	M	1949	Cefuroxima vo	8,26	0	0	0	0,01	0	N	N	N	N	N	N	ND	CFR
17	17	HSM	M	1983	Peni im	13,2	0	0	0,01	0	0	N	N	N	N	N	N	ND	AMX
18	18	RPD	M	1976	Augmentine iv	18,2	0	0	0,02	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	N	N	A/C
19	19	MAA	V	1987	ND	129	0	0	0,04	0,02	0,03	N	N	N	N	N	N	ND	AMX
20	20	MJGV	M	1957	Ceftriaxona im	2	0	0	0,01	0	0	N	N	N	N	N	N	ND	CFT
21	21	OCPB	M	1947	ND	36,6	0	0	0	0,02	0	N	N	N	N	N	N	ND	AMX
22	22	RTS	V	1955	Peni im	7,91	0	0	0,01	0	0	N	N	N	N	N	N	N	A/C
23	23	FGO	M	1952	ND	45,1	0	0	0,01	0,01	0	N	N	N	N	N	N	ND	AMX
24	24	MRSR	M	1969	ND	603	0,01	0,01	0,07	0,07	0,07	N	N	N	N	N	N	ND	PG
25	25	JAB	M	1968	Peni im	74,9	0	0	0,03	0,02	0,01	N	N	N	N	N	N	N	PG

ND = No determinado; P = Positivo; N = Negativo, A/C = Amoxicilina/clavulánico

Tabla A1.4. Caracterización clínica de los controles utilizados durante esta tesis doctoral (continuación).

Nº	NºFE	Ref.	Sexo	Fecha nacimiento	Fármaco causante	IgE Total (UI/mL)	IgE Específica (sIgE) (UI/mL)					Test de punción cutánea						Tolerancia	
							PG	PV	AMP	AMX	CFC	MDM	PPL	PG	AMP	AMX	A/C		CFR
26	26	YGYR	M	1996	Amoxi vo	50	0	0	0,03	0	0	ND	ND	ND	ND	N	ND	N	AMX
27	27	LHB	V	1950	ND	91,9	0	0	0,02	0,03	0,02	N	N	N	N	N	N	ND	PG
28	28	YDD	M	1960	ND	10,6	0	0	0,02	0,01	0,02	N	N	N	N	N	N	ND	AMX
29	29	MLBC	M	1973	ND	88,6	0	0	0,03	0,02	0,02	N	N	N	N	N	N	ND	AMX
30	30	DPO	M	1946	Cefazolina iv	21,7	0	0	0,03	0	0,02	N	N	N	N	N	N	ND	CFZ
31	31	DSP	M	1969	Ampicilina im	15	0	0	0,02	0,02	0,01	N	N	N	N	N	N	ND	PG
32	32	DIC	M	1963	Amoxicilina vo	68,2	0	0,01	0,04	0,02	0,01	N	N	N	N	N	N	ND	AMX
33	33	EBP	M	1969	ND	15	0	0	0,02	0,01	0,01	N	N	N	N	N	N	ND	AMX
34	34	MJM	M	1968	Amoxicilina vo	41,9	0	0	0,02	0,02	0,01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
35	35	VPM	M	1957	Cefazolina iv	20	0	0	0,02	0,01	0	N	N	N	N	N	N	ND	CFZ
36	36	MPPB	M	1987	Peni	76,8	0	0	0,04	0,02	0,02	N	N	N	N	N	N	ND	AMX
37	37	MCGA	M	1972	ND	151	0,01	0,01	0,06	0,07	0,05	N	N	N	N	N	N	ND	AMX
38	38	PVMT	V	1969	ND	77	0,02	0	0,03	0,05	0,04	N	N	N	N	N	N	N	AMX
39	39	AIM	M	1936	ND	21,7	0	0	0	0,01	0	N	N	N	N	N	N	N	AMX
40	40	JMA	M	1955	ND	38,5	0	0	0,02	0,05	0	N	N	N	N	N	N	N	AMX
41	41	MPSM	M	1955	Amoxi iv	12,3	0	0	0,01	0	0	N	N	N	N	N	N	ND	AMX, CFR
42	42	FJMR	V	1951	Augmentine vo	724	0,02	0,04	0,06	0,05	0,07	N	N	N	N	N	N	N	AMX, CFR
43	43	MJIC	M	1958	Peni im	28,8	0,03	0	0,03	0,01	0,02	N	N	N	N	N	N	N	AMX
44	44	EPUM	M	1986	ND	127	0,02	0,01	0,04	0,02	0,03	N	N	N	N	N	N	N	AMX
45	45	SAC	M	1981	Augmentine	413	0,08	0,06	0,09	0,1	0,06	N	N	N	N	N	N	N	AMP, A/C
46	46	MHA	V	1935	ND	11,1	0,01	0,01	0,04	0,02	0	N	N	N	N	N	N	N	AMX
47	47	LBM	M	1996	Amoxicilina vo	182	0,02	0,03	0,07	0,05	0,01	N	N	N	N	N	N	N	AMX
48	48	ASV	M	1949	Peni im	65,7	0	0,06	0,05	0,02	0	N	N	N	N	N	N	N	AMX
49	59	IGR	M	1939	Peni im	432	0,02	0,04	0,09	0,09	0,06	N	N	N	N	N	N	N	AMX

ND = No determinado; P = Positivo; N = Negativo, A/C = Amoxicilina/clavulánico

ANEXO 2

Concentración de sIgE de pacientes y
controles

Tabla A2.1. Concentración de sIgE en suero de pacientes alérgicos para los antígenos PG, AMX y AZT determinados mediante la tecnología de DVD y cuantificados mediante una curva de calibración heteróloga en PBST.

N°	N° FE	REF	PG ImmunoCAP	H1-PG DVD	HSA-PG DVD	Amx ImmunoCAP	H1-AMX DVD	HSA-AMX DVD	H1-AZT DVD	HSA-AZT DVD
1	1	JPM	0.04	<LOD	<LOD	0.09	0.11 ± 0.04	<LOD	<LOD	<LOD
2	3	JSOJ	9.60	5.22 ± 0.19	9.25 ± 1.89	7.03	7.46 ± 1.57	3.00 ± 1.02	<LOD	<LOD
3	4	MJQR	0.01	<LOD	<LOD	0.11	0.13 ± 0.05	<LOD	<LOD	<LOD
4	5	AFM	0.00	<LOD	<LOD	0.02	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
5	7	BAM	0.00	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
6	9	MAHB	0.03	<LOD	<LOD	0.16	0.22 ± 0.06	<LOD	<LOD	<LOD
7	10	BGD	0.00	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
8	11	ACB	2.16	0.59 ± 0.10	0.43 ± 0.05	1.64	1.44 ± 0.41	1.46 ± 0.84	<LOD	<LOD
9	13	EVO	0.00	<LOD	<LOD	0.82	0.61 ± 0.14	0.25 ± 0.10	<LOD	<LOD
10	14	JMR	0.02	<LOD	<LOD	0.05	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
11	16	MDAP	0.03	<LOD	<LOD	0.11	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
12	20	BGS	0.00	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
13	22	EGM	0	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
14	23	CPP	0.02	<LOD	<LOD	0.07	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
15	24	ATS	0.01	<LOD	<LOD	0.04	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
16	25	JACM	0.04	<LOD	<LOD	0.24	0.11 ± 0.10	<LOD	<LOD	<LOD
17	27	FSM	2.14	0.31 ± 0.10	0.39 ± 0.04	1.02	0.29 ± 0.08	0.11 ± 0.04	<LOD	<LOD
18	29	DGM	1.83	0.41 ± 0.14	<LOD	0.86	0.32 ± 0.09	<LOD	<LOD	<LOD
19	30	MORBH	1.02	0.38 ± 0.11	0.22 ± 0.12	0.79	0.31 ± 0.07	0.15 ± 0.06	<LOD	<LOD
20	35	MTCA	0.08	0.32 ± 0.09	0.32 ± 0.08	0.13	0.30 ± 0.07	0.12 ± 0.01	<LOD	<LOD
21	36	RAA	0.00	<LOD	<LOD	0.95	2.29 ± 0.31	<LOD	<LOD	<LOD
22	41	JBML	0.02	<LOD	<LOD	0.05	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
23	45	MCR	0.01	<LOD	<LOD	0.10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
24	47	MEFR	0.02	<LOD	<LOD	0.04	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
25	48	JMN	0.00	<LOD	<LOD	0.15	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
26	49	PRR	0.00	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

LOD = 0.06 UI/mL

Tabla A2.1. Concentración de sIgE en suero de pacientes alérgicos para los antígenos PG, AMX y AZT determinados mediante la tecnología de DVD y cuantificados mediante una curva de calibración heteróloga en PBST (continuación).

Nº	Nº FE	REF	PG ImmunoCAP	H1-PG DVD	HSA-PG DVD	Amx ImmunoCAP	H1-AMX DVD	HSA-AMX DVD	H1-AZT DVD	HSA-AZT DVD
27	50	RPL	0.12	<LOD	<LOD	0.29	0.30 ± 0.17	0.14 ± 0.05	<LOD	<LOD
28	51	ICC	0.03	<LOD	<LOD	0.07	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
29	54	FAL	0.30	0.14 ± 0.06	<LOD	0.24	0.12 ± 0.05	<LOD	<LOD	<LOD
30	55	MPCS	0.01	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
31	56	ECG	0.02	<LOD	<LOD	0.12	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
32	57	BLM	0.03	<LOD	<LOD	0.08	0.19 ± 0.07	<LOD	<LOD	<LOD
33	58	JFB	0.17	<LOD	<LOD	0.46	0.17 ± 0.04	0.07 ± 0.04	<LOD	<LOD
34	59	IPC	0.00	<LOD	<LOD	0.02	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
35	61	JCBF	0.00	<LOD	<LOD	0.03	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
36	63	LMFR	0.00	<LOD	<LOD	0.03	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
37	65	MES	0.00	<LOD	<LOD	0.12	0.08 ± 0.02	<LOD	<LOD	<LOD
38	66	RMSJ	0.01	<LOD	<LOD	0.07	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
39	68	JMIP	0.00	<LOD	<LOD	0.09	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
40	70	JMRD	0.03	<LOD	<LOD	0.24	0.30 ± 0.13	<LOD	<LOD	<LOD
41	71	JMAA	0.43	0.10 ± 0.04	<LOD	0.99	0.13 ± 0.05	<LOD	<LOD	<LOD
42	73	MDPC	0.00	<LOD	<LOD	0.00	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
43	74	LTG	3.01	0.54 ± 0.19	1.48 ± 0.77	7.02	2.68 ± 0.47	3.17 ± 0.68	<LOD	<LOD
44	76	VCG	0.00	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
45	77	ABSF	0.03	<LOD	<LOD	0.24	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
46	80	SNC	0.00	<LOD	<LOD	0.03	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
47	81	MLLF	0.09	<LOD	<LOD	0.06	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
48	82	MPDM	0.01	<LOD	<LOD	0.05	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
49	83	AAS	0.61	<LOD	0.19 ± 0.08	0.97	0.17 ± 0.06	<LOD	<LOD	<LOD
50	92	IMR	0.00	<LOD	<LOD	0.00	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
51	96	JHV	0.02	<LOD	<LOD	0.05	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
52	98	APS	0.01	<LOD	<LOD	0.69	0.29 ± 0.07	<LOD	<LOD	<LOD

LOD = 0.06 UI/mL

Tabla A2.2. Concentración de sIgE de los controles para los antígenos PG, AMX y AZT determinados mediante tecnología de DVD*.

Nº	Nº FE	REF	PG ImmunoCAP	H1-PG DVD	HSA-PG DVD	Amx ImmunoCAP	H1-AMX DVD	HSA-AMX DVD	H1-AZT DVD	HSA-AZT DVD	HSA-AZT DVD
1	1	ACL	0	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
2	2	AVM	0	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
3	3	LFRG	0	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
4	4	BVA	0	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
5	5	CRM	0	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
6	6	EBS	0.01	<LOD	<LOD	0.06	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
7	7	RDS	0.02	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
8	8	MRN	0	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
9	9	AAC	0.01	<LOD	<LOD	0.03	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
10	10	JOH	0	<LOD	<LOD	0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
11	11	GVPC	0.01	<LOD	<LOD	0.05	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
12	12	MFA	0	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
13	14	AGH	0	<LOD	<LOD	0.03	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
14	15	JFG	0.01	<LOD	<LOD	0.06	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
15	16	IMM	0	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
16	17	HSM	0	<LOD	<LOD	0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
17	18	RPD	0	<LOD	<LOD	0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
18	19	MAA	0	<LOD	<LOD	0.02	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
19	20	MJGV	0	<LOD	<LOD	0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
20	21	ODPB	0	<LOD	<LOD	0.02	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
21	22	RTS	0	<LOD	<LOD	0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
22	23	FGO	0	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
23	24	MRSR	0.01	<LOD	<LOD	0.07	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
24	25	JAB	0	<LOD	<LOD	0.02	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

*Todos los controles mostraron resultados de sIgE por debajo del LOD independientemente del sistema de calibración utilizado.

Tabla A2.2. Concentración de sIgE de los controles para los antígenos PG, AMX y AZT determinados mediante tecnología de DVD (continuación)*.

N°	N° FE	REF	PG ImmunoCAP	H1-PG DVD	HSA-PG DVD	Amx ImmunoCAP	H1-AMX DVD	HSA-AMX DVD	H1-AZT DVD	HSA-AZT DVD	HSA-AZT DVD
25	26	YGYR	0	<LOD	<LOD	0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
26	27	LHB	0	<LOD	<LOD	0.03	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
27	28	YDD	0	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
28	29	MLBC	0	<LOD	<LOD	0.02	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
29	30	DPO	0	<LOD	<LOD	0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
30	31	DSP	0	<LOD	<LOD	0.02	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
31	32	DIC	0	<LOD	<LOD	0.02	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
32	33	EBP	0	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
33	34	MJM	0	<LOD	<LOD	0.02	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
34	35	VPM	0	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
35	36	MPPB	0	<LOD	<LOD	0.02	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
36	37	MCGA	0.01	<LOD	<LOD	0.07	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
37	38	PVMT	0.02	<LOD	<LOD	0.05	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
38	39	AIM	0	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
39	40	JMA	0	<LOD	<LOD	0.05	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
40	41	MPSM	0	<LOD	<LOD	0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
41	42	FJMR	0.02	<LOD	<LOD	0.05	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
42	43	MJIC	0.03	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
43	44	EPUM	0.02	<LOD	<LOD	0.02	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
44	45	SAC	0.08	<LOD	<LOD	0.1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
45	46	MHA	0.01	<LOD	<LOD	0.02	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
46	47	LBM	0.02	<LOD	<LOD	0.05	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
47	48	ASV	0	<LOD	<LOD	0.02	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
48	59	IGR	0.02	<LOD	<LOD	0.09	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

*Todos los controles mostraron resultados de sIgE por debajo del LOD independientemente del sistema de calibración utilizado.

Tabla A2.3. Concentración de sIgE en suero de pacientes alérgicos para los antígenos PG, AMX y AZT determinados mediante la tecnología de DVD y cuantificados mediante una curva de calibración heteróloga en suero.

N°	N° FE	REF	PG ImmunoCAP	H1-PG DVD	HSA-PG DVD	Amx ImmunoCAP	H1-AMX DVD	HSA-AMX DVD	H1-AZT DVD	HSA-AZT DVD
1	1	JPM	0.04	<LOD	<LOD	0.09	0.26 ± 0.10	<LOD	<LOD	<LOD
2	3	JSOJ	9.60	13.35 ± 2.84	12.10 ± 2.32	7.03	20.61 ± 1.91	6.30 ± 1.25	<LOD	<LOD
3	4	MJQR	0.01	<LOD	<LOD	0.11	0.32 ± 0.12	<LOD	<LOD	<LOD
4	5	AFM	0.00	<LOD	<LOD	0.02	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
5	7	BAM	0.00	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
6	9	MAHB	0.03	<LOD	<LOD	0.16	0.54 ± 0.17	<LOD	<LOD	<LOD
7	10	BGD	0.00	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
8	11	ACB	2.16	1.54 ± 0.33	1.11 ± 0.15	1.64	5.20 ± 2.98	2.94 ± 1.05	<LOD	<LOD
9	13	EVO	0.00	<LOD	<LOD	0.82	1.63 ± 0.41	0.63 ± 0.23	<LOD	<LOD
10	14	JMR	0.02	<LOD	<LOD	0.05	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
11	16	MDAP	0.03	<LOD	<LOD	0.11	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
12	20	BGS	0.00	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
13	22	EGM	0	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
14	23	CPP	0.02	<LOD	<LOD	0.07	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
15	24	ATS	0.01	<LOD	<LOD	0.04	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
16	25	JACM	0.04	<LOD	<LOD	0.24	0.27 ± 0.17	<LOD	<LOD	<LOD
17	27	FSM	2.14	0.79 ± 0.28	1.00 ± 0.11	1.02	0.73 ± 0.22	0.25 ± 0.05	<LOD	<LOD
18	29	DGM	1.83	1.06 ± 0.37	<LOD	0.86	0.83 ± 0.23	<LOD	<LOD	<LOD
19	30	MORBH	1.02	0.97 ± 0.29	0.56 ± 0.31	0.79	0.80 ± 0.18	0.35 ± 0.10	<LOD	<LOD
20	35	MTCA	0.08	0.82 ± 0.23	0.81 ± 0.03	0.13	0.76 ± 0.19	0.28 ± 0.04	<LOD	<LOD
21	36	RAA	0.00	<LOD	<LOD	0.95	7.29 ± 2.75	<LOD	<LOD	<LOD
22	41	JBML	0.02	<LOD	<LOD	0.05	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
23	45	MCR	0.01	<LOD	<LOD	0.10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
24	47	MEFR	0.02	<LOD	<LOD	0.04	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
25	48	JMN	0.00	<LOD	<LOD	0.15	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

LOD = 0.12 UI/mL

Tabla A2.3. Concentración de sIgE en suero de pacientes alérgicos para los antígenos PG, AMX y AZT determinados mediante la tecnología de DVD y cuantificados mediante una curva de calibración heteróloga en suero (continuación).

Nº	Nº FE	REF	PG ImmunoCAP	H1-PG DVD	HSA-PG DVD	Amx ImmunoCAP	H1-AMX DVD	HSA-AMX DVD	H1-AZT DVD	HSA-AZT DVD
27	50	RPL	0.12	<LOD	<LOD	0.29	0.77 ± 0.46	0.35 ± 0.17	<LOD	<LOD
28	51	ICC	0.03	<LOD	<LOD	0.07	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
29	54	FAL	0.30	0.33 ± 0.16	<LOD	0.24	0.28 ± 0.14	<LOD	<LOD	<LOD
30	55	MPCS	0.01	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
31	56	ECG	0.02	<LOD	<LOD	0.12	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
32	57	BLM	0.03	<LOD	<LOD	0.08	0.47 ± 0.19	<LOD	<LOD	<LOD
33	58	JFB	0.17	<LOD	<LOD	0.46	0.43 ± 0.11	0.30 ± 0.12	<LOD	<LOD
34	59	IPC	0.00	<LOD	<LOD	0.02	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
35	61	JCBF	0.00	<LOD	<LOD	0.03	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
36	63	LMFR	0.00	<LOD	<LOD	0.03	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
37	65	MES	0.00	<LOD	<LOD	0.12	0.19 ± 0.06	<LOD	<LOD	<LOD
38	66	RMSJ	0.01	<LOD	<LOD	0.07	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
39	68	JMIP	0.00	<LOD	<LOD	0.09	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
40	70	JMRD	0.03	<LOD	<LOD	0.24	0.77 ± 0.36	<LOD	<LOD	<LOD
41	71	JMAA	0.43	0.23 ± 0.10	<LOD	0.99	0.31 ± 0.12	<LOD	<LOD	<LOD
42	73	MDPC	0.00	<LOD	<LOD	0.00	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
43	74	LTG	3.01	1.40 ± 0.54	3.13 ± 0.87	7.02	9.69 ± 2.92	5.1 ± 1.69	<LOD	<LOD
44	76	VCG	0.00	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
45	77	ABSF	0.03	<LOD	<LOD	0.24	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
46	80	SNC	0.00	<LOD	<LOD	0.03	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
47	81	MLLF	0.09	<LOD	<LOD	0.06	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
48	82	MPDM	0.01	<LOD	<LOD	0.05	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
49	83	AAS	0.61	<LOD	0.48 ± 0.04	0.97	0.42 ± 0.16	<LOD	<LOD	<LOD
50	92	IMR	0.00	<LOD	<LOD	0.00	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
51	96	JHV	0.02	<LOD	<LOD	0.05	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
52	98	APS	0.01	<LOD	<LOD	0.69	0.72 ± 0.20	<LOD	<LOD	<LOD

LOD = 0.12 UI/mL

Tabla A2.4. Concentración de sIgE en suero de pacientes alérgicos para los antígenos PG y AMX determinados mediante la tecnología de DVD y cuantificados mediante una curva de calibración homóloga.

Nº	Nº FE	REF	PG ImmunoCAP	H1-PG DVD	Amx ImmunoCAP	H1-AMX DVD	Nº	Nº FE	REF	PG ImmunoCAP	H1-PG DVD	Amx ImmunoCAP	H1-AMX DVD
1	1	JPM	0.04	<LOD	0.09	0.10 ± 0.03	27	50	RPL	0.12	<LOD	0.29	0.38 ± 0.28
2	3	JSOJ	9.60	12.76 ± 0.17	7.03	9.16 ± 2.62	28	51	ICC	0.03	<LOD	0.07	<LOD
3	4	MJQR	0.01	<LOD	0.11	0.13 ± 0.05	29	54	FAL	0.30	0.21 ± 0.05	0.24	0.11 ± 0.05
4	5	AFM	0.00	<LOD	0.02	<LOD	30	55	MPCS	0.01	<LOD	0.01	<LOD
5	7	BAM	0.00	<LOD	0.01	<LOD	31	56	ECG	0.02	<LOD	0.12	<LOD
6	9	MAHB	0.03	<LOD	0.16	0.23 ± 0.09	32	57	BLM	0.03	<LOD	0.08	0.20 ± 0.10
7	10	BGD	0.00	<LOD	0.01	<LOD	33	58	JFB	0.17	<LOD	0.46	0.17 ± 0.05
8	11	ACB	2.16	1.28 ± 0.47	1.64	2.16 ± 0.74	34	59	IPC	0.00	<LOD	0.02	<LOD
9	13	EVO	0.00	<LOD	0.82	0.90 ± 0.25	35	61	JCBF	0.00	<LOD	0.03	<LOD
10	14	JMR	0.02	<LOD	0.05	<LOD	36	63	LMFR	0.00	<LOD	0.03	<LOD
11	16	MDAP	0.03	<LOD	0.11	<LOD	37	65	MES	0.00	<LOD	0.12	0.08 ± 0.02
12	20	BGS	0.00	<LOD	0.01	<LOD	38	66	RMSJ	0.01	<LOD	0.07	<LOD
13	22	EGM	0	<LOD	0.01	<LOD	39	68	JMIP	0.00	<LOD	0.09	<LOD
14	23	CPP	0.02	<LOD	0.07	<LOD	40	70	JMRD	0.03	<LOD	0.24	0.37 ± 0.21
15	24	ATS	0.01	<LOD	0.04	<LOD	41	71	JMAA	0.43	0.25 ± 0.07	0.99	0.12 ± 0.05
16	25	JACM	0.04	<LOD	0.24	0.12 ± 0.01	42	73	MDPC	0.00	<LOD	0.00	<LOD
17	27	FSM	2.14	0.76 ± 0.27	1.02	0.34 ± 0.13	43	74	LTG	3.01	1.43 ± 0.44	7.02	4.93 ± 1.05
18	29	DGM	1.83	1.11 ± 0.28	0.86	0.40 ± 0.13	44	76	VCG	0.00	<LOD	0.01	<LOD
19	30	MORBH	1.02	1.02 ± 0.39	0.79	0.38 ± 0.11	45	77	ABSF	0.03	<LOD	0.24	<LOD
20	35	MTCA	0.08	1.01 ± 0.42	0.13	0.36 ± 0.11	46	80	SNC	0.00	<LOD	0.03	<LOD
21	36	RAA	0.00	<LOD	0.95	3.38 ± 0.58	47	81	MLLF	0.09	<LOD	0.06	<LOD
22	41	JBML	0.02	<LOD	0.05	<LOD	48	82	MPDM	0.01	<LOD	0.05	<LOD
23	45	MCR	0.01	<LOD	0.10	<LOD	49	83	AAS	0.61	<LOD	0.97	0.18 ± 0.08
24	47	MEFR	0.02	<LOD	0.04	<LOD	50	92	IMR	0.00	<LOD	0.00	<LOD
25	48	JMN	0.00	<LOD	0.15	<LOD	51	96	JHV	0.02	<LOD	0.05	<LOD
26	49	PRR	0.00	<LOD	0.01	<LOD	52	98	APS	0.01	<LOD	0.69	0.33 ± 0.12

LOD = 0.14 UI/mL para sIgE anti-PG y 0.06 UI/mL para sIgE anti-AMX

Tabla A2.5. Concentración de sIgE en suero de pacientes alérgicos para los antígenos PG y AMX determinados mediante la tecnología de DVD y cuantificados mediante dos sistemas de calibración interna.

Nº Paciente	sIgE Anti-PG			sIgE Anti-AMX		
	ImmunoCAP	Interna Homóloga	Patrón interno	ImmunoCAP	Interna Homóloga	Patrón interno
1	0.04	< LOD	< LOD	0.09	0.11 ± 0.02	0.21 ± 0.07
2	9.56	11.10 ± 2.79	11.62 ± 2.52	7.03	8.00 ± 2.50	8.22 ± 2.71
3	0.01	< LOD	< LOD	0.11	0.17 ± 0.06	0.11 ± 0.03
6	0.03	< LOD	< LOD	0.16	0.17 ± 0.07	0.25 ± 0.03
8	2.16	1.42 ± 0.19	1.28 ± 0.19	1.64	1.63 ± 0.54	1.19 ± 0.32
9	0	0.07 ± 0.09	< LOD	0.82	0.70 ± 0.06	0.72 ± 0.24
16	0.04	0.10 ± 0.10	< LOD	0.24	< LOD	0.25 ± 0.05
17	2.14	0.89 ± 0.29	1.17 ± 0.22	1.02	0.33 ± 0.10	1.01 ± 0.27
18	1.83	1.07 ± 0.30	1.35 ± 0.21	0.86	0.50 ± 0.22	0.67 ± 0.14
19	1.02	0.99 ± 0.19	1.43 ± 0.19	0.79	0.39 ± 0.17	0.94 ± 0.16
20	0.08	1.18 ± 0.41	1.68 ± 0.22	0.13	0.59 ± 0.25	1.13 ± 0.11
21	0	< LOD	< LOD	0.95	5.38 ± 1.09	2.97 ± 0.52
27	0.12	< LOD	< LOD	0.29	0.42 ± 0.11	0.34 ± 0.03
29	0.3	0.35 ± 0.07	0.27 ± 0.05	0.24	0.35 ± 0.13	0.10 ± 0.02
33	0.17	< LOD	< LOD	0.46	0.31 ± 0.10	0.15 ± 0.04
37	0	< LOD	< LOD	0.12	0.14 ± 0.10	< LOD
40	0.03	< LOD	< LOD	0.24	0.12 ± 0.04	0.21 ± 0.07
43	3.01	3.00 ± 0.60	3.25 ± 0.48	7.02	7.58 ± 0.86	7.34 ± 0.41
52	0.01	< LOD	< LOD	0.69	0.89 ± 0.28	1.00 ± 0.20

LOD de la calibración interna homóloga = 0.14 UI/mL para sIgE anti-PG y 0.06 UI/mL para sIgE anti-AMX,

LOD de la calibración con patrón interno = 0.12 UI/mL para sIgE anti-PG y 0.06 UI/mL para sIgE anti-AMX.

Tabla A2.6. Concentración de sIgE en suero de pacientes alérgicos para los antígenos PG y AMX determinados por el sistema basado en disco compacto semiautomatizado (COBIOPHAD).

N°	N° FE	Ref.	sIgE Anti-PG		sIgE Anti-AMX		N°	N° FE	Ref.	sIgE Anti-PG		sIgE Anti-AMX	
			ImmunoCAP	COBIOPHAD	ImmunoCAP	COBIOPHAD				ImmunoCAP	COBIOPHAD	ImmunoCAP	COBIOPHAD
1	1	JPM	0.04	< LOD	0.09	< LOD	27	50	RPL	0.12	< LOD	0.29	< LOD
2	3	JSOJ	9.60	4.43 ± 0.76	7.03	3.35 ± 1.83	28	51	ICC	0.03	< LOD	0.07	< LOD
3	4	MJQR	0.01	< LOD	0.11	< LOD	29	54	FAL	0.30	< LOD	0.24	< LOD
4	5	AFM	0.00	< LOD	0.02	< LOD	30	55	MPCS	0.01	< LOD	0.01	< LOD
5	7	BAM	0.00	< LOD	0.01	< LOD	31	56	ECG	0.02	< LOD	0.12	< LOD
6	9	MAHB	0.03	< LOD	0.16	< LOD	32	57	BLM	0.03	< LOD	0.08	< LOD
7	10	BGD	0.00	< LOD	0.01	< LOD	33	58	JFB	0.17	< LOD	0.46	0.20 ± 0.06
8	11	ACB	2.16	1.25 ± 0.20	1.64	0.73 ± 0.06	34	59	IPC	0.00	< LOD	0.02	< LOD
9	13	EVO	0.00	< LOD	0.82	0.28 ± 0.02	35	61	JCBF	0.00	< LOD	0.03	< LOD
10	14	JMR	0.02	< LOD	0.05	< LOD	36	63	LMFR	0.00	< LOD	0.03	< LOD
11	16	MDAP	0.03	< LOD	0.11	< LOD	37	65	MES	0.00	< LOD	0.12	< LOD
12	20	BGS	0.00	< LOD	0.01	< LOD	38	66	RMSJ	0.01	< LOD	0.07	< LOD
13	22	EGM	0	< LOD	0.01	< LOD	39	68	JMIP	0.00	< LOD	0.09	< LOD
14	23	CPP	0.02	< LOD	0.07	< LOD	40	70	JMRD	0.03	< LOD	0.24	< LOD
15	24	ATS	0.01	< LOD	0.04	< LOD	41	71	JMAA	0.43	< LOD	0.99	< LOD
16	25	JACM	0.04	< LOD	0.24	< LOD	42	73	MDPC	0.00	< LOD	0.00	< LOD
17	27	FSM	2.14	0.47 ± 0.02	1.02	< LOD	43	74	LTG	3.01	0.94 ± 0.21	7.02	0.73 ± 0.33
18	29	DGM	1.83	< LOD	0.86	0.22 ± 0.02	44	76	VCG	0.00	< LOD	0.01	< LOD
19	30	MORH	1.02	0.48 ± 0.01	0.79	0.52 ± 0.04	45	77	ABSF	0.03	< LOD	0.24	< LOD
20	35	MTCA	0.08	0.44 ± 0.21	0.13	0.68 ± 0.07	46	80	SNC	0.00	< LOD	0.03	< LOD
21	36	RAA	0.00	< LOD	0.95	0.19 ± 0.06	47	81	MLLF	0.09	< LOD	0.06	< LOD
22	41	JBML	0.02	< LOD	0.05	< LOD	48	82	MPDM	0.01	< LOD	0.05	< LOD
23	45	MCR	0.01	< LOD	0.10	< LOD	49	83	AAS	0.61	0.20 ± 0.05	0.97	< LOD
24	47	MEFR	0.02	< LOD	0.04	0.21 ± 0.01	50	92	IMR	0.00	< LOD	0.00	< LOD
25	48	JMN	0.00	< LOD	0.15	< LOD	51	96	JHV	0.02	< LOD	0.05	< LOD
26	49	PRR	0.00	< LOD	0.01	< LOD	52	98	APS	0.01	< LOD	0.69	0.21 ± 0.04

LOD = 0.17 UI/mL

Tabla A2.7. Concentración de sIgE en suero de controles para los antígenos PG y AMX determinados por el sistema basado en disco compacto semiautomatizado (COBIOPHAD).

N°	N° FE	REF	sIgE Anti-PG		sIgE Anti-AMX		N°	N° FE	REF	sIgE Anti-PG		sIgE Anti-AMX	
			ImmunoCAP	COBIOPHAD	ImmunoCAP	COBIOPHAD				ImmunoCAP	COBIOPHAD	ImmunoCAP	COBIOPHAD
1	1	ACL	0	<LOD	0.01	<LOD	25	26	YGYR	0	<LOD	0	<LOD
2	2	AVM	0	<LOD	0.01	<LOD	26	27	LHB	0	<LOD	0.03	<LOD
3	3	LFRG	0	<LOD	0.01	<LOD	27	28	YDD	0	<LOD	0.01	<LOD
4	4	BVA	0	<LOD	0.01	<LOD	28	29	MLBC	0	<LOD	0.02	<LOD
5	5	CRM	0	<LOD	0.01	<LOD	29	30	DPO	0	<LOD	0	<LOD
6	6	EBS	0.01	<LOD	0.06	<LOD	30	31	DSP	0	<LOD	0.02	<LOD
7	7	RDS	0.02	<LOD	0.01	<LOD	31	32	DIC	0	<LOD	0.02	<LOD
8	8	MRN	0	<LOD	0.01	<LOD	32	33	EBP	0	<LOD	0.01	<LOD
9	9	AAC	0.01	<LOD	0.03	<LOD	33	34	MJM	0	<LOD	0.02	<LOD
10	10	JOH	0	<LOD	0	<LOD	34	35	VPM	0	<LOD	0.01	<LOD
11	11	GVPC	0.01	<LOD	0.05	<LOD	35	36	MPPB	0	<LOD	0.02	<LOD
12	12	MFA	0	<LOD	0.01	<LOD	36	37	MCGA	0.01	<LOD	0.07	<LOD
13	14	AGH	0	<LOD	0.03	<LOD	37	38	PVMT	0.02	<LOD	0.05	<LOD
14	15	JFG	0.01	<LOD	0.06	<LOD	38	39	AIM	0	<LOD	0.01	<LOD
15	16	IMM	0	<LOD	0.01	<LOD	39	40	JMA	0	<LOD	0.05	<LOD
16	17	HSM	0	<LOD	0	<LOD	40	41	MPSM	0	<LOD	0	<LOD
17	18	RPD	0	<LOD	0	<LOD	41	42	FJMR	0.02	<LOD	0.05	<LOD
18	19	MAA	0	<LOD	0.02	<LOD	42	43	MJIC	0.03	<LOD	0.01	<LOD
19	20	MJGV	0	<LOD	0	<LOD	43	44	EPUM	0.02	<LOD	0.02	<LOD
20	21	ODPB	0	<LOD	0.02	<LOD	44	45	SAC	0.08	<LOD	0.1	<LOD
21	22	RTS	0	<LOD	0	<LOD	45	46	MHA	0.01	<LOD	0.02	<LOD
22	23	FGO	0	<LOD	0.01	<LOD	46	47	LBM	0.02	<LOD	0.05	<LOD
23	24	MRSR	0.01	<LOD	0.07	<LOD	47	48	ASV	0	<LOD	0.02	<LOD
24	25	JAB	0	<LOD	0.02	<LOD	48	59	IGR	0.02	<LOD	0.09	<LOD

LOD = 0.17 UI/mL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA