

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. Sin embargo, hasta un 10% de la población refiere haber presentado síntomas alérgicos derivados de la administración de antibióticos β -lactámicos. En consecuencia, esta porción de la población se considera “alérgica” a estos fármacos, obligando en caso necesario a la utilización de otros antibióticos, en ocasiones menos eficaces e inseguros.

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 controlada, y pruebas intraepidérmicas e intradérmicas, observando la reacción que producen los diferentes β -lactámicos en el paciente. A pesar de su amplia utilización, estas pruebas tienen limitaciones como falsos positivos, falta de selectividad, y lo más importante, 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 la necesidad de 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 nacional 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, ayuda al diagnóstico preciso de la enfermedad alérgica, ofrece seguridad, y proporciona resultados cuantitativos.

Los sistemas de diagnóstico *in vitro* en uso utilizan una instrumentación analítica importante, manejada por personal cualificado, así como materiales desechables caros, por lo que este tipo de pruebas se realizan únicamente por servicios de alergia y/o análisis clínicos de grandes centros sanitarios o bien por compañías especializadas en diagnóstico clínico. Por otro lado, ninguno de estos ensayos está validado lo que da una idea de la dificultad de desarrollar ensayos de diagnóstico de alergias a fármacos en general y a β -lactámicos en particular, y de las debilidades de los utilizados. En consecuencia, hay 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, basado en tecnología de disco compacto para la detección

y cuantificación *in vitro* de niveles de IgEs específicas de un amplio espectro de antibióticos β -lactámicos en muestras de suero.

Las limitaciones más críticas para la determinación de IgE específica multianalito mediante métodos inmunoquímicos son los relacionados con la sensibilidad, selectividad y procesado simultáneo de varios ensayos y diferentes analitos a muy bajas concentraciones. Por lo tanto, una parte importante de la tesis se ha centrado en la selección de antígenos, inmunoreactivos, formato y optimización de diferentes parámetros clave en inmunoensayo.

Otra parte importante de la tesis se ha centrado en alcanzar la sensibilidad y selectividad requeridas para determinar los niveles de IgE específica presentes en suero. Por otro lado, la mejora de la reproducibilidad de los resultados también ha sido un objetivo crítico abordado. La estrategia ha consistido en estudiar diferentes sistemas de calibración con el objetivo de estandarizar la cuantificación de los métodos *in vitro* de diagnóstico de este tipo de alergias.

Finalmente, la validación del ensayo desarrollado se realizó 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 clases 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, aportando nuevas y mejores herramientas de diagnóstico clínico *in vitro* 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. Esta información se ha empleado para el desarrollo final de un ensayo multianalito y multimuestra de un sistema semiautomatizado.