



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

DESARROLLO DE UNA PRUEBA DE DIAGNÓSTICO  
PARA LA DETECCIÓN RÁPIDA DE ALERGIA A LA  
PENICILINA EN EL PUNTO DE ATENCIÓN.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Checa Gómez, Patricia

Tutor/a: Morais Ezquerro, Sergi Beñat

Cotutor/a: Sena Torralba, Amadeo

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

## **TÍTULO**

Desarrollo de una prueba de diagnóstico para la detección rápida de alergia a la penicilina en el punto de atención.

## **RESUMEN**

La ingestión oral de penicilina sigue siendo la principal causa de reacciones inmunes a medicamentos, afectando aproximadamente al 10% de la población general con alergias a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Sin embargo, una evaluación precisa revela que muchas personas están mal clasificadas como alérgicas, lo que lleva a la prescripción innecesaria de antibióticos alternativos. Las iniciativas para desclasificar incluyen protocolos que involucran pruebas tanto *in vivo* como *in vitro*. No obstante, la aplicación clínica de estos métodos se ve obstaculizada por la demora y el riesgo de las pruebas *in vivo*. En este trabajo, hemos desarrollado y caracterizado haptenos de penicilina G conjugados con BSA, que han demostrado capturar eficazmente IgEs humanas contra la penicilina G en ensayos ELISA, permitiendo un límite de detección de  $0,11 \text{ U mL}^{-1}$  de IgEs, utilizando un formato de ensayo indirecto. Los mismos bioreactivos se han empleado en el desarrollo de una tira de papel basada en nanopartículas de oro y carbono que proporciona un resultado de Grado 2 ( $0,7\text{-}3,5 \text{ U mL}^{-1}$  de IgE específica), lo cual es altamente útil para la identificación y detección rápida de pacientes alérgicos a la penicilina G en el punto de atención. Finalmente, se aplicó electroforesis a la tira de papel para mejorar la sensibilidad del ensayo eliminando las h-IgEs no específicas de la zona de detección. Como la primera prueba de diagnóstico rápido desarrollada para este propósito, este trabajo representa un paso hacia la clasificación precisa y oportuna de pacientes alérgicos en entornos hospitalarios. Este trabajo es altamente relevante para el ODS 3 - Salud y Bienestar de la Agenda 2030.

**Palabras claves:** Antibióticos  $\beta$ -lactámicos, Diagnóstico de alergias, Inmunoensayo de flujo lateral, Electroforesis, Nanopartículas de carbono.

## **SUMMARY**

Oral intake of penicillin remains the primary cause of immune reactions to drugs, affecting approximately 10% of the general population with allergies to  $\beta$ -lactam antibiotics. However, accurate evaluation reveals that many individuals are misclassified as allergic, leading to unnecessary prescriptions of alternative antibiotics. De-labelling initiatives include protocols involving both *in vivo* and *in vitro* testing. In this work, we have developed and characterized haptens of penicillin G conjugated to BSA, which have proved to capture effectively human IgEs against penicillin G in ELISA assay, enabling a detection limit of  $0.11 \text{ U mL}^{-1}$  of IgEs, when using an indirect assay format. The same bioreagents have been employed in the development of a gold and carbon nanoparticle paper-based strip that provides a Grade 2 result ( $0.7\text{-}3.5 \text{ U mL}^{-1}$  of specific IgE), which is highly useful for the fast screening and identification of patients allergic to penicillin G at the point of care. Finally, electrophoresis was applied to the paper strip to enhance the assay sensitivity by removing the non-specific h-IgEs from the detection zone. As the first rapid diagnostic test ever developed for this purpose, this approach represents a step towards the precise and timely classification of allergic patients in hospital settings. This work is highly relevant to SDG 3 - Health and Well- of the 2030 Agenda.

**Keywords:**  $\beta$ -lactamic antibiotics, Allergy diagnosis, Lateral flow immunoassay, Electrophoresis, Carbon nanoparticles.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1. ALERGIA A ANTIBIÓTICOS</b> .....	<b>8</b>
<b>1.2. EPIDEMIOLOGÍA</b> .....	<b>9</b>
<b>1.3. ANTIBIÓTICOS B-LACTÁMICOS</b> .....	<b>10</b>
<b>1.4. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE ALERGIA A ANTIBIÓTICOS.</b> .....	<b>11</b>
1.4.1. <i>Métodos in vivo</i> .....	11
1.4.2. <i>Métodos in vitro</i> .....	12
1.4.2.1. Método de referencia Immunocap .....	12
1.4.2.2. Test de Activación de Basófilos (BAT) .....	12
1.4.2.3. Test de Liberación de Histamina (HRT) .....	13
1.4.2.4. Test de Transformación de Linfocitos (LTT) .....	13
1.4.2.5. Inmunoensayo en disco compacto .....	13
<b>1.5. INMUNOENSAYO DE FLUJO LATERAL</b> .....	<b>13</b>
1.5.1. <i>Aplicaciones de LFIA</i> .....	15
1.5.2. <i>Limitaciones de LFIA</i> .....	15
<b>1.6. ELECTROFORESIS COMO ESTRATEGIA PARA LA MEJORA DE LA SENSIBILIDAD EN LFIA</b> .....	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1. REACTIVOS Y MATERIALES</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2. EQUIPOS E INSTRUMENTOS</b> .....	<b>18</b>
<b>3.3. PROCEDIMIENTOS</b> .....	<b>19</b>
3.3.1. <i>Síntesis y caracterización del antígeno BSA-PG</i> .....	19
3.3.2. <i>Caracterización del antígeno BSA-PG mediante ELISA</i> .....	19
3.3.3. <i>Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro (AuNPs)</i> .....	20
3.3.4. <i>Conjugación de AuNPs y CNPs</i> .....	21
3.3.5. <i>Fabricación de las tiras de LFIA</i> .....	21
3.3.6. <i>Ensayo LFIA y evaluación de los resultados</i> .....	22
3.3.7. <i>Diseño y fabricación del dispositivo de electroforesis</i> .....	22
3.3.8. <i>Ensayo de electroforesis en LFIA</i> .....	23
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>24</b>
<b>4.1. CARACTERIZACIÓN DEL ANTÍGENO BSA-PG</b> .....	<b>24</b>
<b>4.2. CARACTERIZACIÓN DEL ANTÍGENO BSA-PG MEDIANTE ELISA</b> .....	<b>26</b>
<b>4.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO (AuNPs)</b> .....	<b>27</b>
<b>4.4. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE LFIA</b> .....	<b>29</b>
<b>4.5. DESARROLLO DE LFIA CON NANOPARTÍCULAS DE CARBONO</b> .....	<b>31</b>
4.5.1. <i>Caracterización de las nanopartículas de carbono</i> .....	31
4.5.2. <i>Desarrollo y optimización de LFIA con CNPs</i> .....	32
<b>4.6. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE LFIA ELECTROFORÉTICO</b> .....	<b>35</b>
<b>5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>37</b>
<b>6. REFERENCIAS</b> .....	<b>38</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1. CASOS DE SOSPECHAS DE REACCIONES ADVERSAS NOTIFICADAS CON MEDICAMENTOS O ACONTECIMIENTOS ADVERSOS OCURRIDOS DESPUÉS DE LA VACUNACIÓN. (A) MEDICAMENTOS EN GENERAL (B) PENICILINA G (FUENTE: AGENCIA ESPAÑOLA DEL MEDICAMENTO Y PRODUCTOS SANITARIOS (AEMPS), MAYO 2024).</b> .....	10
<b>FIGURA 2. INMUNOENSAYO DE FLUJO LATERAL. (A) REPRESENTACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA TIRA (SAMPLE PAD; CONJUGATE PAD; MEMBRANA DE NITROCELULOSA CON TEST LINE Y CONTROL LINE; ABSORBENT PAD. REPRESENTACIÓN DEL PRINCIPIO DEL INMUNOENSAYO EN (B) PRESENCIA DEL ANALITO: EL ANALITO SE UNE A LOS ANTICUERPOS CONJUGADOS Y (C) AUSENCIA DEL ANALITO EN LA MUESTRA: TAN SOLO ES VISIBLE LA CONTROL LINE.</b> .....	14
<b>FIGURA 3. APLICACIÓN DE ELECTROFORESIS EN LFIA. REPRESENTACIÓN DE LAS ETAPAS DE ENSAYO QUE CONSISTEN EN EL ENRIQUECIMIENTO DE LA LÍNEA DE PRUEBA (TL) CON EL ANALITO DIANA, SEGUIDO DE UNA ETAPA DE LAVADO PARA ELIMINAR LOS INTERFERENTES DE LA ZONA DE DETECCIÓN Y FINALIZA CON LA ETAPA DE DETECCIÓN, MEDIANTE LA ADICIÓN DE LA ALMOHADILLA DE CONJUGADO.</b> .....	16
<b>FIGURA 4. (A) REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO MEDIANTE LA REDUCCIÓN DEL ÁCIDO TETRACLOROAUÚRICO (HAUCL<sub>4</sub>) CON EL AGENTE REDUCTOR Y ESTABILIZANTE, CITRATO SÓDICO. (B) PROCESO EXPERIMENTAL DE SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO EN UN MATRAZ DE REACCIÓN. DE IZQUIERDA A DERECHA, SE OBSERVA EL CAMBIO DE COLOR EN LA DISOLUCIÓN: INICIALMENTE INCOLORA, PASANDO A UN COLOR GRIS OSCURO TRAS LA ADICIÓN DE CITRATO SÓDICO, INDICANDO LA FORMACIÓN INICIAL DE NANOPARTÍCULAS Y SU NUCLEACIÓN, Y FINALMENTE ADQUIRIENDO UN COLOR ROJO RUBÍ, CARACTERÍSTICO DE LA FORMACIÓN COMPLETA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO 20 NM ESTABLES.</b> .....	20
<b>FIGURA 5. IMPRESIÓN DE TIRAS REACTIVAS. (A) DISPENSADOR DE BIORREACTIVOS LÍQUIDOS BIODOT. (B) REACTIVOS DEPOSITADOS EN LA PLACA DE IMPRESIÓN.</b> .....	21
<b>FIGURA 6. FABRICACIÓN DE LAS TIRAS REACTIVAS EMPLEADAS EN LFIA. (A) MEMBRANA DE CELULOSA EMPLEADA COMO ALMOHADILLAS DE MUESTREO (PARTE LISA EN CONTACTO CON EL ADHESIVO) Y ABSORCIÓN (PARTE RUGOSA EN CONTACTO CON EL ADHESIVO). (B) MEMBRANA DE NITROCELULOSA SOBRE UNA LÁMINA ADHESIVA DE CARTÓN. (C) MEMBRANAS DE FIBRA DE VIDRIO: I) CONJUGADO A PARTIR DE CNPs, II) CONJUGADO A PARTIR DE NANOPARTÍCULA DE ORO (AuNPs), III) ASPECTO DE UNA FIBRA DE VIDRIO SIN CONJUGADO.</b> .....	22
<b>FIGURA 7. DISPOSITIVO DE ELECTROFORESIS EMPLEADO EN LOS INMUNOENSAYOS. (A) COMPONENTES DE LA FUENTE DE ALIMENTACIÓN. (B) MONTAJE DEL ENSAYO QUE COMPRENDE UNA PLACA CON 6 POCILLOS QUE CONTIENE ELECTRODOS INTEGRADOS QUE ESTÁN CONECTADOS A UNA FUENTE DE ALIMENTACIÓN PORTÁTIL.</b> .....	23
<b>FIGURA 8. FOTOGRAFÍA TOMADA DURANTE LA ÚLTIMA ETAPA DEL ENSAYO DE ELECTROFORESIS EN LFIA, DONDE LA DISOLUCIÓN DE CONJUGADO HA FLUIDO POR LA TIRA EN SENTIDO ÁNODO (ELECTRODO ROJO) A CÁTODO (ELECTRODO NEGRO) POR ELECTRO-OSMOSIS Y HA REACCIONADO CON LA LÍNEA CONTROL, GENERANDO UNA SEÑAL ANALÍTICA VISIBLE AL OJO HUMANO. EL EXCESO DE CONJUGADO SE ESTÁ SEPARANDO DE LA LÍNEA DE CONTROL.</b> .....	23
<b>FIGURA 9. CARACTERIZACIÓN DE LOS CONJUGADOS DE BSA-PG. (A) RECTA DE CALIBRADO REPRESENTANDO LA ABSORBANCIA A 320 NM FRENTE A LA CONCENTRACIÓN DE PENICILINA G EN MG ML<sup>-1</sup>. (B) ESPECTROS DE ABSORBANCIA DE LOS CONJUGADOS DE BSA-PG RETENIDOS EN LOS FILTROS DE EXCLUSIÓN MOLECULAR Y ELUÍDOS DURANTE EL PROCESO DE PURIFICACIÓN DE LOS CONJUGADOS.</b> .....	25
<b>FIGURA 10. CARACTERIZACIÓN DE LOS CONJUGADOS DE BSA-PG. (A) RECTA DE CALIBRADO REPRESENTANDO LA ABSORBANCIA A 595 NM FRENTE A LA CONCENTRACIÓN DE BSA EN MG ML<sup>-1</sup> (N=3). RECUADRO CON LA FOTO DE LOS POCILLOS DESPUÉS DE REALIZAR EL ENSAYO DE LA RECTA DE CALIBRADO.</b> .....	25
<b>FIGURA 11. CURVA DE CALIBRADO EN ELISA PARA LA DETECCIÓN DE H-IGÉ ESPECÍFICAS DE PG EN SUERO HUMANO DE PACIENTE DIAGNOSTICADO COMO ALÉRGICO. COMPARATIVA DE LAS CONDICIONES DE ENSAYO TAPIZANDO LA PLACA CON 13 (CURVA NEGRA) Y 6.5 µG ML<sup>-1</sup> DEL ANTÍGENO BSA-PG (CURVA ROJA) (N=3).</b> .....	26
<b>FIGURA 12. CURVA DE CALIBRADO EN ELISA PARA LA DETECCIÓN DE H-IGÉ ESPECÍFICAS DE PENICILINA G (PG) EN SUERO HUMANO DE UN PACIENTE DIAGNOSTICADO COMO ALÉRGICO A PG (NEGRO) Y EN UN SUERO HUMANO DE UN PACIENTE DIAGNOSTICADO COMO NO ALÉRGICO A PG (ROJO) (N=3).</b> .....	27
<b>FIGURA 13 CARACTERIZACIÓN DE LAS AuNPs MEDIANTE TEM. (A) IMAGEN DE LAS AuNPs TOMADA CON EL TEM (ESCALA 200 NM). (B) HISTOGRAMA DEL DIÁMETRO DE LAS AuNPs (N=100).</b> .....	28
<b>FIGURA 14. ESTUDIO DE LAS NANOPARTÍCULAS CONJUGADAS Y SIN CONJUGAR. (A) ESPECTROS DE ABSORBANCIA UV-VIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO (AuNPs) NO CONJUGADAS (LÍNEA ROJA CONTINUA) (PICO A 520 NM) Y NANOPARTÍCULAS DE ORO CONJUGADAS (LÍNEA ROJA DISCONTINUA). LOS ESPECTROS EXHIBEN UN DESPLAZAMIENTO EN EL PICO LSPR. (B) DISTRIBUCIÓN DEL POTENCIAL ZETA (MV) DE AuNPs SIN CONJUGAR Y CONJUGADAS.</b> .....	28
<b>FIGURA 15. (A) IMAGEN DE LAS TIRAS DE LFIA PREPARADAS 30 MG ML<sup>-1</sup> DE BSA-PG EN LA TL DESPUÉS DE ANALIZAR (i) 0 Y (ii) 12,5 U ML<sup>-1</sup> DE ARTHUS, Y PREPARADAS CON 50 MG ML<sup>-1</sup> DE BSA-PG EN LA TL DESPUÉS DE ANALIZAR (iii) 0 Y (iv) 12,5 U</b>	

<i>ML<sup>-1</sup> DE ARTHUS. (B) COMPARATIVA DE LAS SEÑALES NORMALIZADAS DESPUÉS DE ANALIZAR 0 Y 12,5 U ML<sup>-1</sup> DE ARTHUS CON LAS TIRAS FUNCIONALIZADAS CON 30 Y 50 ML<sup>-1</sup> DE BSA-PG EN LA TL.</i> .....	30
<b>FIGURA 16 ENSAYO DE LATERAL FLOW (LFIA).</b> (A) IMAGEN DE LAS TIRAS REACTIVAS DESPUÉS DE REALIZAR EL ENSAYO PARA LA DETECCIÓN DE (IZQUIERDA A DERECHA: 0, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5 Y 25 U ML <sup>-1</sup> ) DE ARTHUS. (B) CURVA DE CALIBRADO REPRESENTANDO LA INTENSIDAD DE SEÑAL DE LA TL DE LAS TIRAS FRENTE A LA CONCENTRACIÓN DE ARTHUS (N=3). .....	31
<b>FIGURA 17. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE CARBONO (CNPs) MEDIANTE MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA (TEM).</b> (A) IMAGEN DE LAS CNPs TOMADA CON EL TEM (ESCALA 200 NM). (B) HISTOGRAMA DEL DIÁMETRO DE LAS CNPs (N=100).....	32
<b>FIGURA 18. ESTUDIO DE LAS NANOPARTÍCULAS CONJUGADAS Y SIN CONJUGAR.</b> (A) ESPECTROS DE ABSORBANCIA UV-VIS DE NANOPARTÍCULAS DE CARBONO NO CONJUGADAS (LÍNEA NEGRA) (PICO A 250 NM) Y NANOPARTÍCULAS DE CARBONO CONJUGADAS (LÍNEA NEGRA DISCONTINUA) (PICO 280 NM). LOS ESPECTROS EXHIBEN UN DESPLAZAMIENTO EN EL PICO MÁXIMO DE ABSORCIÓN. (B) DISTRIBUCIÓN DEL POTENCIAL ZETA (MV) DE CNPs SIN CONJUGAR Y CONJUGADAS.....	32
<b>FIGURA 19. IMAGEN DE TIRAS REACTIVAS CON NANOPARTÍCULAS DE CARBONO (CNPs)</b> (A) ENSAYO CON IGG (B) ENSAYO CON IGE OBTENIDAS DEL SUERO DE UN PACIENTE DIAGNOSTICADO COMO ALÉRGICO A PG MEDIANTE EL MÉTODO IMMUNOCAP. ....	33
<b>FIGURA 20. CURVA DE CALIBRADO CON LATERAL FLOW IMMUNOASSAY (LFIA) BASADO EN NANOPARTÍCULAS DE CARBONO (CNPs) PARA LA DETECCIÓN DE 0.69, 1.10, 1.75, 2.73, 4.32, 6.72, 10.56 Y 16.8 NG ML<sup>-1</sup> DE IGEs HUMANA ESPECÍFICAS DE PG RECUPERADAS DEL SUERO DE UN PACIENTE DIAGNOSTICADO COMO ALÉRGICO A PG CON IMMUNOCAP.</b> .....	34
<b>FIGURA 21. DIFERENTES FORMATOS DE ENSAYO LATERAL FLOW (LFIA) CON NANOPARTÍCULAS DE CARBONO (CNP).</b> (A) ENSAYO SIN CONJUGATED PAD EN EL MISMO POCILLO: MUESTRA, LAVADO CON BORATO 5 mM, Y CNP CON ANTICUERPO ANTI-IGE. (B) ENSAYO LFIA CONVENCIONAL CON ABSORPTION PAD MÁS LARGA PARA MEJORAR LA FLUÍDICA. (C) ENSAYO EN POCILLOS SEPARADOS: ADICIÓN SECUENCIAL DE MUESTRA, LAVADO, Y CNP FUNCIONALIZADAS PARA MEJORAR EL CONTROL Y MINIMIZAR INTERFERENCIAS.....	35
<b>FIGURA 22. ENSAYO DE LFIA ACOPLADO A ELECTROFORESIS PROBANDO DISTINTAS CONCENTRACIONES DE TWEEN-20:</b> (A) 0,01%; (B) 0,5%; (C) 0,1%; (D) 1%; (F) 0,7%.....	36
<b>FIGURA 23. ENSAYO DE LFIA ACOPLADO A ELECTROFORESIS PROBANDO DISTINTOS VOLTAJES (V):</b> (A) 100 V; (B) 150 V; (C) 200 V. ....	36

## **ÍNDICE DE TABLAS**

<b>TABLA 1. RESUMEN DE HIPERSENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS (MACIEJ SERDA ET AL., 2013; MAKER ET AL., 2019) .....</b>	<b>8</b>
<b>TABLA 2. CLASIFICACIÓN DE TEST RADIOALERGOSORBENTE (RAST) DE ACUERDO CON EL NIVEL DE IGE ESPECÍFICA. FUENTE: WEB PARA PACIENTES ALÉRGICOS DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA, ALERGOLOGÍA Y ASMA PEDIÁTRICA (SEICAP).....</b>	<b>11</b>
<b>TABLA 3. PARÁMETROS ANALÍTICOS DE LA CURVA DE CALIBRADO ELISA TAPIZANDO EL ANTÍGENO BSA-PG A 13 Y 6.5 <math>\mu\text{G mL}^{-1}</math>. LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD), LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ), PENDIENTE (HILLSLOPE), RANGO DINÁMICO DE TRABAJO (DLR) Y COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (<math>R^2</math>).....</b>	<b>26</b>
<b>TABLA 4. PARÁMETROS ANALÍTICOS DE LA CURVA DE CALIBRADO LFIA. LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD), LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ), PENDIENTE (HILLSLOPE), RANGO DINÁMICO DE TRABAJO (DLR) Y COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (<math>R^2</math>). .....</b>	<b>30</b>
<b>TABLA 5. PARÁMETROS ANALÍTICOS DE LA CURVA DE CALIBRADO LFIA CON CNPs. LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD), LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ), PENDIENTE (HILLSLOPE), RANGO DINÁMICO DE TRABAJO (DLR) Y COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (<math>R^2</math>). .....</b>	<b>34</b>
<b>TABLA 6. RESUMEN Y COMPARACIÓN DE LOS DISTINTOS ENSAYOS INMUNOLÓGICOS (JOSÉ &amp; RODRÍGUEZ, 2022) .....</b>	<b>37</b>

## **GLOSARIO**

**Ac:** Anticuerpos  
**AEMPS:** Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios  
**Ag:** Antígenos  
**AINE:** Antiinflamatorios no esteroideos  
**AuNP:** Nanopartículas de Oro  
**BAT:** Test de Activación de Basófilos  
**BSA:** Albúmina Sérica Bovina  
**BSA-PG:** Albúmina Sérica Bovina conjugada con Penicilina G  
**CL:** Línea de Control (Control Line)  
**CNP:** Nanopartículas de Carbono  
**ACNPs:** Nanopartículas de Carbono Amorfo  
**DHR:** Reacción de hipersensibilidad  
**DLR:** Rango Dinámico Lineal  
**ELISA:** Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas  
**GC:** Cromatografía de Gases  
**H-IgE:** IgE humana  
**HLA:** Antígeno leucocitario humano (Human Leukocyte Antigen)  
**HPLC:** Cromatografía Líquida de Alta Resolución  
**HRT:** Test de Liberación de Histamina  
**HSR:** Reacciones de hipersensibilidad  
**ICON:** Consenso Internacional sobre Alergia a Medicamentos  
**IgE:** Inmunoglobulina E  
**IgG:** Inmunoglobulina G  
**IgM:** Inmunoglobulina M  
**ISAC:** InmunoCAP Multiplex (Immuno Solid-phase Allergen Chip)  
**LFIA:** Lateral flow immunoassay (Ensayo Inmuncromatográfico de Flujo Lateral)  
**LOD:** Límite de detección  
**LOQ:** Límite de cuantificación  
**LTT:** Test de Transformación de Linfocitos  
**OMS:** Organización Mundial de la Salud  
**POC:** Punto de Atención  
**qPCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real  
**RAM:** Reacción adversa a un medicamento  
**RBC:** Glóbulos rojos (Red Blood Cells)  
**RAST:** Radioalergosorbent test (Test Radioalergosorbente)  
**RIA:** Radioinmunoensayo  
**SEICAP:** Sociedad Española de Inmunología Clínica Alergología y Asma Pediátrica  
**sIgE:** IgE específica en suero  
**SMX/TMP:** Sulfametoxazol/Trimetoprim  
**TEN:** Necrólisis epidérmica tóxica  
**Th:** Linfocitos T helper  
**TL:** Línea de Prueba (Test Line)  
**WBC:** Glóbulos blancos (White Blood Cells)

## **RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030.**

Este trabajo fin de Grado aborda directamente una necesidad crítica en la atención médica al proporcionar una herramienta rápida y precisa para el diagnóstico de alergias a la penicilina G. Al hacerlo, mejora la calidad de la atención médica y se alinea con un alto grado de relación con los objetivos de salud y bienestar del ODS 3, promoviendo prácticas clínicas seguras y efectivas, y ayudando a mitigar el problema de las resistencias antibióticas ([ver Anejo I](#)).



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Alergia a Antibióticos

Un antibiótico se define como una sustancia química producida por microorganismos, como hongos o bacterias, que inhibe o mata el crecimiento de otros microorganismos, especialmente bacterias (Clardy et al., 2009). Los antibióticos representan uno de los mayores avances en la historia de la medicina moderna. Desde su descubrimiento a principios del siglo XX hasta los antibióticos de última generación, estos fármacos han revolucionado la medicina moderna al proporcionar tratamientos efectivos para una amplia gama de enfermedades infecciosas (Aminov, 2010).

A pesar del impacto positivo que han tenido los antibióticos en la sociedad, estos pueden tener una reacción de hipersensibilidad (DHR) sobre algunos pacientes. Aquellos pacientes con reacciones adversas a medicamentos deben de ser identificados y tratados rápidamente para evitar complicaciones graves. Comprender los mecanismos inmunológicos detrás de estas reacciones ayuda a distinguir entre alergias reales de diagnósticos incorrectos (Maker et al., 2019).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define reacción adversa a un medicamento (RAM) como cualquier respuesta nociva no intencionada a dosis normalmente utilizadas en el ser humano para profilaxis, diagnóstico o tratamiento de enfermedades, o para modificar funciones fisiológicas. (World Health Organization. Quality Assurance, 2002). Según el Consenso Internacional sobre Alergia a Medicamentos (ICON), las RAMs se clasifican en inmediatas o tardías según el momento de aparición. Las reacciones inmediatas, mediadas por IgE, se presentan en la primera hora tras la administración del fármaco, mientras que las reacciones tardías, un grupo heterogéneo de respuestas inmunitarias, suelen manifestarse días o semanas después (Maker et al., 2019). Las RAMs se distinguen de otras reacciones adversas por estar mediadas por mecanismos inmunológicos. La clasificación de estas reacciones se basa en el esquema de Gell y Coombs, que distingue cuatro tipos de hipersensibilidad (Broyles et al., 2020; Maker et al., 2019) (**Tabla 1**):

**Tabla 1. Resumen de hipersensibilidad a antibióticos** (Maciej Serda et al., 2013; Maker et al., 2019)

<i>Tipo</i>	<i>I (Inmediata)</i>	<i>II (Mediada por Ac)</i>	<i>III (Complejos Inmunes)</i>	<i>IV (Mediada por Células)</i>
<b>Mediador</b>	IgE	IgM + IgG	IgG	Células Th
<b>Objetivo</b>	Alérgenos	Células Modificadas	Complejos Inmunes	Alérgenos
<b>Patogénesis</b>	IgE en mastocitos, desgranulación	Ac en células (WBC, RBC, plaquetas)	Complejos inmunes activan complemento	Activación de células T
<b>Tiempo Máximo</b>	<1 hora	7-14 días	7-14 días	24-72 horas
<b>Etiología</b>	Genética, contaminantes, virus	Asociado a HLA, exposición a tejidos	Infecciones leves, antígenos inhalados, autoinmunes	Exposición a alérgenos
<b>Reacción Clínica</b>	Anafilaxia, urticaria, angioedema, dificultad respiratoria, ansiedad, dolor torácico, síncope	Anemia hemolítica, trombocitopenia, neutropenia	Enfermedad del suero, vasculitis	Dermatitis de contacto, SJS, TEN
<b>Antibióticos Asociados</b>	Cefalosporinas, fluoroquinolonas, penicilinas, SMX/TMP	Cefalosporinas, penicilinas, SMX/TMP	Cefalosporinas (cefaclor), ciprofloxacino, penicilinas, SMX/TMP	Penicilinas, cefalosporinas, dapsona, minociclina, SMX/TMP, vancomicina

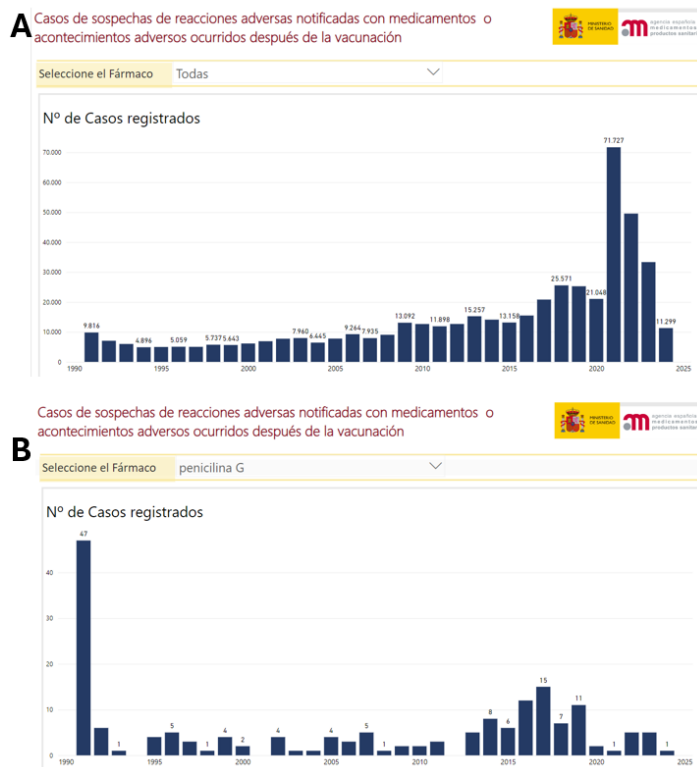
**Notas:** IgE: Inmunoglobulina E; IgM: Inmunoglobulina M; IgG: Inmunoglobulina G; Th: Linfocitos T helper; Ac: Anticuerpos; WBC: Glóbulos blancos (White Blood Cells); RBC: Glóbulos rojos (Red Blood Cells); HLA: Antígeno leucocitario humano (Human Leukocyte Antigen); Ag: Antígenos; SJS: Síndrome de Stevens-Johnson; TEN: Necrólisis epidérmica tóxica; SMX/TMP: Sulfametoxazol/Trimetoprim.

Las manifestaciones clínicas de hipersensibilidad varían según el tipo. En casos de hipersensibilidad no mediada por IgE, el paciente puede presentar signos cutáneos, respiratorios y cardiovasculares, incluyendo hipotensión. Por otro lado, las reacciones de hipersensibilidad mediada por anticuerpos, que comprenden los tipos I, II y III previamente mencionados, pueden manifestarse como prurito, rinitis, sibilancias, urticaria, angioedema, anafilaxia, anemia hemolítica y fiebre. El tratamiento de las hipersensibilidades mediadas por IgE sigue un protocolo de desensibilización para los fármacos implicados, y se recomienda evitar fármacos de la misma clase o con estructuras moleculares similares para prevenir reacciones cruzadas (Blumenthal et al., 2019).

## **1.2. Epidemiología**

La epidemiología de las RAMs es un aspecto insuficientemente caracterizado, al igual que el diagnóstico basado en el historial clínico, pues puede resultar en una sobreestimación de la incidencia real. No obstante, se puede extraer ciertos datos epidemiológicos. La mayoría de las investigaciones epidemiológicas se enfocan en la frecuencia de eventos adversos relacionados con los medicamentos en poblaciones hospitalizadas en Europa. Se calcula que un 10,1% de los pacientes ingresados en hospitales experimentan RAMs, y que un 3,5% de las hospitalizaciones están vinculadas con dichas reacciones. En niños, la frecuencia va desde el 0,6 hasta el 16,8%, siendo el motivo del 2,9% de las hospitalizaciones pediátricas (Bouvy et al., 2015). Las mujeres muestran una mayor susceptibilidad a las reacciones de hipersensibilidad en comparación con los hombres en la población adulta, y se observa una incidencia más elevada en la población de mayor edad que en individuos jóvenes. Se ha establecido una asociación entre factores genéticos, como ciertos alelos HLA específicos, y un aumento del riesgo de desarrollar reacciones de hipersensibilidad a medicamentos (Gomes & Kuyucu, 2017; Han et al., 2018).

En España, se ha demostrado que la incidencia de RAMs es del 10,9% en niños hospitalizados, mientras que es del 1,5% en niños ambulatorios (Thong & Tan, 2011). Estas altas tasas ponen de relieve que las alergias a medicamentos son un problema de salud importante que no debe subestimarse. Los medicamentos que con mayor frecuencia provocan RAM en España incluyen los antibióticos, antiinflamatorios no esteroideos (AINE), anticoagulantes y medicamentos cardiovasculares. Las reacciones más comunes incluyen reacciones cutáneas, trastornos gastrointestinales, problemas hematológicos y reacciones alérgicas (Esteban Jiménez et al., 2017). A continuación, se ilustra la tendencia de las notificaciones de sospechas de reacciones adversas, con un pico significativo en el año 2020, incluida la Penicilina G a lo largo de los años (**Figura 1**)



**Figura 1. Casos de sospechas de reacciones adversas notificadas con medicamentos o acontecimientos adversos ocurridos después de la vacunación.** (A) Medicamentos en general (B) Penicilina G (Fuente: Agencia Española del medicamento y productos sanitarios (AEMPS), mayo 2024).

Un informe reciente de Estados Unidos basado en un extenso conjunto de datos de pacientes reveló que el 35,5% de los pacientes tenían antecedentes de alergia a medicamentos en sus historias clínicas, siendo las penicilinas (12,8%), los antibióticos sulfonamida (7,4%), los opiáceos (6,8%) y los AINE (3,5%) los medicamentos más comúnmente mencionados (Zhou et al., 2016). Se han descubierto números elevados similares en los países europeos también (González-Gregori et al., 2012). Los estudios han identificado a los antibióticos, en particular los  $\beta$ -lactámicos, como las principales instigadoras de reacciones de hipersensibilidad (HSR) (Blumenthal et al., 2019). Representan hasta un 18% de los pacientes con reacciones confirmadas a medicamentos, seguidos por las quinolonas (7%), macrólidos (2%), metronidazol (1,8%) y otros antibióticos, como la clindamicina y las sulfonamidas, que representan menos del 1%. La prevalencia ha variado a lo largo de los años debido a cambios en los patrones de prescripción y consumo, lo que ha resultado en modificaciones en los patrones de sensibilización, como en el caso de los determinantes alérgicos de los  $\beta$ -lactámicos (Doña et al., 2022).

### 1.3. Antibióticos $\beta$ -lactámicos

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se consideran una terapia de primera línea para la mayoría de las infecciones bacterianas. Este grupo de antibióticos, que incluyen penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos, se caracterizan por su estructura química que contiene un anillo  $\beta$ -lactámico unido a un segundo anillo que varía según el grupo. Además, las cadenas laterales tienen un papel fundamental en la estructura unidas a un grupo amino ubicado en la posición 6 del anillo  $\beta$ -lactámico (R1) de las penicilinas o al segundo anillo para las cefalosporinas y carbapenemas (R2 o R3) (Bush & Bradford, 2016). Entre 2000 y 2015, el uso de este producto aumentó un 65% en naciones en desarrollo, según Chiriac et al. (2019) y se proyecta que podría incrementarse en un 202% para el año 2030 si el consumo sigue al mismo ritmo.

Su principal peligro está asociado con una reacción alérgica en algunos pacientes que responden a los grupos radicales de estos antibióticos; principalmente, estas reacciones son más frecuentes con penicilinas y cefalosporinas (Bush & Bradford, 2016). Por tanto, es imperativo identificar a los pacientes verdaderamente alérgicos a los antibióticos beta lactámicos, ya que menos del 10% de los pacientes con sospecha de alergia son efectivamente alérgicos. El Test Radioalergosorbente (RAST) es esencial para detectar anticuerpos IgE en pacientes alérgicos a fármacos. Los resultados se clasifican según la concentración de IgE en la **Tabla 2** permitiendo interpretar los niveles y evaluar la gravedad de la alergia. Esta estratificación es crucial para determinar la sensibilidad a los antibióticos y la severidad de la alergia de manera precisa.

**Tabla 2. Clasificación de Test Radioalergosorbente (RAST) de acuerdo con el nivel de IgE específica.** Fuente: Web para pacientes alérgicos de la Sociedad Española de Inmunología Clínica, Alergología y Asma Pediátrica (SEICAP).

Clase	UI/mL o kUI/L	Nivel de IgE específica	Resultado
0	< 0,35	Normal	Negativo
1	0,35 – 0,70	Bajo	Positivo
2	0,70 – 3,5	Intermedio	Positivo
3	3,5 – 17,5	Alto	Positivo
4	17,5 – 50	Muy alto	Positivo
5	50 – 100	Ultra alto	Positivo
6	> 100	Extremadamente alto	Positivo

#### 1.4. Métodos de Diagnóstico de Alergia a Antibióticos.

La identificación y el abordaje de las alergias a los antibióticos representan un desafío en la práctica clínica contemporánea. La evaluación de una supuesta alergia a medicamentos requiere el uso adecuado de herramientas diagnósticas disponibles, tales como la elaboración de un historial clínico minucioso, examen físico, pruebas cutáneas y la ejecución de pruebas clínicas con el fármaco sospechoso. El proceso diagnóstico es complejo y a menudo se sobreestima; un diagnóstico incorrecto puede llevar al uso innecesario de antibióticos de amplio espectro, representando una amenaza para la seguridad del paciente y la salud pública, incluso mayor coste en atención médica, ingresos en cuidados intensivos, estadías hospitalarias más prolongadas, muertes o incluso mayor riesgo a generar organismos resistentes a múltiples medicamentos (Chan et al., 2020; Blumenthal et al., 2019). Los métodos para el diagnóstico de alergia a antibióticos se clasifican en métodos *in vivo* o *in vitro*.

##### 1.4.1. Métodos *in vivo*

Los métodos *in vivo* comprenden la prueba cutánea, la prueba intradérmica y la prueba del parche. La evaluación de los resultados se lleva a cabo mediante la medición del diámetro de la roncha y/o eritema en el sitio de aplicación, utilizando controles negativos o positivos como referencia. La sensibilidad de estas pruebas varía según el fármaco, su concentración y el tipo de reacción manifestada (Del Pozzo-Magaña & Liy-Wong, 2022).

Los inconvenientes de las pruebas *in vivo* es su baja sensibilidad, requieren altas concentraciones pudiendo producir reacciones falsas positivas (Doña et al., 2017).

### **1.4.2. Métodos *in vitro***

Aunque son menos sensibles, las pruebas *in vitro* son un complemento valioso para las pruebas *in vivo*. Se recomienda priorizar su implementación en pacientes de alto riesgo, ya que es la única opción viable disponible. La selección de estas pruebas depende del tipo de reacción y cambia según el antibiótico examinado. La presencia de IgE específica se utiliza como biomarcador de alergia a antibióticos. Las IgE específicas se encuentran en el suero en concentraciones inferiores a las IgE totales, punto a tener en cuenta para las pruebas *in vitro*. Como se ha visto anteriormente en la **Tabla 2**, también hay que considerar el límite entre un resultado negativo o positivo, que es igual a 0,35 (UI/mL o Ku/L), siendo 1 UI equivalente a 2,4 ng de IgE aproximadamente.

El diagnóstico *in vitro* es capaz de determinar la presencia de alergias en humanos a través de la medición de la cantidad de IgE específica en la sangre. En el mercado existen diferentes pruebas analíticas como ImmunoCAP (Thermo Fisher Scientific), Immulite (Siemens), Euroline (Euroimmun), Noveos (Hycor), ALEX2 (Macro Array Diagnostics) y ALFA (Dr. Fooke), que comparten el mismo principio, aunque varían en aspectos como son la automatización, alérgenos utilizados, detección de la señal, cantidad de la muestra y tipo de análisis. No obstante, presentan ciertas limitaciones para identificar alergias a la penicilina debido a la escasa selectividad de antígenos, calibración, detección y sensibilidad analítica (Quintero-Campos et al., 2022).

#### **1.4.2.1. Método de referencia Immuncap**

La cuantificación de la IgE específica del fármaco en suero (sIgE) se basa en la detección de un complejo fármaco-hapteno-portador-anticuerpo. La modalidad comercialmente más extendida es el ImmunoCAP (Thermo Fisher Scientific/Phadia, Uppsala, Suecia), la cual puede analizar alergias de manera individual (singleplex, ImmunoCAP) o múltiple (multiplex, ImmunoCAP-ISAC)(van Hage et al., 2017). Los análisis de ImmunoCAP, ya sea individuales o combinados en multiplex con ISAC, posibilitan medir cantidades concretas de anticuerpos IgE frente a alérgenos sin ser afectados por la presencia de IgG. A pesar de que, el ImmunoCAP sea capaz de cuantificar anticuerpos IgE específicos en kilounidades por litro (kUA/L) y sea un método excelente en cuanto a precisión y reproducibilidad, presenta restricciones en la formulación de extractos alérgicos, generando resultados positivos no relevantes. Por su parte, ImmunoCAP-ISAC se erige como la plataforma más integral disponible en la actualidad. El principio subyacente de este ensayo guarda similitud con el singleplex y, además, las moléculas alérgicas se detectan en pequeñas cantidades agrupadas en tripletes. Se requiere una exigua cantidad de suero, proporciona un perfil detallado de IgE con cantidades mínimas de suero, aunque tiene mediciones semicuantitativas, un rango lineal inferior y un precio por prueba más alto (van Hage et al., 2017).

En referente a los antibióticos beta-lactámicos, se han descrito falsos diagnósticos de alergia con ImmunoCAP en casos en los que el hapteno es penicilina V. Ante estas complicaciones donde la disponibilidad de ImmunoCAP es limitada a unos pocos beta-lactámicos ha desembocado en el uso otros inmunoensayos como Sepharose-RIA y RAST. Este último muestra una sensibilidad mayor que el ImmunoCAP, aunque sigue siendo subóptima. A pesar de que se utilizan reactivos isotópicos, los resultados de RAST en cuanto a sensibilidad oscilan entre 42,9% y 75% y una especificidad del 67,7% al 83,3% tanto para las penicilinas como para las cefalosporinas (Doña et al., 2017).

#### **1.4.2.2. Test de Activación de Basófilos (BAT)**

El Test de Activación de Basófilos (BAT) se basa en la determinación de la activación de basófilos utilizando citometría de flujo. Existen pruebas comerciales disponibles; sin embargo, no hay protocolos estandarizados en cuanto a marcadores, procedimientos y concentraciones de medicamentos, lo que lleva al uso de protocolos internos en la mayoría de los casos (Doña et al., 2017).

#### **1.4.2.3. Test de Liberación de Histamina (HRT)**

El Test de Liberación de Histamina (HRT) se basa en la detección de la liberación de histamina por basófilos humanos después de la incubación de sangre con el antibiótico. El procedimiento optimizado consiste en la incubación de sangre heparinizada en placas de microfibras de vidrio y estimulación con el antibiótico de interés, seguida de la detección de la liberación de histamina por basófilos utilizando técnicas fluorométricas (Doña et al., 2017).

#### **1.4.2.4. Test de Transformación de Linfocitos (LTT)**

El Test de Transformación de Linfocitos (LTT) se basa en la proliferación de células T específicas del medicamento de pacientes con IR no inmediatas (NIR) al ser estimuladas con el medicamento sospechoso y/o otros medicamentos relacionados. LTT ha demostrado ser más sensible que las pruebas cutáneas para el diagnóstico de NIR, con una sensibilidad y especificidad que dependen de las manifestaciones clínicas de la reacción (Doña et al., 2017).

#### **1.4.2.5. Inmunoensayo en disco compacto**

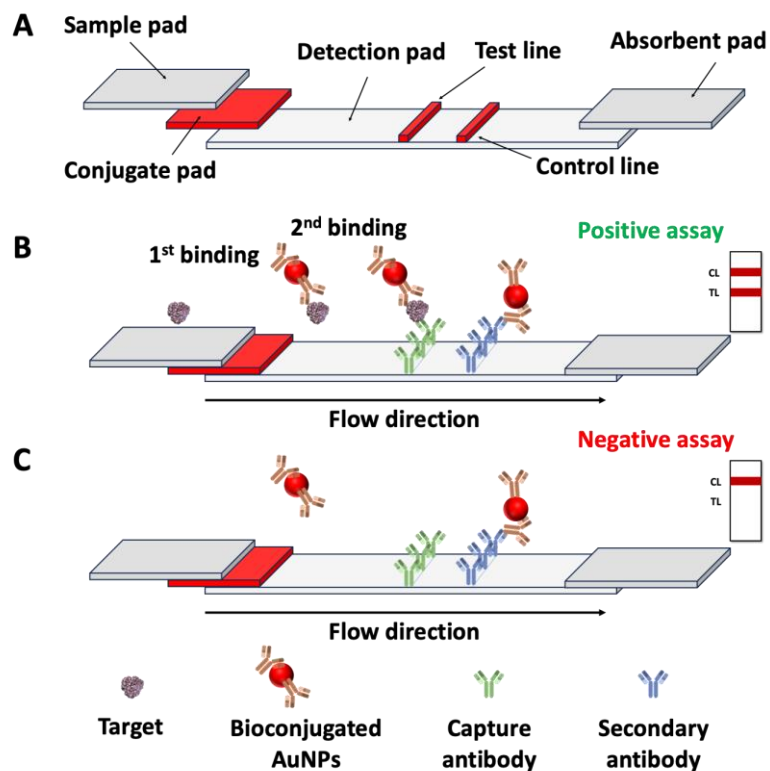
El grupo de investigación Señal y medida en química (SYM), donde he realizado el TFG, ha desarrollado un método basado en disco compacto para el diagnóstico *in vitro* de reacciones alérgicas. Este método utiliza la tecnología de microarray en un soporte de disco DVD para detectar y cuantificar niveles de IgE específica a antibióticos beta-lactámicos en muestras de suero humano (Juárez Rodríguez, 2022). Aunque este método presenta algunas ventajas, como la capacidad de analizar varios alérgenos simultáneamente y la posibilidad de incluir controles positivos, también tiene algunas limitaciones importantes. No permite un diagnóstico lo suficientemente sensible e instantáneo en el lugar y momento de toma de muestra, lo que retrasa la toma de decisión por parte del médico sobre qué antibiótico administrar. Además, el método es lento y costoso, siendo un obstáculo para su implementación en entornos de atención primaria. Por lo tanto, se requiere el desarrollo de nuevos métodos analíticos que permitan un diagnóstico rápido, sensible y económico de alergia a antibióticos beta-lactámicos directamente en el lugar de atención al paciente.

### **1.5. Inmunoensayo de Flujo Lateral**

Los métodos convencionales analíticos de laboratorio, así como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases (GC), el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), habitualmente requieren de procedimientos complejos y de larga duración para obtener un resultado. No obstante, en la era contemporánea, se demanda una detección del analito rápida e *in situ*. Como consecuencia, la investigación científica se ha centrado progresivamente en el desarrollo y optimización de métodos analíticos expeditos, portátiles, asequibles y de fácil implementación para pruebas en el punto de atención (Point of care, POC) (Choi et al., 2019; Parolo & Merkoçi, 2012).

El ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral (LFIA) es un método analítico popular, sencillo de ejecutar y de bajo costo, utilizado para el cribado, diagnóstico y monitoreo de diversas enfermedades. La aplicabilidad de este tipo de pruebas es considerablemente alta, pudiendo ser empleadas tanto por el personal sanitario como por los propios pacientes en sus domicilios. Este método proporciona información sobre la presencia/ausencia o la cantidad de un analito objetivo en cuestión de minutos desde el inicio del ensayo. Aunque inicialmente estos dispositivos de POC fueron desarrollados para el diagnóstico de la diabetes y la detección de la hormona del embarazo, en la actualidad pueden detectar con precisión una serie de antígenos como: hormonas, vitaminas, enzimas, virus, microorganismos, biomarcadores de enfermedades cardiovasculares, biomarcadores de cáncer, entre otros (Andryukov, 2020).

El principio de este método analítico se presenta como una tira multicapa (**Figura 2A**). Se compone de un soporte de plástico, sobre el cual se adhiere una fina capa de membrana porosa de nitrocelulosa. Además, este soporte actúa como base para unir los diversos componentes del experimento y otorga firmeza física al aparato. En los extremos, se fijan dos almohadillas de celulosa o fibra de vidrio: la almohadilla de muestra (sample pad) y la almohadilla absorbente (absorbent pad). La almohadilla de muestra absorbe la muestra líquida de manera gradual y progresiva y realiza un pretratamiento físico, minimizando los efectos de la matriz. La almohadilla absorbente actúa como fuerza motriz del flujo capilar y como receptáculo para el líquido que fluye a través de la tira. Entre la almohadilla de muestra y el inicio de la membrana de nitrocelulosa se coloca una almohadilla adicional, generalmente, de fibra de vidrio, denominada almohadilla conjugada (conjugated pad)(Bahadır & Sezgintürk, 2016). Dicha almohadilla contiene en estado deshidratado las nanopartículas conjugadas al anticuerpo detector, que actúan como sistema de transducción de señal. Las nanopartículas comúnmente usadas son de oro o látex (Parolo et al., 2020).



**Figura 2. Inmunoensayo de Flujo Lateral.** (A) Representación de los componentes de la tira (Sample pad; Conjugate pad; membrana de nitrocelulosa con Test Line y Control Line; Absorbent pad). Representación del principio del inmunoensayo en (B) presencia del analito: el analito se une a los anticuerpos conjugados y (C) ausencia del analito en la muestra: tan solo es visible la Control Line.

En la mayoría de los LFIA, se pueden observar al menos dos líneas en áreas específicas de la membrana: la línea de prueba (Test Line) y la línea control (Control Line). En ambas, se aplican disoluciones que contienen inmunorreactivos. En la Test Line, un biorreceptor de captura se une al analito marcado para indicar la presencia o ausencia del analito (**Figura 2B**). La Control Line asegura el funcionamiento correcto de la prueba al unirse a la sonda independientemente de la presencia del objetivo. El proceso de LFIA se inicia al colocar la muestra líquida objetivo en la almohadilla de muestra. El analito acoplado con la etiqueta de detección migra a través de la membrana de prueba por fuerza capilar, donde se encuentran impresas las moléculas captoras (Bahadır & Sezgintürk, 2016). Al final de la tira se encuentra la almohadilla absorbente que recoge los reactivos en exceso (O'Farrell, 2013). La interacción entre las moléculas de detección y captura puede dar un resultado

positivo o negativo, dependiendo de la presencia/ausencia del analito (**Figura 2C**) y del tipo de prueba (ensayo sándwich o competitivo) (Koczula & Gallotta, 2016).

Los LFIA se dividen en dos formatos: ensayos directos (sándwich) o ensayos competitivos. En el formato sándwich, el analito es capturado entre dos anticuerpos complementarios y la presencia de una línea de prueba indica un resultado positivo. Este tipo de LFIA se utiliza típicamente para analitos con múltiples sitios antigénicos (hCG, SARS-CoV-2, VIH y otros). En los formatos competitivos, el analito objetivo bloquea los sitios de unión del anticuerpo y un resultado positivo se indica por la ausencia de una señal en la línea de prueba, y un resultado negativo cuando aparece una línea coloreada de cualquier intensidad en la línea de prueba. Los ensayos competitivos pueden ser cualitativos, semicuantitativos o cuantitativos y se utilizan para analitos más pequeños que tienen un solo determinante antigénico (drogas, toxinas) (Andryukov, 2020).

La simplicidad y el bajo costo de los LFIA los han posicionado como uno de los sensores de punto de atención (POC) más empleados en diversas disciplinas, abarcando desde el diagnóstico hasta el monitoreo ambiental y el análisis de seguridad.

### **1.5.1. Aplicaciones de LFIA**

En el ámbito clínico, el uso de LFIA para diagnóstico puede ofrecer resultados rápidos y precisos, mejorando la identificación, monitoreo y tratamiento de enfermedades, reduciendo costos y aumentando la eficacia. En seguridad alimentaria, la inocuidad de los alimentos es esencial para prevenir enfermedades, siendo clave implementar buenas prácticas y controles para minimizar riesgos, donde los LFIA son útiles para detectar contaminantes. En aplicaciones ambientales, los LFIA son efectivos para monitorear la calidad del agua y suelo al evaluar contaminantes, a pesar de los desafíos en mejorar la sensibilidad para cumplir con los estándares regulatorios (Di Nardo et al., 2021).

### **1.5.2. Limitaciones de LFIA**

Los LFIA que incorporan nanopartículas de oro (AuNP) son comúnmente usados como una opción alternativa para las pruebas de diagnóstico en el POC debido a sus beneficios como menor costo, tiempo de análisis reducido y mayor simplicidad en el proceso, portabilidad y necesidad mínima de reactivos. No obstante, los LFIA que utilizan nanopartículas de oro suelen presentar una sensibilidad analítica relativamente baja. Por lo general, la sensibilidad de detección de un inmunoensayo colorimétrico tipo sándwich se basa en la afinidad entre el analito objetivo y los anticuerpos utilizados en la línea de prueba. Incrementar la probabilidad de unión entre el analito diana y los dos anticuerpos o potenciar la señal colorimétrica podrían mejorar la sensibilidad de detección (Preechasedkit et al., 2022).

Aunque LFIA se caracteriza principalmente por su corto tiempo de ensayo, esa virtud también es una de sus limitaciones, ya que esto afecta a la sensibilidad analítica del ensayo, por no haber tiempo suficiente para la generación del evento de biorreconocimiento entre el analito diana y los anticuerpos. En cambio, métodos como el ELISA en placa, tienen una mayor sensibilidad analítica porque constan de sucesivas etapas de incubación y lavados, favoreciendo así la probabilidad de unión antígeno-anticuerpo y la eliminación de interferentes de la matriz que puedan generar señales no específicas. Sin embargo, la incorporación de etapas de incubación y lavado en LFIA puede poner en riesgo los pilares sobre los que se sustenta este método para ser usado en el punto de atención, como es la sencillez y rapidez del ensayo (Panferov et al., 2023).

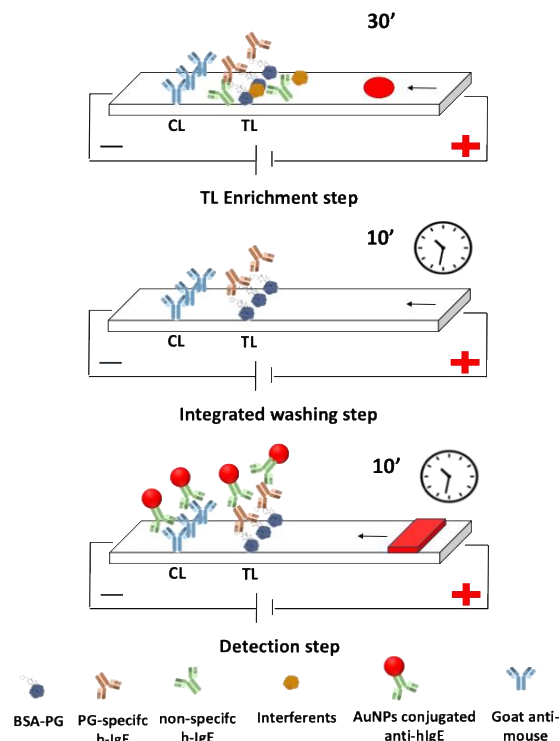
En el contexto del diagnóstico de alergias, la detección de IgE específica mediante LFIA puede ser desafiante debido a la dificultad para separar las IgE específicas de las no específicas, ya que el anticuerpo detector no distingue entre ambas. Por lo tanto, dado que las IgE no específicas se encuentran en el suero a niveles muy superiores que las IgE específicas, la probabilidad que el



anticuerpo detector reconozca las IgE específicas es baja, y esto se traduce una baja sensibilidad analítica. Por ello, es interesante recurrir a métodos que permitan realizar etapas de lavado en la propia tira de LFIA de manera automatizada, como es el caso de la electroforesis en papel.

### 1.6. Electroforesis como Estrategia para la Mejora de la Sensibilidad en LFIA

La electroforesis es un método que permite la separación de biomoléculas basada en su relación masa/carga. La aplicación de electroforesis en LFIA permiten controlar el flujo de la muestra a analizar ajustando el voltaje de la fuente de alimentación, cosa que es inalcanzable en LFIA convencional ya que el flujo de la muestra es por capilaridad y el usuario final no lo puede controlar. (Sena-Torralba et al., 2023). Tal y como se muestra en la **Figura 3**, se propone la aplicación de electroforesis en LFIA para realizar 3 etapas de ensayo de manera consecutivas. La primera etapa consiste en pasar durante 30 minutos un flujo continuo de muestra de suero por la línea de detección (TL), la cual está funcionalizada con el antígeno albúmina de suero bovino-Penicilina G (BSA-PG), consiguiendo así un enriquecimiento de las IgE específicas de PG que son capturadas en la TL. Seguidamente se realiza una etapa de lavado de 10 minutos de duración, con el fin de eliminar IgE no específicas y demás interferentes del suero de la zona de detección. La etapa de lavado viene dada por el flujo electro-osmótico del tampón de electroforesis que fluye de manera continua del ánodo al cátodo. Finalmente se realiza una etapa de detección, en la cual se deposita la almohadilla de conjugado en la tira. Dicha almohadilla se rehidrata liberando las nanopartículas de oro conjugadas con el anticuerpo detector, anti-IgE. Las nanopartículas conjugadas fluyen por electro-osmosis en dirección al cátodo, pasando por la TL. La presencia de IgE específicas en la TL hará que las nanopartículas conjugadas se acumulen en la TL generando una señal analítica cuantificable. El exceso de nanopartículas conjugadas, seguirán fluyendo y serán reconocidas por los anticuerpos secundarios inmovilizados en la línea de control positivo (CL), generando una señal analítica cuantificable.



**Figura 3.** Aplicación de electroforesis en LFIA. Representación de las etapas de ensayo que consisten en el enriquecimiento de la línea de prueba (TL) con el analito diana, seguido de una etapa de lavado para eliminar los interferentes de la zona de detección y finaliza con la etapa de detección, mediante la adición de la almohadilla de conjugado.

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo principal de este trabajo es desarrollar un método de diagnóstico rápido y fiable de alergias a antibióticos beta-lactámicos. Para ello, se ha desarrollado y optimizado un inmunoensayo de flujo lateral para la detección de IgEs humana (H-IgE) específicas de penicilina G, como prueba de concepto. Esto ha derivado a la ejecución de las siguientes tareas:

1. Preparación del hapteno BSA-penicilina G mediante hidrólisis básica.
2. Caracterización del hapteno BSA-penicilina G mediante espectroscopía ultravioleta-visible, Bradford y ELISA.
3. Síntesis y preparación de nanopartículas de oro (AuNPs) y carbono (CNPs).
4. Caracterización de AuNPs y CNPs mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), espectroscopía ultravioleta-visible y dispersión de luz dinámica (DLS).
5. Conjugación de AuNPs y CNPs a anticuerpos.
6. Fabricación de tiras y desarrollo y optimización de LFIA.
7. Desarrollo del ensayo LFIA y determinación de parámetros analíticos con el teléfono móvil.
8. Desarrollo de un método de LFIA basado en la aplicación de electroforesis para la detección de LDH, como prueba de concepto.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Reactivos y Materiales

La penicilina G (PG) 98 % se adquirió de Acros Organics. La lactato deshidrogenasa (LDH 59747), anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (R5506), albumina de suero bovino (BSA; A9418), sacarosa (S0389), tetraborato sódico (S9640), citrato sódico (71497), ácido tetracloroaúrico (520918), Trizma-HCl (T3253), Trizma-BASE (T1503), TMB (T2885), disolución de peróxido de hidrógeno (H1009), tabletas de PBS (P4417), estreptavidina con HRP (RabHRP3) y el ácido clorhídrico 37 % (v/v) (320331) han sido adquiridos en Sigma Aldrich. El detergente Tween-20 (TW00201000) se ha comprado en Scharlab. El ácido bórico (131015) se ha adquirido en Panreac. El reactivo Bradford (5000006) se adquirió en Biorad. El anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (ab6858) y la estreptavidina-HRP (ab7403) se adquirió en Abcam. El anticuerpo de cabra anti-IgE, el hapteno C1-PG y el suero artificial de PG (ARTHUS) han sido proporcionados por Dr. Fooke Laboratorien. Por su parte Eurofins Ingenasa ha proporcionado el anti-IgE humano monoclonal. Las nanopartículas de carbono (Carbon Black) han sido adquiridas en PowderNano. El Hospital Universitario y Politécnico La Fe en el marco del proyecto europeo COBIOPHAD ha proporcionado las muestras de suero humano de pacientes e individuos control. Los niveles de h-IgE de dichas muestras ha sido determinado con el método de referencia ImmunoCAP.

La fibra de vidrio (GFCP000800), fibra de celulosa (CFSP173000) y membrana de nitrocelulosa (Hi-Flow™ Plus 135) han sido adquiridas a EDM Millipore. Las placas ELISA utilizadas (microplacas de 96 pocillos, fondo plano de poliestireno tratadas y no tratadas) son de Corning.

Por otra parte, los tampones empleados en la síntesis de conjugados y en la realización de los diferentes inmunoensayos fueron:

- Tampón fosfato salino o PBS (10 mM, pH 7.4): 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl.
- Tampón fosfato salino con Tween-20 o PBST (10 mM, pH 7.4): PBS con 0.05% (v/v) Tween-20.
- Tampón borato o BB (100 mM, pH 8.96): 100 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O y 100 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.
- Tampón borato con Tween-20 o BBT (100 mM, pH 8.96): BB con 0.05% (v/v) Tween-20.
- Tampón de resuspensión: PBS con 0.05% (v/v) Tween-20, BSA 1% (m/v) y sacarosa 5% (m/v).
- Tampón fosfato o PB (10 mM, pH 7.4): 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O.

#### 3.2. Equipos e Instrumentos

El pH-metro (Seven Compact™) y la balanza analítica (XP205) fueron adquiridos de Metler Toledo. El dispensador de biorreactivos (AD1500) es de BioDot. El agitador magnético (Gyro rocker SSL3) y la centrífuga (Medifriger-BL-S) han sido adquiridos en Stuart y J.P.Selecta, respectivamente. El espectrofotómetro (Nanodrop 2000) ha sido adquirido de ThermoFisher Scientific. El lector de placas (Victor 1420) y el horno han sido adquiridos de PerkinElmer y Memmert, respectivamente. La evaluación cuantitativa de LFIA se ha realizado con el teléfono móvil iPhone 11 y el software Imaje J, y para el ensayo mediado por electroforesis se ha empleado un dispositivo fabricado por impresión 3D. El Z-potencial de las nanopartículas fue medido con Z-sizer de Malvern Panalytical. El microscopio electrónico de transmisión TEM (FEI Tecnai G2 20) fue utilizado en el servicio de microscopía de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV).

### 3.3. Procedimientos

#### 3.3.1. Síntesis y caracterización del antígeno BSA-PG

Los antígenos se han preparado conjugando la penicilina G con BSA, como transportador proteico, mediante la hidrólisis básica del anillo beta lactámico, siguiendo protocolo de Zhao et al. (2000). En concreto, se disolvieron 25 mg y 15 mg de penicilina G en 0.5 mL de tampón carbonato 0.5 M pH 11.0 en dos eppendorfs distintos. A esta disolución, se añadieron 2 mg de BSA y se incubó a 37 °C durante 24 horas. El antibiótico excedente se eliminó empleando filtros de preconcentración con un umbral de 10 KDa, utilizando PBS 1X como diluyente. La concentración del antígeno se cuantificó mediante espectroscopía UV-Vis y método de Bradford. Las disoluciones resultantes se alicuotaron y almacenaron a -20 °C hasta su posterior utilización.

#### 3.3.2. Caracterización del antígeno BSA-PG mediante ELISA

La técnica de ELISA es un método de detección y cuantificación de antígenos mediante la unión de anticuerpos específicos a una superficie sólida. Para este ensayo, la placa se tapizó con el hapteno conjugado BSA-PG a una concentración de 13 y 6.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en tampón carbonato 50 mM, pH 9. Se incubó durante 24 horas a 4°C para permitir la adsorción del conjugado a la superficie de la placa. Tras realizar 4 lavados con PBS-T 0.05%, se añadieron diluciones seriadas en PBS-T de una muestra de suero de un paciente diagnosticado como positivo en alergia a penicilina G y muestra de suero de un paciente diagnosticado como no alérgico a penicilina G. El suero positivo estaba caracterizado previamente mediante ImmunoCAP con una concentración de IgE específicas de PG de 6 U  $\text{mL}^{-1}$ . Se incubó durante 30 minutos y posteriormente, se realizaron 4 lavados con PBS-T. A continuación, se dispensó el anticuerpo secundario anti-IgE de Ingenasa a una dilución 1:4000 en PBS-T. Tras la incubación de 30 minutos, se lavó 4 veces con PBS-T. Se adicionó el anticuerpo secundario marcado con HRP a una dilución 1/5000 en PBS-T. Se incubó en 30 minutos y se lavó 4 veces con PBS-T. Posteriormente, se añadió la peroxidasa de tal forma que su actividad fue revelada mediante la adición del tampón de revelado (citrato sódico 25 mM, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )). La reacción enzimática se frenó a los 10 minutos mediante la adición de 100:1 de ácido sulfúrico 2.5 M). Se cuantificó la señal midiendo la absorbancia a 450 nm con el lector de placas. La absorbancia a 450 nm se representó frente a la concentración de IgE específicas y se realizó un ajuste logístico de 4 parámetros. Dichos parámetros son los siguientes:

-**Min**: valor mínimo de la curva.

-**Max**: valor máximo de la curva.

-**EC50**: concentración efectiva media, es decir, valor de x para el punto de la curva situado a medio camino entre los parámetros min y máx.

-**Hillslope**: pendiente de la curva en su punto medio. Cuanto mayor sea su valor, más pronunciada será la curva.

Con dicha curva de calibrado se han determinado los parámetros analíticos del ensayo:

- **Límite de detección (LoD)**: concentración mínima de un analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. Importante para determinar la sensibilidad de un ensayo y se calcula generalmente como la concentración a la cual la señal es tres veces mayor que la desviación estándar del blanco o ruido de fondo.

- **Límite de cuantificación (LoQ)**: Concentración mínima de un analito que puede ser cuantificada. El LoQ es generalmente más alto que el LoD y se calcula como la concentración a la cual la señal es diez veces mayor que la desviación estándar del blanco.

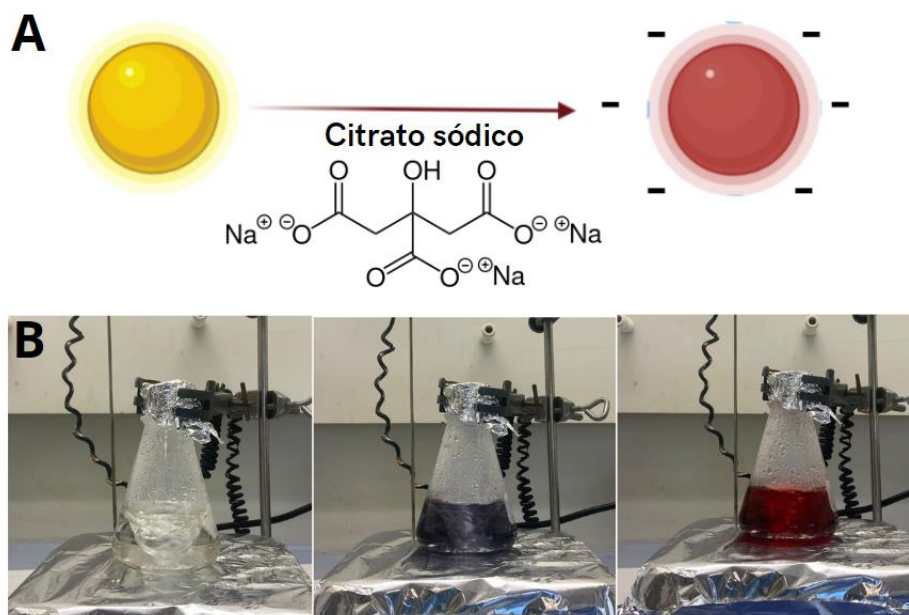
- **Rango dinámico de trabajo (DLR)**: intervalo de concentraciones del analito en el cual el método analítico produce resultados lineales y precisos. Dentro de este rango, la relación entre la concentración del analito y la señal de salida es directamente proporcional. Se corresponde al rango de concentración entre el 90 y 10% de la señal analítica.

- **Coefficiente de determinación ( $R^2$ )**: es una medida estadística que indica qué tan bien se ajustan los datos experimentales a un modelo lineal o de regresión.

### 3.3.3. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro (AuNPs)

Las nanopartículas de oro de 20 nm de diámetro se han sintetizado siguiendo el método de Turkevich (1951). Inicialmente, se ha preparado una disolución de 50 mL de  $\text{HAuCl}_4$  a una concentración de 0,25 mM en agua MilliQ, la cual ha sido introducida en un Erlenmeyer y llevada a ebullición bajo condiciones de agitación a 500 rpm utilizando una placa magnética calefactable. Seguidamente, se ha añadido 1,25 mL de citrato sódico al 2 % en agua MilliQ, el cual actúa como agente reductor y estabilizador.

La reducción de la sal de oro ha tenido lugar durante los siguientes 10 minutos tras la adición del citrato sódico, evidenciándose un cambio de color en la disolución, desde incoloro hasta morado, violeta y finalmente rojo. Este último tono es característico de las nanopartículas de 20 nm de diámetro.



**Figura 4.** (A) Representación esquemática de la síntesis de nanopartículas de oro mediante la reducción del ácido tetracloroaúrico ( $\text{HAuCl}_4$ ) con el agente reductor y estabilizante, citrato sódico. (B) Proceso experimental de síntesis de nanopartículas de oro en un matraz de reacción. De izquierda a derecha, se observa el cambio de color en la disolución: inicialmente incolora, pasando a un color gris oscuro tras la adición de citrato sódico, indicando la formación inicial de nanopartículas y su nucleación, y finalmente adquiriendo un color rojo rubí, característico de la formación completa de nanopartículas de oro 20 nm estables.

Las nanopartículas de oro (AuNPs) poseen una propiedad única conocida como resonancia de plasmón superficial (SPR), que es la oscilación colectiva de los electrones de superficie cuando las AuNPs son irradiadas con luz. Esta propiedad SPR depende del tamaño y la forma de AuNPs y del medio coloidal circundante. Debido a esta característica, se puede estudiar las propiedades físicas de las AuNPs en espectroscopia con una fuerte banda de absorbancia en la región visible (500 a 600 nm). Por ejemplo, la banda de plasmón superficial para AuNPs de 20 nm de diámetro presentan picos alrededor de 523 nm en el espectro UV-Visible. Conforme vaya aumentando el diámetro de AuNPs, la longitud de onda cambiará (A. E. F. Oliveira et al., 2023).

Previo almacenamiento de las nanopartículas a 4 °C, se han caracterizado con espectroscopía UV-Vis, observando cambios en el pico SPR, microscopía electrónica de transmisión (TEM) y dispersión de luz dinámica (DLS).

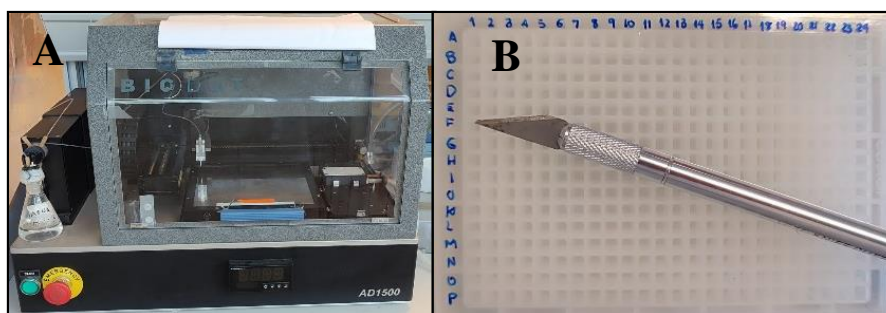
### **3.3.4. Conjugación de AuNPs y CNPs**

Para realizar la conjugación de anticuerpos con nanopartículas de oro (AuNPs), se incuban 1,5 mL de AuNPs, 50 mL de BB 0,5 M pH 9.0 y con el volumen preciso de anticuerpos para lograr una concentración final de 6,25 mg L<sup>-1</sup>. Esta mezcla se mantiene en agitación constante durante 30 minutos. Posteriormente, se adiciona albúmina sérica bovina (BSA) al 1% o al 10%, dependiendo del nivel de bloqueo requerido, y se agita nuevamente por otros 30 minutos. La suspensión resultante se somete a centrifugación a 14,000 rpm durante 30 minutos, tras lo cual se retira cuidadosamente el sobrenadante. El pellet obtenido se resuspende en tampón de resuspensión hasta alcanzar una densidad óptica (OD) 3, la cual se verifica mediante un Nanodrop. Finalmente, las nanopartículas conjugadas se depositan sobre una fibra de vidrio para su posterior uso.

A partir de una disolución de CNPs al 1 % (m/v, en agua MiliQ) sonicada durante 1 hora a temperatura ambiente, se realiza la dilución correspondiente para obtener una concentración del 0.2 % (m/v, en tampón BB). Esta disolución se vuelve a sonicar durante 1 hora y se añade el volumen necesario de una disolución de anti-IgE para una concentración final de 0.35 mg mL<sup>-1</sup>. A continuación se añaden 500 µL de una disolución de BSA al 1 % (m/v, en tampón BB) y se centrifuga a 11600 rcf a 4 °C durante otros 15 minutos. Estas dos últimas etapas se realizan por cuatuplicado para asegurar que la mayor parte de las CNPs que han quedado sin conjugarse se encuentren bloqueadas por la proteína. Finalmente, con ayuda de una micropipeta se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 500 µL de BSA al 1 % (m/v, en tampón BB). La dilución empleada de este conjugado en el ensayo LFIA ha sido la siguiente: 20 µL de conjugado + 980 µL de tampón de resuspensión.

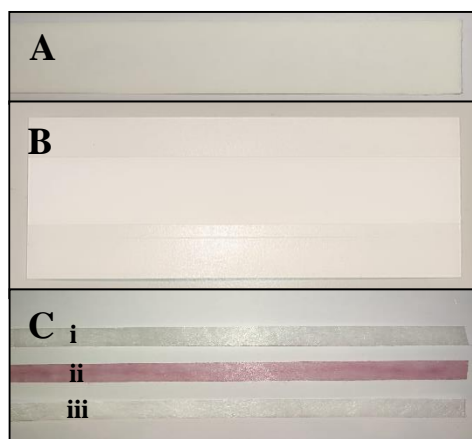
### **3.3.5. Fabricación de las tiras de LFIA**

El proceso de fabricación de las tiras de flujo lateral comienza con la inmovilización de los reactivos sobre la membrana de nitrocelulosa. Este procedimiento se realiza utilizando el dispensador de reactivos Biodot (Biodot Inc., Irvine, USA) (**Figura 5A**). En la fabricación de las tiras de flujo lateral, se imprimen dos líneas: la línea de prueba (Test Line) y de control (Control Line). Las disoluciones de anticuerpos que se imprimen en cada línea se depositan en la placa de impresión (**Figura 5B**).



**Figura 5. Impresión de tiras reactivas.** (A) Dispensador de biorreactivos líquidos BioDot. (B) Reactivos depositados en la placa de impresión.

En la Test Line se dispensa una disolución de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  de C1-PG o BSA-PG, que detecta la presencia de IgE en la muestra y en la Control Line se dispensa el anticuerpo secundario; anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (GAM) a  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . La Control Line detecta el anti-IgE que está conjugado con las nanopartículas. Una vez impresos los inmunorreactivos sobre la membrana nitrocelulosa, esta se deja secar durante 2 horas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Seguidamente, se puede proceder al ensamblaje de las membranas de celulosa (**Figura 6A**) en las zonas de muestreo (*sample pad*) y absorción (*absorbent pad*). Ambas deben quedar alineadas con el límite inferior y superior, respectivamente, de la lámina adhesiva de cartón sobre la que se encuentra la membrana de nitrocelulosa (**Figura 6B**). Además, la almohadilla de muestreo y la *conjugate pad* (**Figura 6C**) deben quedar superpuestas. Por último, con ayuda de una guillotina se cortan tiras de 4 mm de ancho y 6 cm de largo.



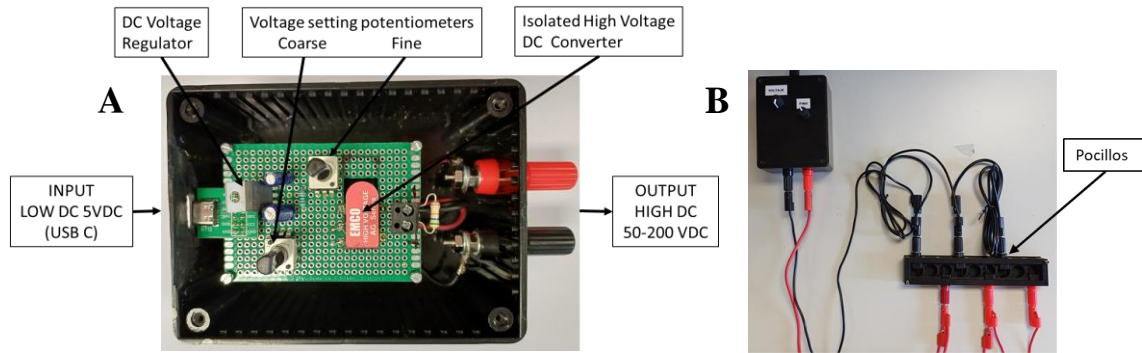
**Figura 6. Fabricación de las tiras reactivas empleadas en LFIA.** (A) Membrana de celulosa empleada como almohadillas de muestreo (parte lisa en contacto con el adhesivo) y absorción (parte rugosa en contacto con el adhesivo). (B) Membrana de nitrocelulosa sobre una lámina adhesiva de cartón. (C) Membranas de fibra de vidrio: i) Conjugado a partir de CNPs, ii) Conjugado a partir de nanopartícula de oro (AuNPs), iii) Aspecto de una fibra de vidrio sin conjugado.

### **3.3.6. Ensayo LFIA y evaluación de los resultados**

Con ambos tipos de tiras reactivas LFIA se realiza un calibrado de ARTHUS en tampón PBS 10 mM, pH 7.4 y Tween 0.05%. Para ello, se adicionan  $100 \mu\text{L}$  de cada una de las disoluciones patrón en diferentes pocillos de una placa y, a continuación, se introducen las tiras reactivas de forma que la *absorbent pad* quede en contacto con el líquido. Una vez ha fluido toda la disolución se pueden retirar las tiras y se dejan secar antes de analizar la intensidad de la señal, tomando una foto con el teléfono móvil y analizando la imagen con el software de *Image J*. Los parámetros analíticos del ensayo se obtienen siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 3.3.2.

### **3.3.7. Diseño y fabricación del dispositivo de electroforesis**

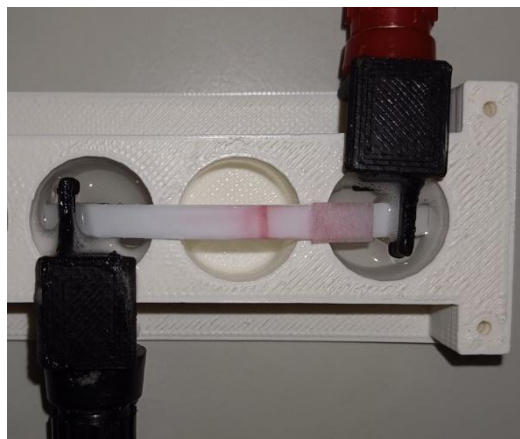
El dispositivo de electroforesis consta de una placa multipocillos fabricada mediante impresión 3D, que contiene de manera integrada filamentos de platino que actúan como electrodos. Dichos electrodos están conectados a una fuente de alimentación portátil y económica que permite la generación de 50 a 200 V. Este dispositivo ha sido diseñado y fabricado por un miembro del grupo, el cual es ingeniero electrónico. En la **Figura 7A** se muestra la fuente de alimentación con los componentes que lo conforman. La **Figura 7B** muestra el montaje para la realización de los inmunoensayos. Cabe destacar que este dispositivo permite realizar tres inmunoensayos de manera simultánea al presentar seis pocillos (tres correspondientes al ánodo y otros tres al cátodo).



**Figura 7. Dispositivo de electroforesis empleado en los inmunoensayos.** (A) Componentes de la fuente de alimentación. (B) Montaje del ensayo que comprende una placa con 6 pocillos que contiene electrodos integrados que están conectados a una fuente de alimentación portátil.

### 3.3.8. Ensayo de electroforesis en LFIA

Para el ensayo de electroforesis en LFIA, se imprimen en la TL y CL los mismos inmunorreactivos a las mismas concentraciones que en el LFIA convencional. La única diferencia es que la tira de nitrocelulosa mide 5 cm de largo, en lugar de 2.5 cm, y no contiene las almohadillas de conjugado, muestra y adsorción. Una vez inmobilizados los inmunorreactivos en la tira, esta se introduce en los pocillos de la placa. En el pocillo correspondiente al ánodo se introducen 1.4 mL de la muestra diluida en el tampón de electroforesis BBT. En el pocillo correspondiente al cátodo se introducen 1.4 mL de BBT. Los líquidos de ambos pocillos fluyen por la tira de nitrocelulosa, la cual actúa como puente eléctrico entre el ánodo y cátodo. Se aplica una electroforesis a 200 V durante 30 minutos, que corresponde a la etapa de enriquecimiento de la TL (**Figura 3**). Seguidamente se reemplaza la muestra del pocillo del ánodo con 1.4 mL de BBT, y se realiza una electroforesis a 200 V durante 15 minutos, correspondiente a la etapa de lavado. Finalmente, se añade la almohadilla de conjugado en la tira de nitrocelulosa a 1 cm de la TL y se realiza una electroforesis a 200 V durante 10 minutos. La almohadilla de conjugado se rehidrata al entrar en contacto con la tira mojada y la disolución de AuNPs conjugadas con anti-IgE fluye por electro-osmosis hacia el cátodo (**Figura 8**).



**Figura 8. Fotografía tomada durante la última etapa del ensayo de electroforesis en LFIA, donde la disolución de conjugado ha fluido por la tira en sentido ánodo (electrodo rojo) a cátodo (electrodo negro) por electro-osmosis y ha reaccionado con la línea control, generando una señal analítica visible al ojo humano. El exceso de conjugado se está separando de la línea de control.**

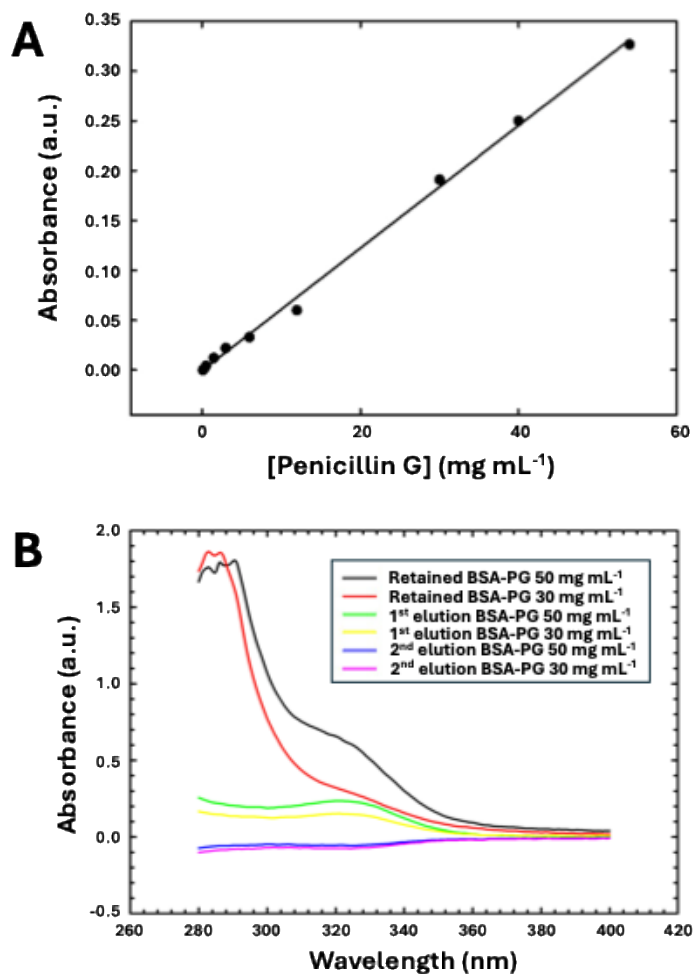


## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

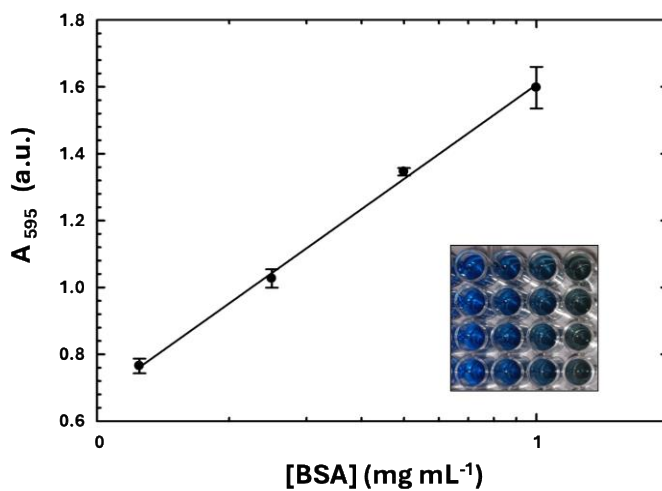
### 4.1. Caracterización del Antígeno BSA-PG

Tal y como se describe en el apartado 3.1, la PG se conjugó con la BSA, ya que esta última es necesaria para inmovilizar la PG en la línea de detección de la membrana de nitrocelulosa de la tira de LFIA. Esto se debe a que la membrana de nitrocelulosa únicamente tiene capacidad de adsorción de proteínas. Por lo tanto, la BSA actúa como carrier de la PG. Se prepararon dos conjugados con la misma concentración de BSA  $4 \text{ mg mL}^{-1}$ , pero con distinta concentración de PG,  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  y  $30 \text{ mg mL}^{-1}$ . La conjugación se realizó mediante hidrólisis básica y se purificó con un filtro de exclusión molecular de 10 KDa, con el fin de eliminar el exceso de PG no anclado a la BSA. Se escogió este punto de corte de filtro, con el fin de retener toda la BSA (66 KDa) y eluir la PG (0.33 KDa) no conjugada a la BSA.

Una vez purificados los conjugados, lo primero que se hizo fue determinar la eficacia del proceso de conjugación, evaluando la concentración de PG en los conjugados y la concentración de PG eluída de los filtros. Para ello, se realizó una recta de calibrado representando la absorbancia a 320 nm frente a la concentración de patrón PG. Se escogió 320 nm ya que está reportado como la PG presenta un pico de absorbancia a dicha longitud de onda (Song et al., 2008). Tal y como se observa en la **Figura 9A**, la absorbancia a 320 nm es directamente proporcional a la concentración de PG en un rango de 0 a  $50 \text{ mg mL}^{-1}$ . De este modo, la ecuación de la recta ( $A_{320} = 0.006 \cdot ([\text{PG}] \text{ mg mL}^{-1}) - 0.0031$ ) se utilizó para determinar la concentración de PG en los conjugados BSA-PG y en la disolución eluída de los filtros. La **Figura 9B** muestra el espectro de absorbancia de los conjugados BSA-PG retenidos en el filtro y la disolución eluída entre 280 y 400 nm. Tal y como se observa en la gráfica, el pico a 320 nm correspondiente a la concentración de PG, es mayor para el conjugado preparado con  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  (curva negra) que con el preparado con  $30 \text{ mg mL}^{-1}$  (curva roja). Dichos picos de absorbancia corresponden a una concentración de PG de 110 y  $54 \text{ mg mL}^{-1}$ . Esto se debe a que, durante el proceso de purificación, los conjugados se concentran 7 veces. Por lo tanto, asumiendo el factor de concentración, se determinó que los conjugados preparados con  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  y  $30 \text{ mg mL}^{-1}$  tenían una concentración de PG de  $16 \text{ mg mL}^{-1}$  y  $8 \text{ mg mL}^{-1}$ , respectivamente. Esto corresponde con una eficiencia de conjugación media del  $28 \pm 2\%$ . El exceso de PG no conjugada a la BSA, se ve reflejado en el pico a 320 nm, de la primera disolución eluída. Dicho pico desaparece en la segunda disolución eluída, correspondiente al lavado de del conjugado con PBS 1X. Esto confirma que los conjugados BSA-PG purificados no tienen PG libre, lo cual es crucial para asegurar que el analito diana y el anticuerpo detector conjugado a las nanopartículas de oro se anclen de manera favorable a la línea de detección de la tira de LFIA, durante la realización del inmunoensayo. Del mismo modo, se determinó la concentración de BSA de los conjugados BSA-PG después del proceso de purificación de los conjugados con los filtros de exclusión molecular. Dicha determinación se realizó con el método Bradford, que consiste en la tinción específica de proteínas con el colorante Azul Coomassie, que promueve en cambio de color de marrón a azul, y por consiguiente un desplazamiento del pico de absorbancia de 465 a 595 nm. Por lo tanto, a mayor concentración de proteínas en la disolución, mayor es la intensidad de color azul y mayor es la absorbancia a 595 nm. Con el fin de determinar la concentración de BSA en los conjugados, se realizó una recta de calibrado relacionando la absorbancia a 595 nm con la concentración de BSA patrón. Tal y como se observa en la **Figura 10**, la absorbancia a 595 nm es directamente proporcional a la concentración de BSA en un rango de 0.12 a  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . De este modo, la ecuación de la recta ( $A_{595} = 0.406 \cdot \ln ([\text{BSA}] \text{ mg mL}^{-1}) + 1.6057$ ) se utilizó para determinar que la concentración de BSA en los conjugados BSA-PG es de  $30.3 \pm 3.6 \text{ mg mL}^{-1}$ . Asumiendo el factor de concentración 1/7, la concentración de BSA es de  $4.3 \text{ mg mL}^{-1}$ , lo que indica que los filtros de exclusión molecular retienen toda la BSA del conjugado.



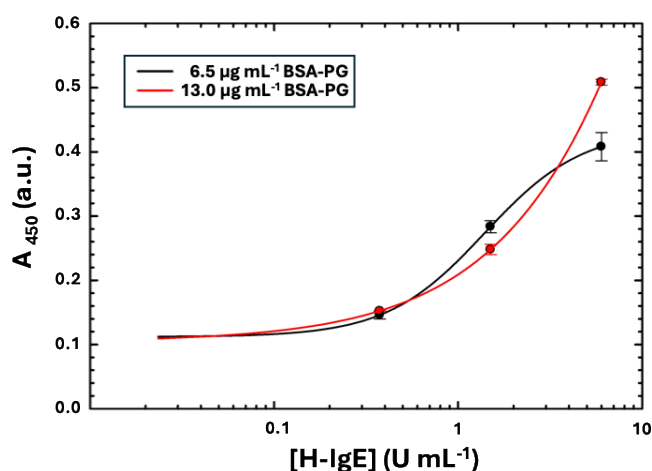
**Figura 9. Caracterización de los conjugados de BSA-PG.** (A) Recta de calibrado representando la absorbancia a 320 nm frente a la concentración de penicilina G en mg mL<sup>-1</sup>. (B) Espectros de absorbancia de los conjugados de BSA-PG retenidos en los filtros de exclusión molecular y eluidos durante el proceso de purificación de los conjugados.



**Figura 10. Caracterización de los conjugados de BSA-PG.** (A) Recta de calibrado representando la absorbancia a 595 nm frente a la concentración de BSA en mg mL<sup>-1</sup> (n=3). Recuadro con la foto de los pocillos después de realizar el ensayo de la recta de calibrado.

#### 4.2. Caracterización del Antígeno BSA-PG mediante ELISA

Una vez determinada la concentración final de BSA y PG en los antígenos, se evaluó la capacidad de los antígenos de reconocer anticuerpos h-IgE específicos de PG en suero humano. Para ello, se realizó un ensayo ELISA donde se tapizó la placa con 6.5 y 13  $\mu\text{g mL}^{-1}$  del antígeno BSA-PG y se analizaron diluciones seriadas de un suero de un paciente diagnosticado como alérgico a PG con 6  $\text{U mL}^{-1}$  de h-IgE específicas, determinadas con el método de referencia ImmunoCAP. Como sistema de detección se realizó un ensayo de dos etapas en el cual se usó un anticuerpo contra h-IgE y un anticuerpo secundario marcado con HRP. Los valores de absorbancia de la curva de calibrado se representaron frente a la concentración de h-IgE específicas y se realizó una regresión logística de 4 parámetros con el fin de determinar los parámetros analíticos de los ensayos (**Figura 11**). Dichos parámetros se recogen en la **Tabla 3**.



**Figura 11.** Curva de calibrado en ELISA para la detección de H-IgE específicas de PG en suero humano de paciente diagnosticado como alérgico. Comparativa de las condiciones de ensayo tapizando la placa con 13 (curva negra) y 6.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  del antígeno BSA-PG (curva roja) ( $n=3$ ).

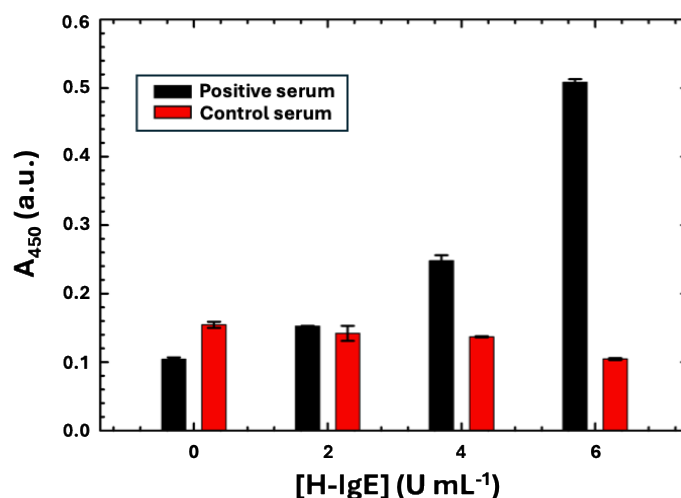
Se determinó mediante ELISA que el antígeno BSA-PG desarrollado tiene capacidad para reconocer las h-IgEs del suero ya que se observa una relación dosis respuesta entre la señal de absorbancia a 450 nm y la concentración de h-IgEs en el suero. En la Figura 10 se observa que la señal máxima se consigue al tapizar 13  $\mu\text{g mL}^{-1}$  del antígeno BSA-PG, como cabe de esperar, y que esta condición no genera señales inespecíficas al analizar un blanco (PBS 1X). Por otra parte, tal y como se observa en la Tabla 3, la condición de tapizado con 13  $\mu\text{g mL}^{-1}$  del antígeno BSA-PG permite un menor límite de detección y cuantificación.

**Tabla 3.** Parámetros analíticos de la curva de calibrado ELISA tapizando el antígeno BSA-PG a 13 y 6.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Límite de detección (LoD), Límite de cuantificación (LoQ), Pendiente (Hillslope), Rango dinámico de trabajo (DLR) y Coeficiente de determinación ( $R^2$ ).

[BSA-PG] ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LoD ( $\text{U mL}^{-1}$ )	LoQ ( $\text{U mL}^{-1}$ )	Hillslope	DLR ( $\text{U mL}^{-1}$ )	$R^2$
6.5	0.19	0.42	1.63	0.04 – 0.37	0.99
13	0.05	0.21	0.81	0.05 – 0.45	0.99

Seguidamente, con el fin de determinar la selectividad del ensayo se realizó una curva de calibrado en ELISA con las mismas condiciones de ensayo, analizando diluciones seriadas de suero humano de un paciente diagnosticado como no alérgico a PG. Tal y como se observa en las barras rojas de la **Figura 12**, en este caso no hubo señal dosis respuesta entre la absorbancia a 450 nm y la dilución del suero humano, es decir no hay diferencias significativas entre la señal obtenida al analizar un

blanco (PBS 1X) y las diluciones del suero humano. Esto indica que tanto el antígeno BSA-PG como el anticuerpo detector son selectivos al reconocimiento de la PG, lo cual es clave para asegurar la fiabilidad del ensayo.



**Figura 12.** Curva de calibrado en ELISA para la detección de H-IgE específicas de Penicilina G (PG) en suero humano de un paciente diagnosticado como alérgico a PG (negro) y en un suero humano de un paciente diagnosticado como no alérgico a PG (rojo) (n=3).

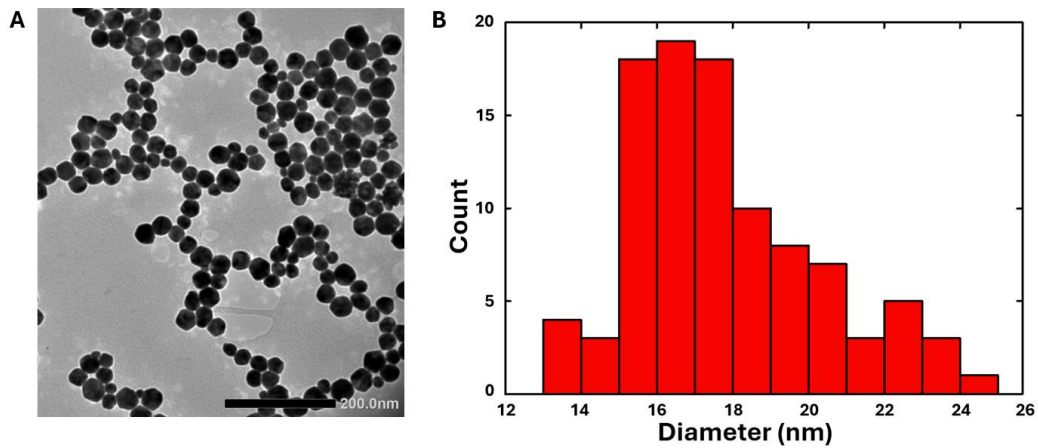
Atendiendo a la tabla RAST (**Tabla 2**), el método ELISA desarrollado tiene la sensibilidad analítica suficiente para diagnosticar de manera diferencial pacientes de la clase 0, no alérgicos a PG, de pacientes alérgicos a PG ( $> 0.35 \text{ U mL}^{-1}$ ). Sin embargo, este método es laborioso, ya que dura más de 3 horas y conlleva múltiples etapas de incubación y lavado. Además, es un método complejo que requiere de personal cualificado y equipamiento de laboratorio, por lo que su uso está restringido a laboratorios clínicos. Dado que el objetivo del trabajo es desarrollar un método rápido que permita el diagnóstico de alergia penicilina G de manera instantánea por cualquier persona no cualificada, se ha pasado a la siguiente tarea, que es el desarrollo del método LFIA usando los mismos reactivos que en el método ELISA.

### 4.3. Caracterización de las Nanopartículas de Oro (AuNPs)

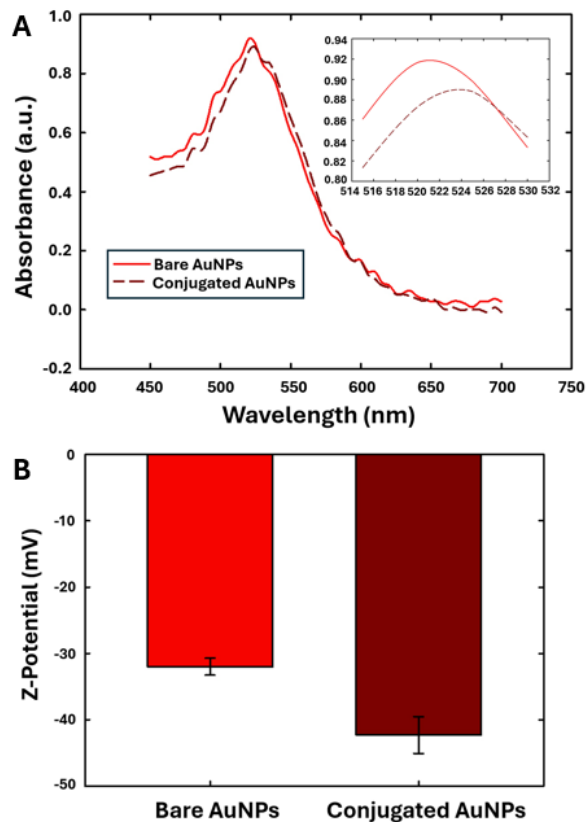
El primer paso en el desarrollo del método LFIA ha sido la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs), que se utilizarán como sistema de transducción de señal en el evento de bioreconocimiento entre las H-IgEs específicas de PG y el anticuerpo anti-IgE humano. Se han escogido estas nanopartículas debido a que su método de síntesis es barato, sencillo y rápido, permitiendo producir una gran cantidad en el laboratorio sin necesidad de adquirirlas comercialmente. Además, las nanopartículas de oro tienen un alto coeficiente de extinción molar, lo que permite la generación de una señal colorimétrica visible al ojo humano sin necesidad de instrumentos de lectura.

Las AuNPs se han sintetizado siguiendo el método de Turkevich descrito en el apartado 3.3.3, y se han caracterizado por microscopía electrónica de transmisión (TEM), con el fin de determinar su tamaño y morfología. Tal y como se observa en la **Figura 13A**, las AuNPs presentan una forma esférica, tienen un tamaño homogéneo y no se encuentran aglomeradas. Dado que el método de Turkevich está enfocado a la síntesis de AuNPs de 20 nm, se ha medido el diámetro de las AuNPs con el software de análisis de imagen Image J, a partir de la imagen obtenida con el TEM. Después de analizar 100 AuNPs, se ha realizado un histograma (**Figura 13B**), donde se ha determinado que la dispersión de las AuNPs es homogénea y comprenden un diámetro de 13 a 25 nm, siendo la media de  $17.6 \pm 2.6 \text{ nm}$ .

Seguidamente, se ha examinado el espectro de absorción UV-Vis de las AuNPs, observándose un pico de absorbancia a 520 nm (**Figura 14A**), el cual está relacionado con la resonancia del plasmón de superficie localizada (LSPR). La longitud de onda a la que absorbe dicho pico corresponde con el diámetro de las AuNPs. En este caso, corresponde a 20 nm de diámetro, ya que estas nanopartículas capturan la luz verde (520 nm) y exhiben el tono complementario, que es el rojo (Oliveira et al., 2023). Una vez conjugadas las AuNPs con el anticuerpo anti-IgE, que permite conseguir el sistema de detección del LFIA, se observó un desplazamiento del pico LSPR de 520 a 525 nm, indicativo de que las AuNPs han incrementado en diámetro, y por consiguiente tienen adheridos a la superficie el anticuerpo anti-IgE y la BSA que sirve como agente bloqueante.



**Figura 13** Caracterización de las AuNPs mediante TEM. (A) Imagen de las AuNPs tomada con el TEM (escala 200 nm). (B) Histograma del diámetro de las AuNPs (n=100).



**Figura 14.** Estudio de las nanopartículas conjugadas y sin conjugar. (A) Espectros de absorción UV-Vis de nanopartículas de oro (AuNPs) no conjugadas (línea roja continua) (pico a 520 nm) y nanopartículas de oro conjugadas (línea roja discontinua). Los espectros exhiben un desplazamiento en el pico LSPR. (B) Distribución del potencial Zeta (mV) de AuNPs sin conjugar y conjugadas.

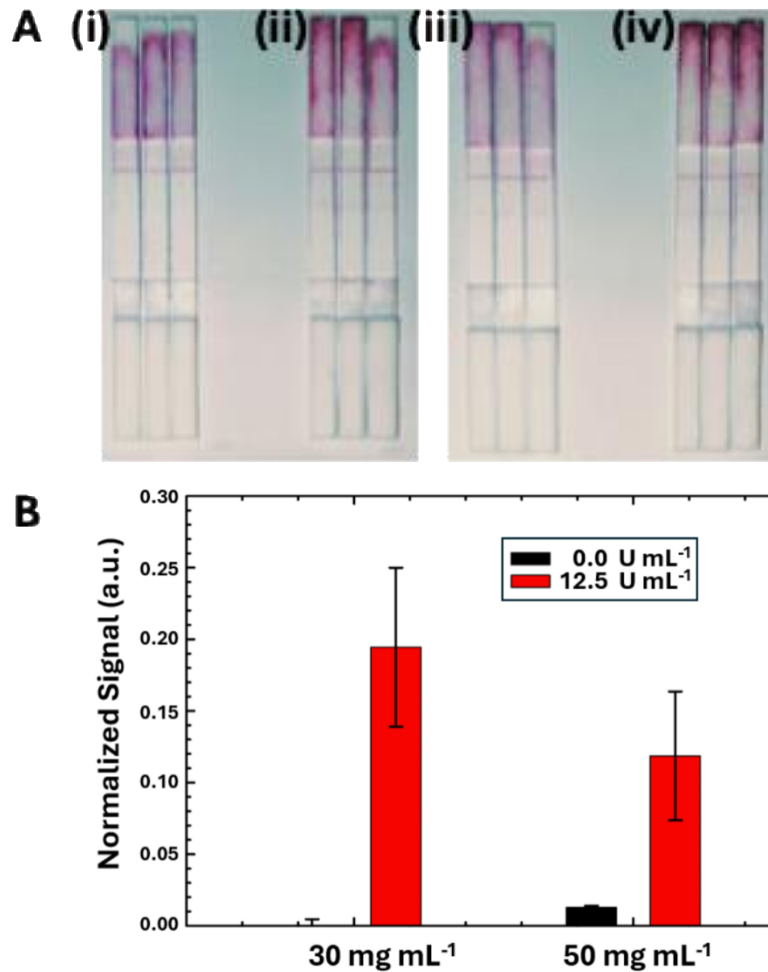
A continuación, se caracterizó las AuNPs y los conjugados de AuNPs-anti-IgE mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS), donde se determinó que la carga superficial de las AuNPs es negativa (potencial Z de  $-32 \pm 1$  mV (CV = 4.01 %)) (**Figura 14B**). Esto se debe a que las AuNPs están recubiertas con citrato que actúa como agente estabilizante, evitando que las AuNPs se aglomeren entre sí. Dado que el ácido cítrico del citrato tiene pKAs (3.15, 4.77 y 6.40) menores que el pH de la disolución (pH 7.0), la carga superficial de las AuNPs es negativa. Además, al tener un valor de potencial Z mayor de  $\pm 30$ , se considera que las AuNPs son estables, lo cual es crucial para asegurar su eficacia como sistema de detección en LFIA. Una vez conjugadas a los anticuerpos anti-IgE, la carga superficial negativa de las AuNPs incrementa (potencial Z de  $-42 \pm 3$  mV (CV = 6.58 %)). Esto indica que la conjugación ha sido efectiva, ya que tanto el anticuerpo como la BSA tienen un punto isoeléctrico (pI) menor al pH de la disolución de conjugación (pH 9.0). La conjugación de las AuNPs con los anticuerpos y BSA, incrementa la estabilidad de las nanopartículas, lo cual es interesante para cumplir con los objetivos del trabajo.

#### 4.4 Desarrollo y Optimización de LFIA

El ensayo LFIA consistió en la inmovilización del antígeno BSA-PG en la TL, el anticuerpo secundario GAM en la CL y las AuNPs conjugadas con el anticuerpo anti-IgE en la almohadilla de conjugado. En el primer ensayo, se inmovilizó el antígeno BSA-PG a  $30 \text{ mg mL}^{-1}$  y  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  de PG y se analizó 0 y  $12.5 \text{ U mL}^{-1}$  de ARTHUS. Cabe destacar que las concentraciones de PG son las de partida cuando se conjugan los antígenos, pero en realidad tal y como se describe en el apartado 4.1, los antígenos tenían una concentración de PG de  $16 \text{ mg mL}^{-1}$  y  $8 \text{ mg mL}^{-1}$ , respectivamente, una vez finalizado el proceso de conjugación y purificación con los filtros de exclusión molecular.

Tal y como se observa en la **Figura 15A**, todas las tiras mostraban una señal analítica elevada y constante en la CL, indicativo de que el ensayo se ha realizado correctamente y el flujo de nanopartículas conjugadas ha fluido favorablemente por la tira hasta acumularse en la almohadilla de absorción. Se observa también que las tiras con  $30 \text{ mg mL}^{-1}$  de BSA-PG en la TL, interrogadas con  $0 \text{ U mL}^{-1}$  de Arthus, no presentan una señal en la TL (**Figura 15A (i)**), indicativo de que las nanopartículas conjugadas con el anticuerpo anti-IgE no reaccionan de manera inespecífica con la BSA-PG inmovilizada en la TL, lo cual es fundamental para asegurar la fiabilidad del ensayo. Al interrogar esa condición con  $12.5 \text{ U mL}^{-1}$  de Arthus, se observa una señal analítica visible al ojo humano en la TL, pero es muy fina comparada con la señal de la CL (**Figura 15A (ii)**). Esto se debe a que el antígeno inmovilizado en la TL es muy pequeño ( $\approx 66 \text{ kDa}$ ), y de ese antígeno las moléculas de PG ( $0.33 \text{ kDa}$ ) son las únicas responsables del reconocimiento del Arthus. Por ello, la acumulación de nanopartículas ocurre en un área muy reducida de la TL. Por su parte, la CL está funcionalizada con un anticuerpo secundario ( $150 \text{ kDa}$ ) que es 2.3 veces más grande que el antígeno impreso en la TL, y por tanto ocupa un mayor espacio en la CL, generando una banda colorimétrica más ancha. Sin embargo, el hecho de que la banda de la TL sea fina no impide que se pueda observar la señal a simple vista.

De manera interesante, al analizar  $0 \text{ U mL}^{-1}$  de Arthus con las tiras funcionalizadas con  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  de BSA-PG en la TL, se observa una señal colorimétrica borrosa en la TL, pero lo suficientemente intensa para ser catalogada como un resultado falso positivo, ya que la muestra no contiene anticuerpos h-IgE (**Figura 15A (iii)**). Además, al comparar de manera semi-cualitativa, por inspección visual, la señal generada en la TL al analizar  $12.5 \text{ U mL}^{-1}$  de Arthus con las tiras funcionalizadas con  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  de BSA-PG, la señal es menor que la obtenida con las tiras con  $30 \text{ mg mL}^{-1}$  de BSA-PG (**Figura 15A (iv)**). Este resultado se ha confirmado al evaluar las tiras de manera cuantitativa midiendo la señal en la TL, CL y fondo de las tiras con el software Image J, donde se ve claramente que la mejor condición de ensayo es la de  $30 \text{ mg mL}^{-1}$  de BSA-PG en la TL, porque proporciona la mayor diferencia de señal entre un ensayo blanco y un positivo (**Figura 15B**).



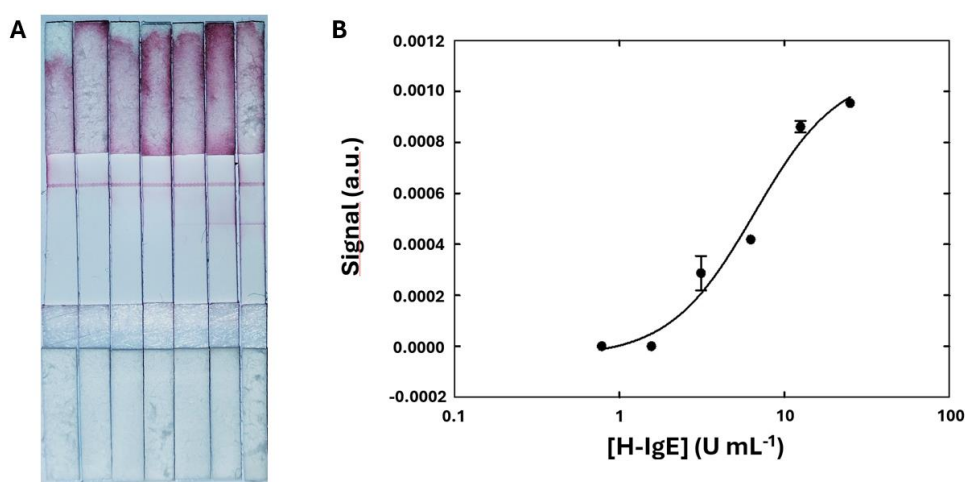
**Figura 15.** (A) Imagen de las tiras de LFIA preparadas 30 mg mL<sup>-1</sup> de BSA-PG en la TL después de analizar (i) 0 y (ii) 12,5 U mL<sup>-1</sup> de Arthus, y preparadas con 50 mg mL<sup>-1</sup> de BSA-PG en la TL después de analizar (iii) 0 y (iv) 12,5 U mL<sup>-1</sup> de Arthus. (B) Comparativa de las señales normalizadas después de analizar 0 y 12,5 U mL<sup>-1</sup> de Arthus con las tiras funcionalizadas con 30 y 50 mg mL<sup>-1</sup> de BSA-PG en la TL.

Una vez optimizada la concentración de antígeno en la TL, se realizó una curva de calibrado con diluciones seriadas de Arthus. En la **Figura 16A** se puede observar como la CL muestra una señal constante y elevada en todas las tiras, lo que indica que el ensayo se ha realizado correctamente. Por su parte, la intensidad de señal incrementa gradualmente en la TL conforme se analizan concentraciones crecientes de Arthus. El límite de detección visual es de 6.25 U mL<sup>-1</sup>. Los valores de intensidad de señal en la TL se representaron frente a la concentración de Arthus (**Figura 16B**) y se realizó un ajuste logístico de 4 parámetros con el fin de determinar los parámetros analíticos del ensayo (**Tabla 4**).

**Tabla 4. Parámetros analíticos de la curva de calibrado LFIA.** Límite de detección (LoD), Límite de cuantificación (LoQ), Pendiente (Hillslope), Rango dinámico de trabajo (DLR) y Coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>).

LoD (U mL <sup>-1</sup> )	LoQ (U mL <sup>-1</sup> )	Hillslope	DLR (U mL <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
0.94	0.94	1.69	2.02 – 14.25	0.98

El límite de detección y cuantificación del ensayo es de  $0.94 \text{ U mL}^{-1}$ , lo cual considerando la Tabla RAST (**Tabla 2**), permite diagnosticar a pacientes de clase 2, con niveles intermedios de h-IgE específicas a PG. Por su parte, el rango dinámico de trabajo del ensayo va de 2 a  $14 \text{ U mL}^{-1}$ , lo que indica que el método desarrollado permite cuantificar niveles de h-IgE específicas a PG que se encuentren dentro de este rango, permitiendo el diagnóstico rápido en tan solo 10 minutos de pacientes de clase 2 a 6, mediante la dilución adecuada del suero. A pesar de que este resultado es muy prometedor, el objetivo del trabajo es desarrollar un método que permita el diagnóstico diferencial de pacientes no alérgicos a PG ( $> 0.35 \text{ U mL}^{-1}$ ) de pacientes alérgicos a PG de clase 1, con niveles bajos de H-IgE específicas a PG ( $0.35\text{-}0.70 \text{ U mL}^{-1}$ ). Por este motivo, se planteó cambiar el sistema de transducción de señal colorimétrico basado en nanopartículas de oro (AuNPs) por carbono (CNPs), las cuales proporcionan una señal negra en la TL y CL que se distingue mejor del color blanco de la nitrocelulosa, por lo que permite apreciar señales relacionadas con concentraciones más bajas de analito.



**Figura 16** **Ensayo de Lateral Flow (LFIA).** (A) Imagen de las tiras reactivas después de realizar el ensayo para la detección de (izquierda a derecha: 0, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5 y  $25 \text{ U mL}^{-1}$ ) de Arthus. (B) Curva de calibrado representando la intensidad de señal de la TL de las tiras frente a la concentración de Arthus ( $n=3$ ).

#### 4.5. Desarrollo de LFIA con Nanopartículas de Carbono

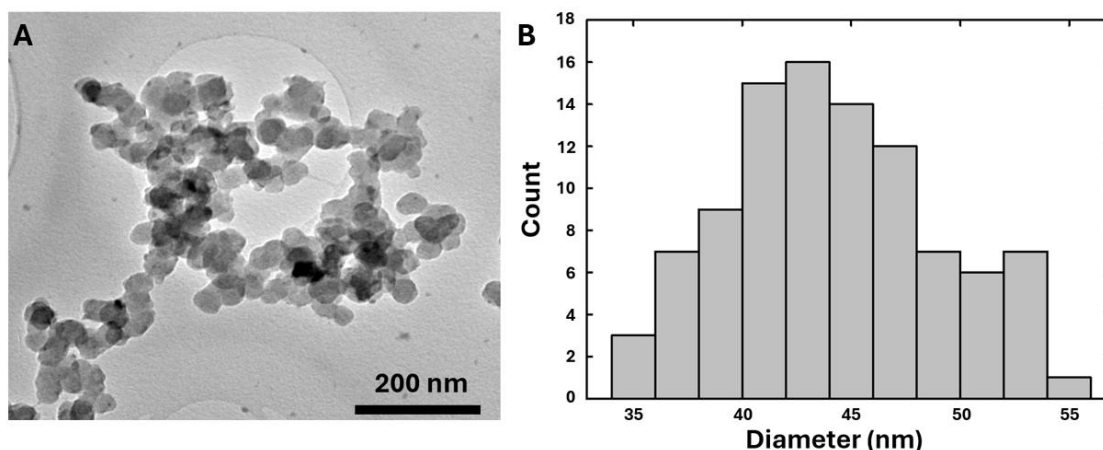
Las nanopartículas de carbono (CNPs) son conocidas por sus excelentes propiedades ópticas, lo que las hace ideales para aplicaciones en biosensores. Ya se han aplicado a LFIA como estrategia para mejorar la sensibilidad analítica de ensayos para la detección de antibióticos en leche (Willemsen et al., 2022) pesticidas (Willemsen et al., 2022) y bacterias fecales en agua (Porrás et al., 2021), demostrando ser capaces de reducir el límite de detección del ensayo en comparación a las nanopartículas de oro. Por ello, se ha decidido explorar el uso de las CNPs en este trabajo, con el fin de mejorar la sensibilidad analítica del ensayo. Para ello, primeramente, se han preparado las CNPs, se han conjugado y se han caracterizado.

##### 4.5.1. Caracterización de las nanopartículas de carbono.

Para comenzar, se caracterizaron las CNPs mediante TEM. Se observa en la **Figura 17A** la morfología de las CNPs es irregular y tienden a agregarse. Se agregan porque, a diferencia de las AuNPs que tienen una capa de citrato que actúa como estabilizante, las CNPs no tienen dicha capa y por lo tanto se agregan entre sí, generando una conformación de nanopartículas aglomeradas que se denominan nanopartículas de carbono amorfo (ACNPs). Las ACNPs no son monodispersas y no presentan una estructura de pared (Yahya et al., 2020), esto genera una complejidad a la hora de conjugadas a los anticuerpos, ya que hay que estar sonicándolas constantemente para favorecer su

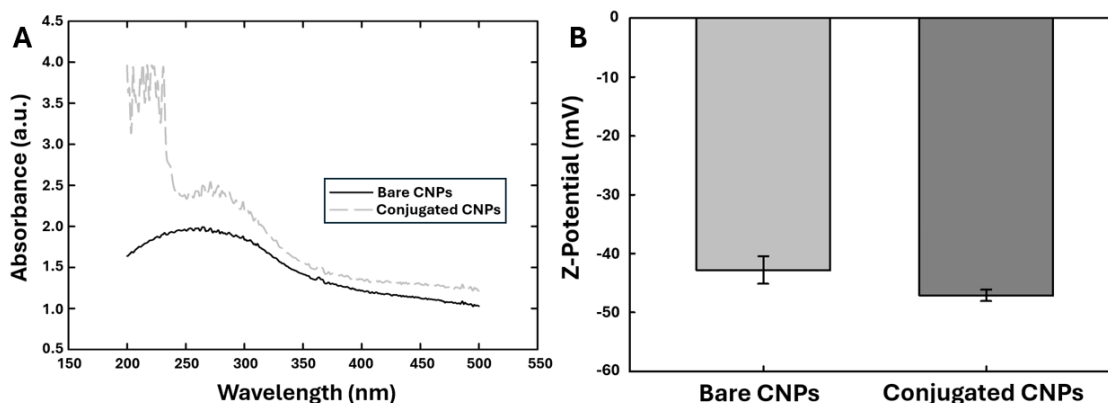


dispersión. En cuanto a la distribución de los diámetros de las nanopartículas (**Figura 17B**) presentan una media de  $44.9 \pm 5.6 \mu\text{m}$ , por lo que son más grandes que las AuNPs.



**Figura 17. Caracterización de las nanopartículas de carbono (CNPs) mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM).** (A) Imagen de las CNPs tomada con el TEM (escala 200 nm). (B) Histograma del diámetro de las CNPs ( $n=100$ ).

Se analizó el espectro de absorción de las CNPs y su conjugado en el intervalo de 250-700nm (**Figura 18A**). Las CNPs presentan un pico de absorción a 265 nm relacionado con la transición  $\pi-\pi^*$  de los enlaces C=C y la transición  $n-\pi^*$  de los enlaces C=O. La intensidad del pico es proporcional a la cantidad de nanopartículas de carbono en la suspensión. El cambio del pico de 265 a 271 nm y el aumento de la absorción a 280 nm confirmaron la bioconjugación de las CNPs con el anticuerpo anti-IgE. Respecto al potencial zeta (**Figura 18B**), se evidencia como las CNPs no conjugadas tenía el valor de  $-43 \pm 2 \text{ mV}$ , mientras que las conjugadas era de  $47 \pm 1 \text{ mV}$ , indicativo de que la conjugación con los anticuerpos y la BSA había sido efectiva, otorgándoles además una configuración más estable.

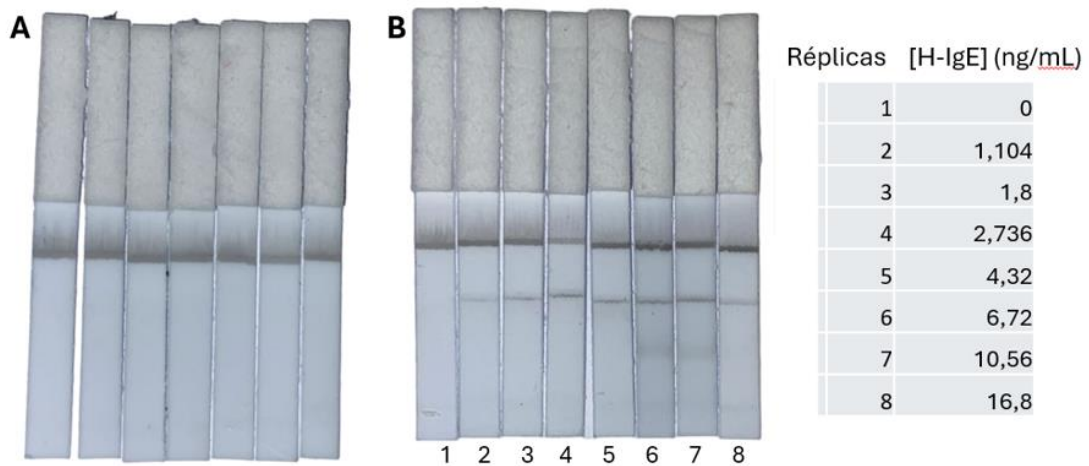


**Figura 18. Estudio de las nanopartículas conjugadas y sin conjugar.** (A) Espectros de absorción UV-Vis de nanopartículas de carbono no conjugadas (línea negra) (pico a 265 nm) y nanopartículas de carbono conjugadas (línea negra discontinua) (pico 271 nm). Los espectros exhiben un desplazamiento en el pico máximo de absorción. (B) Distribución del potencial Zeta (mV) de CNPs sin conjugar y conjugadas.

#### 4.5.2. Desarrollo y optimización de LFIA con CNPs.

El desarrollo del LFIA basado en CNPs se realizó directamente con el suero del paciente diagnosticado como alérgico a PG, que se usó en los ensayos ELISA del apartado 4.2. Con el fin de determinar la contribución de los diferentes componentes del suero en la generación de la señal analítica en la TL, primeramente, se deplecionó el suero con una columna de afinidad, con el fin de separar las IgGs de las IgEs y demás componentes del suero. Esta columna contiene un gel de

sefarosa con proteína G, la cual reconoce de manera específica la parte constante de las IgGs. Por lo tanto, al pasar el suero por esa columna, se retienen las IgGs y se eluyen las IgEs y demás proteínas del suero. Luego, al introducir en la columna un agente caotrópico como la glicina, que rompe la unión entre las IgGs y la proteína G, se recuperan las IgGs. Al interrogar las tiras de LFIA con diluciones seriadas de las IgGs recuperadas del suero, se observó que no se generaba una señal colorimétrica en la TL, pero sí en la CL (**Figura 19A**). Esto indicó que IgGs no se unen de manera específica a la TL, lo cual es el primer paso para aclarar que la señal generada en la TL al evaluar una muestra de suero proviene únicamente por las IgEs específicas de PG. Seguidamente, se purificó el suero eluido de la columna con filtros de exclusión molecular de 100 KDa, con el fin de eliminar las albúminas y demás proteínas del suero con un peso molecular menor a 100 KDa. La solución retenida en la columna de exclusión molecular contenía IgEs totales (específicas y no específicas). Se interrogó las tiras con diluciones seriadas de dicha solución y se observó una señal elevada y constante en la CL y un incremento gradual de señal en la TL conforme se detectó concentraciones crecientes de IgEs (**Figura 19B**). La intensidad de señal en la TL de dichas tiras se analizó con Image J y se representó frente a la concentración de IgE específicas a PG.

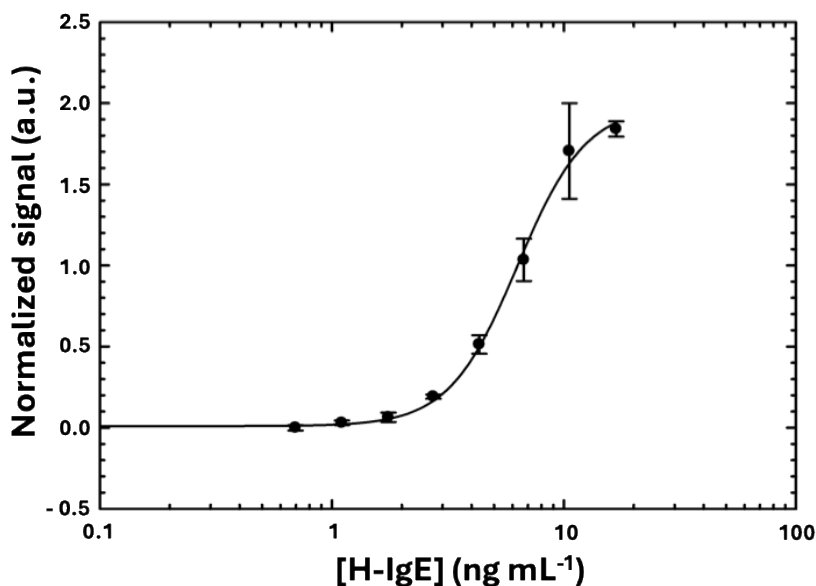


**Figura 19.** Imagen de tiras reactivas con nanopartículas de carbono (CNPs) (A) Ensayo con IgG (B) Ensayo con IgE obtenidas del suero de un paciente diagnosticado como alérgico a PG mediante el método ImmunoCAP.

La concentración es aproximada y se calculó asumiendo la concentración inicial de IgEs del suero (determinada por ImmunoCAP (sección 4.2)) y la concentración final una vez pasado el suero por la columna de afinidad y de exclusión molecular, considerando los factores de concentración pertinentes. La concentración en  $U\ mL^{-1}$  se corrigió a  $ng\ mL^{-1}$  considerando el factor 2.4 ( $1\ U\ mL^{-1}$  equivale a  $2.4\ ng\ mL^{-1}$ ) (Quintero-Campos et al., 2022). Se observó que el límite de detección visual es de  $1.1\ ng\ mL^{-1}$  de IgEs específicas de PG, lo cual es un gran resultado considerando que los ensayos LFIA convencionales, sin amplificación de señal ni etapas de pre-concentración de la muestra, reportan límites de detección visuales mayores a  $10\ ng\ mL^{-1}$  de analito diana (Sena-Torralba et al., 2022). Esta concentración corresponde con  $2.64\ U\ mL^{-1}$  de IgEs, la cual es 2.36-veces menor a la obtenida con AuNPs ( $6.25\ U\ mL^{-1}$ ). Se realizó un ajuste logístico de 4 parámetros y se determinaron los parámetros analíticos del ensayo. La curva de calibrado exhibe una tendencia ascendente, lo que indica que la señal aumenta con la concentración de IgE hasta alcanzar una meseta (**Figura** ). Este comportamiento sugiere una relación de saturación entre la concentración de IgE y la señal detectada por las tiras reactivas. Además, muestra que el hapteno conjugado (BSA-PG) tiene afinidad por las IgEs específica de alergia. Los puntos de la gráfica muestran variabilidad en las señales obtenidas, lo cual es esperado en ensayos biológicos y puede reflejar diferencias en cuanto a la unión de IgE a los sitios específicos en la Test Line.

**Tabla 5. Parámetros analíticos de la curva de calibrado LFIA con CNPs.** Límite de detección (LoD), Límite de cuantificación (LoQ), Pendiente (Hillslope), Rango dinámico de trabajo (DLR) y Coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>).

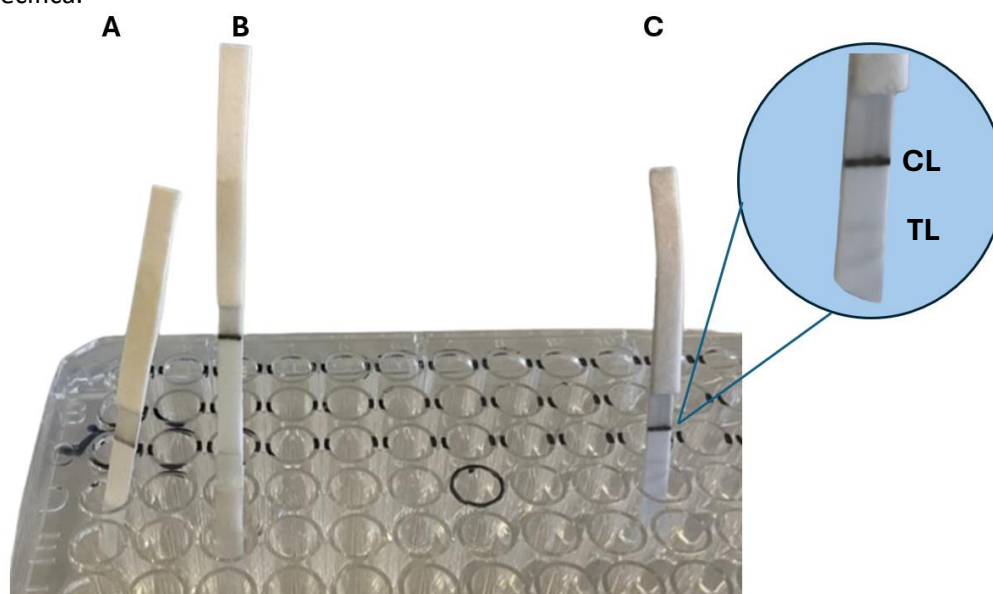
LoD (ng mL <sup>-1</sup> )	LoQ (ng mL <sup>-1</sup> )	Hillslope	DLR (ng mL <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
1.96	3.35	2.94	2.85 – 10.91	0.99



**Figura 20. Curva de calibrado con Lateral Flow Immunoassay (LFIA) basado en nanopartículas de carbono (CNPs) para la detección de 0.69, 1.10, 1.75, 2.73, 4.32, 6.72, 10.56 y 16.8 ng mL<sup>-1</sup> de IgEs humana específicas de PG recuperadas del suero de un paciente diagnosticado como alérgico a PG con ImmunoCAP.**

Sin embargo, a pesar de que las señales de la TL con las CNPs se observan mejor con el ojo humano que con las AuNPs, favoreciendo un mejor LoD visual, no se obtuvo una mejora significativa en el límite de detección y cuantificación (**Tabla 5**) comparado con el ensayo con las AuNPs (**Tabla 4**). Esto puede deberse a que el ensayo con AuNPs se hizo con Arthus, que es un producto comercial de IgEs específicas de PG, mientras que el ensayo de CNPs se realizó con una solución de IgEs totales (específicas y no específicas) recuperado del suero. Por lo tanto, se determinó que las IgEs no específicas estaban interfiriendo en el ensayo, reduciendo significativamente la sensibilidad analítica. A raíz de este resultado, como no hay manera de separar por exclusión molecular IgEs específicas de PG de IgEs no específicas, se propuso dopar estas IgEs en el suero de un paciente diagnosticado como no alérgico a PG (determinado por ImmunoCAP). Se realizó un ensayo interrogando las tiras reactivas con diluciones seriadas de las IgEs en el suero del paciente y se observó que en ninguna tira se generaba señal analítica en la TL. Por lo que se confirmó que las IgEs no específicas del suero del paciente generaban un efecto matriz que evitaba el reconocimiento de las IgEs específicas a PG por parte del anticuerpo anti-IgE conjugado a las CNPs. Se concluyó que al igual que el método ELISA e ImmunoCAP, el LFIA requiere de etapas de incubación y lavado con el fin de capturar las IgEs específicas en la TL y eliminar las no específicas de la zona de detección de la tira.

Con el fin de intentar reducir este tipo de problema se planteó la realización de distintas etapas de ensayo en LFIA, eliminando la almohadilla de conjugación y usando una almohadilla de absorción con mayor capacidad de absorción de volumen. En este formato, se adicionaba en primer lugar la muestra, luego se limpiaba con borato 5 mM y, por último, las CNP con el anticuerpo anti-IgE (**Figura 21A**). También se probó realizar LFIA convencional, pero la almohadilla de absorción era más larga para mejorar la fluídica (**Figura 21B**). Por último, se probó un formato similar al primero, pero en distintos pocillos. Este método implicaba la adición secuencial de la muestra, el lavado y las CNP funcionalizadas en pocillos separados, con el objetivo de mejorar el control sobre cada paso del ensayo y minimizar las interferencias (**Figura 21C**). El formato más efectivo demostró ser el último (**Figura 21C**), proporcionando una señal baja en la TL, pero nítida con mínima interferencia de IgEs no específica.



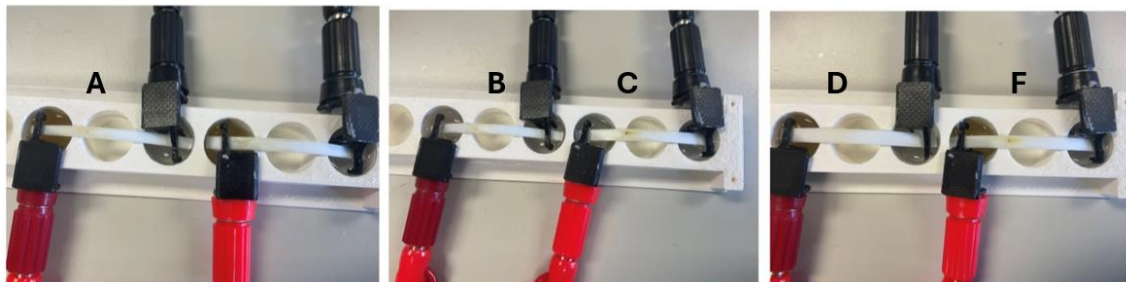
**Figura 21. Diferentes formatos de ensayo Lateral Flow (LFIA) con nanopartículas de carbono (CNP).** (A) Ensayo sin conjugated pad en el mismo pocillo: muestra, lavado con borato 5 mM, y CNP con anticuerpo anti-IgE. (B) Ensayo LFIA convencional con absorption pad más larga para mejorar la fluídica. (C) Ensayo en pocillos separados: adición secuencial de muestra, lavado, y CNP funcionalizadas para mejorar el control y minimizar interferencias.

Con este ajuste, se observó que había algo de señal, lo que indica que el problema podría estar relacionado con la presencia de IgEs no específicas. Sin embargo, aunque se mejoró la señal, no se logró eliminar completamente las IgEs no específicas. Dada esta situación, se propone el uso de la electroforesis como una técnica adicional. La electroforesis permitiría separar las IgEs específicas de las no específicas de manera más efectiva, mejorando la pureza de la muestra antes de realizar el ensayo de LFIA.

#### 4.6. Desarrollo y Optimización de LFIA Electroforético

El ensayo de flujo lateral (LFIA) es una técnica rápida y sencilla. No obstante, cuando se exige una detección de alta sensibilidad, como puede ser este caso donde se requiere detectar alrededor de  $0,35 \text{ U mL}^{-1}$ , los métodos convencionales de LFIA pueden no ser suficientes. Para superar esta limitación, hemos optado por acoplar el LFIA con la electroforesis, pues puede implementar a la LFIA una mejora en la sensibilidad y especificidad del ensayo. La electroforesis puede resultar beneficioso su aplicación en este tipo de ensayo, pues es capaz de concentrar los analitos en la Test Line del LFIA, permitiendo una mejor sensibilidad del ensayo. Así como una aplicación de un campo eléctrico puede mejorar el flujo y distribución de las muestras, asegurando una mejor interacción entre las moléculas (Sena-Torralba et al., 2023).

Utilizando el equipo y materiales indicados en el apartado 3.3.7. (**Figura 7**) se realizó los siguientes ensayos: Para la optimización, se comenzó a probar diferentes concentraciones de Tween-20% (0,05%; 0,1%, 0,5%; 0,7% y 1%) (**Figura 22**) a 200 Voltios (V). La concentración de 1% (**Figura 22D**) mostró ser la mejor en términos de evitar la formación de manchas amarillas; indicativas de agregación o precipitación de proteínas. Sin embargo, una concentración del 1% no es adecuada para aun inmunoensayo, ya que el Tween es un surfactante que puede afectar a la conformación de las proteínas. Por lo tanto, se decidió reducir la concentración de Tween a 0,1% y utilizar un menor voltaje para verificar si se podía evitar esta precipitación bajo estas condiciones.



**Figura 22.** Ensayo de LFIA acoplado a electroforesis probando distintas concentraciones de Tween-20: (A) 0,01%; (B) 0,5%; (C) 0,1%; (D) 1%; (F) 0,7%.

Se probaron voltajes de 200V, 150V y 100V para determinar el voltaje óptimo que permitiera un buen flujo electroforético sobre la tira reactiva sin causar precipitación de proteínas. En la **Figura 23** se observa como el voltaje de 200V es demasiado agresivo, ya que puede provocar la precipitación de las proteínas e incluso la rápida evaporación de la disolución, generando una gran resistencia que puede romper la tira reactiva. Por otro lado, a un voltaje de 150V, aunque los cambios en la tira no son apreciables en la foto, cerca del ánodo se visualiza una ligera mancha amarilla y un levantamiento mínimo de los laterales de la tira, indicando que comenzaba a romperse. Finalmente, en la **Figura 23A**, se muestra la aplicación de un voltaje de 100V, el cual resultó prometedor. A simple vista, no presentaba ni agregación de proteínas ni rotura de la tira. El inconveniente fue que los tiempos de incubación y lavado tuvieron que extenderse para permitir que toda la muestra pasara y posteriormente se limpiara adecuadamente.



**Figura 23.** Ensayo de LFIA acoplado a electroforesis probando distintos voltajes (V): (A) 100 V; (B) 150 V; (C) 200 V.

En resumen, se encontró que una concentración de 0,1% de Tween a un voltaje más bajo evitaba la precipitación de proteínas y mantenía la integridad de las proteínas necesarias. El voltaje de 100V proporcionó un buen equilibrio entre el flujo capilar y la integridad de las proteínas. Por último, un tiempo de lavado de 30 minutos fue suficiente para asegurar un buen flujo de la muestra sin causar degradación de las proteínas ni desgaste de la tira reactiva.

La electroforesis con sueros presenta ciertas limitaciones debido a la complejidad y la alta concentración de proteínas presentes en este tipo de muestra. A pesar de los esfuerzos iniciales para evitar la agregación de proteínas en la tira reactiva, se observaron ciertos desafíos persistentes. Se realizaron diluciones de 1/10, 1/30 e incluso 1/104 para intentar reducir la concentración de proteínas y minimizar la agregación. La dilución 1/10 no fue suficiente para evitar la agregación, mientras que la dilución 1/104 mostró una señal demasiado débil. Además, se redujo la concentración de Tween del 0,1% al 0,05%, e incluso se cambió el voltaje de 100V a 200V. Sin embargo, se observó que un voltaje más alto aumentaba el riesgo de agregación de proteínas. A pesar de estos ajustes, las proteínas del suero seguían mostrando tendencia a agregarse en la tira reactiva, comprometiendo severamente los resultados de la LFIA.

## 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El presente Trabajo Fin de Grado sobre el desarrollo de métodos de diagnóstico para alergias a antibióticos beta-lactámicos presenta un avance significativo hacia soluciones más eficientes y accesibles para los pacientes. Actualmente, la complejidad del diagnóstico de estas alergias marca la necesidad urgente de alternativas fiables y rápidas. En este trabajo, se ha propuesto una innovadora metodología consistente en la combinación de pruebas de flujo lateral acopladas a electroforesis, una tecnología prometedora, aunque aún desafiante en su desarrollo y optimización. El enfoque de este estudio ha sido la conjugación de penicilina G con albúmina sérica bovina para su inmovilización en la línea de prueba en tiras de Lateral Flow (LFIA), utilizando nanopartículas de oro (AuNPs) y posteriormente explorando nanopartículas de carbono (CNP) como alternativa. La caracterización de estos conjugados ha demostrado especificidad, contrastada mediante técnicas como ELISA para la detección de IgE humana específica para Penicilina G.

El desarrollo y optimización de LFIA con AuNPs y posteriormente con CNPs representan avances significativos hacia métodos diagnósticos más rápidos y accesibles. Las CNPs mostraron potencial para mejorar la sensibilidad del ensayo LFIA, superando limitaciones observadas con AuNPs.

La combinación de LFIA con electroforesis representa un avance prometedor para mejorar la sensibilidad y la capacidad diagnóstica frente al resto de ensayos inmunológicos (**Tabla 6**), ya que permite un uso rápido por el propio paciente. Aunque afronta desafíos significativos en términos de optimización y escalabilidad. Por ello, el equipo del laboratorio continua con las investigaciones relacionadas con el diseño experimental con el objetivo de potenciar su utilidad en diagnósticos rápidos y aplicaciones biomédicas.

**Tabla 6. Resumen y comparación de los distintos ensayos inmunológicos** (Juárez Rodríguez, 2022)

	DISCO COMPACTO	ELISA	RAST	IMMUNOCAP	LFIA CON AUNPS	LFIA CON CNPS
<b>TIPO DE ENSAYO</b>	Multiplex, basado en microarrays	Inmunoensayo enzimático	Inmunoensayo enzimático	Inmunoensayo enzimático fluorescente	Inmunoensayo de flujo lateral con nanopartículas de oro	Inmunoensayo de flujo lateral con nanopartículas de carbono
<b>TIEMPO</b>	2-4 horas	2-4 horas	2-4 horas	1-2 horas	10 minutos	10 minutos
<b>COSTE ESTIMADO</b>	Alto-Medio	Alto-Medio	Medio	Alto-Medio	Bajo	Bajo
<b>LÍMITE DE DETECCIÓN</b>	0.1-1 ng/mL	0.1-1 ng/mL	1-10 ng/mL	0.24-0.84 ng/mL	2,26 ng/mL	1,96 ng/mL

## 6. REFERENCIAS

- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, 1(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
- Andryukov, B. G. (2020). Six decades of lateral flow immunoassay: From determining metabolic markers to diagnosing covid-19. In *AIMS Microbiology* (Vol. 6, Issue 3, pp. 280–304). AIMS Press. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020018>
- Bahadır, E. B., & Sezgintürk, M. K. (2016). Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 82, 286–306. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2016.06.006>
- Blumenthal, K. G., Peter, J. G., Trubiano, J. A., & Phillips, E. J. (2019). Antibiotic allergy. In *The Lancet* (Vol. 393, Issue 10167, pp. 183–198). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32218-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32218-9)
- Bouvy, J. C., De Bruin, M. L., & Koopmanschap, M. A. (2015). Epidemiology of adverse drug reactions in Europe: a review of recent observational studies. *Drug Safety*, 38(5), 437–453. <https://doi.org/10.1007/S40264-015-0281-0>
- Broyles, A. D., Banerji, A., & Castells, M. (2020). Practical Guidance for the Evaluation and Management of Drug Hypersensitivity: General Concepts. In *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* (Vol. 8, Issue 9, pp. S3–S15). American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.08.002>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016).  $\beta$ -lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>
- Chan, S. C. W., Yeung, W. W. Y., Wong, J. C. Y., Chui, E. S. H., Lee, M. S. H., Chung, H. Y., Cheung, T. T., Lau, C. S., & Li, P. H. (2020). Prevalence and Impact of Reported Drug Allergies among Rheumatology Patients. *Diagnostics 2020, Vol. 10, Page 918, 10(11)*, 918. <https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS10110918>
- Chiriac, A. M., Banerji, A., Gruchalla, R. S., Thong, B. Y. H., Wickner, P., Mertes, P. M., Terreehorst, I., & Blumenthal, K. G. (2019). Controversies in Drug Allergy: Drug Allergy Pathways. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 7(1), 46-60.e4. <https://doi.org/10.1016/J.JAIP.2018.07.037>
- Choi, J. R., Yong, K. W., Choi, J. Y., & Cowie, A. C. (2019). *Emerging Point-of-care Technologies for Food Safety Analysis*. <https://doi.org/10.3390/s19040817>
- Clardy, J., Fischbach, M. A., & Currie, C. R. (2009). The natural history of antibiotics. In *Current Biology* (Vol. 19, Issue 11). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.04.001>
- Del Pozzo-Magaña, B. R., & Liy-Wong, C. (2022). Drugs and the skin: A concise review of cutaneous adverse drug reactions. *British Journal of Clinical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/BCP.15490>
- Di Nardo, F., Chiarello, M., Cavalera, S., Baggiani, C., & Anfossi, L. (2021). Ten Years of Lateral Flow Immunoassay Technique Applications: Trends, Challenges and Future Perspectives. *Sensors 2021, Vol. 21, Page 5185, 21(15)*, 5185. <https://doi.org/10.3390/S21155185>
- Doña, I., Labella, M., Bogas, G., Sáenz de Santa María, R., Salas, M., Ariza, A., & Torres, M. J. (2022). Antibiotic Allergy De-Labeling: A Pathway against Antibiotic Resistance. In *Antibiotics* (Vol. 11, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081055>
- Doña, I., Torres, M. J., Montañez, M. I., & Fernández, T. D. (2017). In Vitro Diagnostic Testing for Antibiotic Allergy. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 9(4), 288–298. <https://doi.org/10.4168/AAIR.2017.9.4.288>
- Esteban Jiménez, Ó., Navarro Pemán, C., González Rubio, F., Lanuza Giménez, F. J., & Montesa Lou, C. (2017). Análisis de la incidencia y de las características clínicas de las reacciones adversas a medicamentos de uso humano en el medio hospitalario. *Revista Espanola de Salud Publica*, 91. [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1135-57272017000100424&lng=es&nrm=iso&tlng=es](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272017000100424&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

- Gomes, E. R., & Kuyucu, S. (2017). Epidemiology and Risk Factors in Drug Hypersensitivity Reactions. In *Current Treatment Options in Allergy* (Vol. 4, Issue 2, pp. 239–257). Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/s40521-017-0128-2>
- González-Gregori, R., Hernández Fernandez De Rojas, M. D., López-Salgueiro, R., Díaz-Palacios, M., & García, A. N. (2012). Allergy alerts in electronic health records for hospitalized patients. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, *109*(2), 137–140. <https://doi.org/10.1016/J.ANAI.2012.06.006>
- Han, J. E., Ye, Y. M., & Lee, S. (2018). Epidemiology of drug hypersensitivity reactions using 6-year national health insurance claim data from Korea. *International Journal of Clinical Pharmacy*, *40*(5), 1359–1371. <https://doi.org/10.1007/s11096-018-0625-9>
- Informe sobre sospechas de reacciones adversas notificadas a medicamentos de uso humano o acontecimientos adversos ocurridos después de la vacunación. (2019, June 20). Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. <https://www.aemps.gob.es/medicamentos-de-uso-humano/farmacovigilancia-de-medicamentos-de-uso-humano/informacion-de-sospechas-de-reacciones-adversas-a-medicamentos-de-uso-humano/informacion/>
- Juárez Rodríguez, M. J. (2022). *Metodologías bioanalíticas para el diagnóstico in vitro de alergia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos* [Universitat Politècnica de València]. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/184011>
- Koczula, K. M., & Gallotta, A. (2016). Lateral flow assays. *Essays in Biochemistry*, *60*(1), 111. <https://doi.org/10.1042/EBC20150012>
- Maciej Serda, Becker, F. G., Cleary, M., Team, R. M., Holtermann, H., The, D., Agenda, N., Science, P., Sk, S. K., Hinnebusch, R., Hinnebusch A, R., Rabinovich, I., Olmert, Y., Uld, D. Q. G. L. Q., Ri, W. K. H. U., Lq, V., Frxqwu, W. K. H., Zklfk, E., Edvhg, L. V, ... ح فاطمی. (2013). Synteza i aktywność biologiczna nowych analogów tiosemikarbazonowych chelatorów żelaza. *Uniwersytet Śląski*, *7*(1), 343–354. <https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS>
- Maker, J. H., Stroup, C. M., Huang, V., & James, S. F. (2019a). Antibiotic Hypersensitivity Mechanisms. *Pharmacy*, *7*(3), 122. <https://doi.org/10.3390/pharmacy7030122>
- Oliveira, A. E. F., Pereira, A. C., Resende, M. A. C., & Ferreira, L. F. (2023). Gold Nanoparticles: A Didactic Step-by-Step of the Synthesis Using the Turkevich Method, Mechanisms, and Characterizations. *Analytica*, *4*(2), 250–263. <https://doi.org/10.3390/analytica4020020>
- Panferov, V. G., Ivanov, N. A., Mazzulli, T., Brinc, D., Kulasingam, V., & Krylov, S. N. (2023). Electrophoresis-Assisted Multilayer Assembly of Nanoparticles for Sensitive Lateral Flow Immunoassay\*\*. *Angewandte Chemie International Edition*, *62*(2), e202215548. <https://doi.org/10.1002/ANIE.202215548>
- Parolo, C., & Merkoçi, A. (2012). Paper-based nanobiosensors for diagnostics. *Chemical Society Reviews*, *42*(2), 450–457. <https://doi.org/10.1039/C2CS35255A>
- Parolo, C., Sena-Torralba, A., Bergua, J. F., Calucho, E., Fuentes-Chust, C., Hu, L., Rivas, L., Álvarez-Diduk, R., Nguyen, E. P., Cinti, S., Quesada-González, D., & Merkoçi, A. (2020). Tutorial: design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays. *Nature Protocols* *2020* *15*:12, *15*(12), 3788–3816. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0357-x>
- Porrás, J. C., Bernuz, M., Marfa, J., Pallares-rusiñol, A., Martí, M., & Pividori, M. I. (2021). Comparative Study of Gold and Carbon Nanoparticles in Nucleic Acid Lateral Flow Assay. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, *11*(3), 1–11. <https://doi.org/10.3390/NANO11030741>
- Preechakasedkit, P., Teekayupak, K., Citterio, D., & Ruecha, N. (2022). Improvement in sensitivity for lateral flow immunoassay of ferritin using novel device design based on gold-enhanced gold nanoparticles. *Scientific Reports* *2022* *12*:1, *12*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11732-5>
- Quintero-Campos, P., Segovia-de los Santos, P., Ibáñez-Echevarría, E., Hernández-Fernández de Rojas, D., Casino, P., Lassabe, G., González-Sapienza, G., Maquieira, Á., & Morais, S. (2022). An ultra-sensitive homologous chemiluminescence immunoassay to tackle penicillin allergy. *Analytica Chimica Acta*, *1214*, 339940. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2022.339940>



- Sena-Torralba, A., Álvarez-Diduk, R., Parolo, C., Piper, A., & Merkoçi, A. (2022). Toward Next Generation Lateral Flow Assays: Integration of Nanomaterials. *Chemical Reviews*, 122(18), 14881–14910. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.1C01012>/ASSET/IMAGES/LARGE/CR1C01012\_0014.JPEG
- Sena-Torralba, A., Banguera-Ordoñez, Y. D., Mira-Pascual, L., Maquieira, Á., & Morais, S. (2023). Exploring the potential of paper-based electrokinetic phenomena in PoC biosensing. *Trends in Biotechnology*, 41(10), 1299–1313. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2023.04.004>
- Song, W., Chen, W., Cooper, W. J., Greaves, J., & Miller, G. E. (2008). Free-Radical Destruction of  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Aqueous Solution. *Journal of Physical Chemistry A*, 112(32), 7411–7417. <https://doi.org/10.1021/JP803229A>
- Thong, B. Y. H., & Tan, T. C. (2011). Epidemiology and risk factors for drug allergy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 71(5), 684–700. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2125.2010.03774.X>
- Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11(0), 55–75. <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>
- van Hage, M., Hamsten, C., & Valenta, R. (2017). ImmunoCAP assays: Pros and cons in allergology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(4), 974–977. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2017.05.008>
- Willemsen, L., Wichers, J., Xu, M., Van Hoof, R., Van Dooremalen, C., Van Amerongen, A., & Peters, J. (2022). Biosensing Chlorpyrifos in Environmental Water Samples by a Newly Developed Carbon Nanoparticle-Based Indirect Lateral Flow Assay. *Biosensors*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/BIOS12090735>
- World Health Organization. Quality Assurance. (2002). Safety of medicines : a guide to detecting and reporting adverse drug reactions : why health professionals need to take action. World Health Organization.
- Yahya, N., Ali, A. M., Wahaab, F. A., & Sikiru, S. (2020). Spectroscopic analysis of the adsorption of carbon based nanoparticles on reservoir sandstones. *Journal of Materials Research and Technology*, 9(3), 4326–4339. <https://doi.org/10.1016/J.JMRT.2020.02.058>
- Zhao, Z., Batley, M., D'Ambrosio, C., & Baldo, B. A. (2000). In vitro reactivity of penicilloyl and penicillanyl albumin and polylysine conjugates with IgE-antibody. *Journal of Immunological Methods*, 242(1–2), 43–51. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00213-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00213-1)
- Zhou, L., Dhopeswarkar, N., Blumenthal, K. G., Goss, F., Topaz, M., Slight, S. P., & Bates, D. W. (2016). Drug allergies documented in electronic health records of a large healthcare system. *Allergy*, 71(9), 1305–1313. <https://doi.org/10.1111/ALL.12881>

# Anejo I. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030 Anexo al Trabajo de Final de Grado

A. Indicar el grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

	Alto	Medio	Bajo	No procede
<b>ODS 1. Fin de la pobreza</b>				X
<b>ODS 2. Hambre cero</b>				X
<b>ODS 3. Salud y bienestar</b>	X			
<b>ODS 4. Educación de calidad</b>				X
<b>ODS 5. Igualdad de género</b>				X
<b>ODS 6. Agua limpia y saneamiento</b>				X
<b>ODS 7. Energía asequible y no contaminante</b>				X
<b>ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico</b>				X
<b>ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras</b>			X	
<b>ODS 10. Reducción de las desigualdades</b>				X
<b>ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles</b>				X
<b>ODS 12. Producción y consumo responsables</b>				X
<b>ODS 13. Acción por el clima</b>				X
<b>ODS 14. Vida submarina</b>				X
<b>ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres</b>				X
<b>ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas</b>				X
<b>ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.</b>				X

B. Describir brevemente la alineación del TFG con los ODS, marcados en la tabla anterior, con un grado alto.

El desarrollo de un biosensor basado en LFIA acoplado a electroforesis para la detección de alergias a antibióticos beta lactámicos contribuye directamente a mejorar la salud y el bienestar de las personas. Este método de diagnóstico innovador permite una identificación más precisa y rápida de las alergias, mejorando así la gestión clínica y reduciendo riesgos asociados a reacciones adversas.