



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Agronómica y del Medio Natural

Síntesis y caracterización de reactivos para el diagnóstico de alergia a amoxicilina

TRABAJO FINAL DE GRADO

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA
CURSO 2014-2015

Alumna: Anda Gabriela Marsavela
Tutor: Prof. Dr. Luis Antonio Tortajada Genaro
Cotutor: Prof. Dr. Sergi Beñat Morais Ezquerro

Valencia, Noviembre 2014



Licencia Creative Commons – Reconocimiento/NoComercial/SinObraDerivada

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE REACTIVOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ALERGIA A AMOXICILINA

Alumna: Anda Gabriela Marsavela

Tutor: Prof. Dr. Luis Antonio Tortajada Genaro

Cotutor: Prof. Dr. Sergi Beñat Morais Ezquerro

ABSTRACT

Amoxicillin is the beta-lactam antibiotic most frequently involved in allergic reactions to pharmaceutical drugs. The allergic reactions to this type of antibiotics are known to occur in up to 10 % of patients, being able to cause anaphylaxis and, in some cases even death.

The current diagnostic techniques are based on *in vivo* tests, which are invasive and aggressive for the patients. Hence, the need arises to develop new diagnostic techniques more sensitive that allow to quickly and easily detect the drug responsible for the allergic reaction.

The intention of this project is to contribute to the development of a minimally intrusive *in vitro* assay. The technique is based on the detection and quantification of total and specific IgEs to amoxicillin IgEs using magnetic particles conjugated to anti-IgE antibodies. The reagents used in the assay are synthesized and characterized, establishing the optimal conditions. This methodology uses CD technology, creating a protein microarray with specific drug-protein conjugates for the detection of specific IgEs, and anti-IgE antibodies for total IgEs quantification.

KEY WORDS

Allergy, β -lactams, amoxicillin, magnetic particles, IgEs, microarray.

RESUMEN

La amoxicilina es uno de los antibióticos betalactámicos más frecuentemente implicados en las reacciones alérgicas a fármacos. Las reacciones alérgicas a dicho grupo de antibióticos pueden afectar hasta al 10 % de los pacientes, pudiendo provocar anafilaxis y, en ocasiones, la muerte.

Las técnicas actuales de diagnóstico están basadas en ensayos *in vivo*, invasivos *per se* y agresivos para el paciente. Por ello, existe la necesidad de desarrollar nuevos métodos de diagnóstico más sensibles, que permitan una asignación rápida y sencilla del medicamento causante de la alergia.

Este trabajo pretende contribuir al desarrollo de un ensayo *in vitro* mínimamente invasivo, basado en la detección y cuantificación de IgEs totales y específicas para amoxicilina utilizando partículas magnéticas conjugadas a anticuerpos anti-IgE. Se sintetizan y caracterizan los reactivos utilizados en el ensayo estableciéndose las condiciones óptimas. El método se basa en la tecnología de disco compacto, siguiendo un formato de micromatriz de proteínas utilizando conjugados específicos fármaco-proteína para la detección de IgEs específicas y anticuerpos anti-IgE para la cuantificación de IgEs totales.

PALABRAS CLAVE

Alergia, β -lactámicos, amoxicilina, partículas magnéticas, IgEs, micromatriz.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a Ángel Maquieira y Rosa Puchades por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación. Agradezco de manera especial a Luis A. Tortajada Genaro, tutor del proyecto, por su incalculable paciencia, sus correcciones y su preocupación. Gracias también a Sergi, sus correcciones y consejos han sido de gran ayuda.

Por otro lado, agradezco enormemente la constante ayuda de Salva, su tiempo ha sido muy valioso para mí, he aprendido mucho. Miles de preguntas respondidas, opiniones y buenos consejos otros tantos que me han ayudado a comprender mejor el mundo de la investigación, sus virtudes y sus defectos.

Quisiera agradecer a aquellos que investigaron y a los que seguirán investigando después de mí el tema de la alergia a antibióticos. Espero que este granito de arena haya merecido la pena.

Gracias a todos los miembros del Departamento de Química, por la ayuda que me han ofrecido siempre que la he necesitado. Me he sentido muy cómoda desde el principio y me llevo buenos recuerdos.

Me gustaría agradecer a mi familia y a mi pareja por su apoyo incondicional durante el TFG y durante la carrera. No siempre ha sido fácil, pero con ellos ha sido más llevadero. Gracias a Alejandro, David, Eric y Guillermo, sin vosotros nada hubiese sido igual. Fdo. H ☺

Gracias

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Reacciones adversas a medicamentos	1
1.1.1 Reacciones alérgicas a medicamentos.....	2
1.1.2 Reacciones alérgicas a antibióticos betalactámicos.....	4
1.2 Método de diagnóstico de alergias a penicilinas.....	6
1.2.1 Métodos de diagnóstico <i>in vivo</i>	7
1.2.2 Métodos de diagnóstico <i>in vitro</i>	7
1.3 Métodos de diagnóstico alternativo	9
1.3.1 Determinación de IgEs sanguíneas	9
1.3.2 Biosensores.....	11
1.4 Selección del alérgeno modelo.....	12
1.4.1 Antibióticos betalactámicos.....	12
1.4.2 Amoxicilina	13
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivos generales.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
3.1 Protocolo general.....	15
3.2 Preparación de los conjugados de inmovilización	15
3.2.1 Conjugación de la amoxicilina	15
3.2.2 Purificación de los conjugados	16
3.2.3 Caracterización de los conjugados	17
3.3 Preparación de las partículas magnéticas conjugadas.....	17
3.4 Captura y elución de IgEs mediante partículas magnéticas conjugadas	17
3.5 Medida del extracto de IgEs	18
3.5.1 ELISA.....	18
3.5.2 Cuantificación de IgEs totales mediante disco.....	19
3.5.3 Cuantificación de IgEs totales y específicas a partir de suero pre-tratado utilizando la tecnología de micromatrices de proteínas en disco.....	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1 Obtención de los conjugados de amoxicilina	20
4.1.1 Selección de la proteína portadora	20
4.1.2 Síntesis de los conjugados	21
4.1.3 Caracterización de los conjugados	22
4.2 Inmovilización de los conjugados de amoxicilina en la superficie del disco	24
4.2.1 Optimización del tampón de inmovilización	25
4.2.2 Optimización de la concentración de conjugado	25
4.2.3 Reconocimiento de la inmunoglobulina	27
4.3 Puesta a punto del sistema de captura de IgEs.....	27
4.3.1 Ensayo con muestras séricas.....	27
4.3.2 Síntesis del sistema de captura	28
4.3.3 Ensayos de captura y elución utilizando partículas magnéticas.....	30
4.4 Micromatriz de proteínas.....	30
4.4.1 Diseño.....	30
4.4.2 Selección del anticuerpo de inmovilización.....	31
4.4.3 Ensayo con patrones concentrados con partículas magnéticas	32
5. CONCLUSIONES.....	33
6. BIBLIOGRAFÍA.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia de la alergia a medicamentos. (Alergológica, 2005).	2
Figura 2. Consumo proporcional de antibióticos en el hospital universitario de Bellvitge en un período de 12 meses expresado en dosis diarias definidas por 1000. (Martín y Gudiol, 2003).....	3
Figura 3. Mecanismo general subyacente a una reacción de hipersensibilidad de tipo I (Inmunología de Kuby, 2007).	5
Figura 4. Mecanismo general subyacente a una reacción de hipersensibilidad de tipo IV o de hipersensibilidad tardía (Inmunología de Kuby, 2007).	6
Figura 5. Procedimientos <i>in vitro</i> empleados para valorar la reacción de hipersensibilidad de tipo I (Inmunología de Kuby, 2007).	8
Figura 6. Tecnología de disco compacto. (Morais <i>et al.</i> , 2008).....	11
Figura 7. Consumo de antibióticos en Europa expresado en dosis diarias definidas por mil habitantes y día (DDD/1000/día) (Ferech <i>et al.</i> , 2006).	12
Figura 8. Estructura química de la amoxicilina.....	13
Figura 9. Concentración de las IgEs totales y específicas anti-amoxicilina del suero utilizando las partículas magnéticas conjugadas a anti-IgE humanas como sistema de captura. Primero se capturan las IgEs del suero (1) para posterior magneto-concentración para eliminar otros componentes (2), liberan las IgEs (3) y se recuperan las IgEs concentradas (4).	15
Figura 10. Espectrofotómetro de placas utilizado en la medida de la absorbancia del extracto de IgEs cuantificado mediante el método ELISA	18
Figura 11. Lector de DVD utilizado en la detección	19
Figura 12. Estructura 3D de la HSA. Cada dominio está marcado con un color y cada subunidad está marcada con una sombra diferente. Protein Data Bank, ID: 1A06. (Majorek <i>et al.</i> , 2012).	20
Figura 13. Reacción de conjugación de la amoxicilina mediante la reacción de Mannich. .	21
Figura 14. Reacción de conjugación de la amoxicilina mediante la reacción de éster activo (Hermanson, 2008).	22
Figura 15. Perfiles de elución de los productos de las reacciones de conjugación obtenidos por la reacción de Mannich (A) y la reacción del éster activo (B) a diferentes relaciones molares amoxicilina:HSA.....	23
Figura 16. Concentraciones de proteína HSA libre y conjugada en las fracciones 3, 4 y 5 en columna de exclusión molecular para los conjugados procedentes de la reacción de Mannich (A) y para los conjugados procedentes de la reacción de éster activo (B) a diferentes relaciones molares.....	24
Figura 17. Inmunoensayo utilizado para la optimización de la concentración de conjugado y la concentración de anticuerpo primario.	24
Figura 18. Señal obtenida mediante la inmovilización de los conjugados proteicos utilizando tampón carbonato (CB) o tampón PBS (PBS).	25
Figura 19. Micromatriz proteica obtenida inmovilizando 11 concentraciones diferentes del conjugado proveniente de la reacción de éster activo, relación molar 50:1 más un control negativo. Se imprimieron 12 bloques con 6 réplicas.	25
Figura 20. SNR obtenida en función de la concentración de conjugado y la relación molar en la reacción de síntesis: Mannich (A) y éster activo (B).	26
Figura 21. Reacción de conjugación entre los grupos amino de los anticuerpos anti-IgEs y los grupos epoxi de las partículas magnéticas.....	29
Figura 22. IgE obtenida en ensayo de captura y elución, utilizando partículas magnéticas conjugadas a anticuerpps anti-IgE humana, cuantificada mediante método ELISA.	30
Figura 23. Cuantificación de IgEs totales y específicas anti-amoxicilina, mediante inmunoensayo utilizando la tecnología de disco compacto.	31
Figura 24. Sistema utilizado en el inmunoensayo de optimización del ensayo en disco.....	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de reacciones adversas a medicamentos.....	1
Tabla 2. Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad de Gell y Coombs (1963).	3
Tabla 3. Clasificación de los métodos de diagnóstico de alergias a fármacos.....	6
Tabla 4. Comparación técnicas <i>in vivo</i> con técnicas <i>in vitro</i>	9
Tabla 5. Características de los principales ensayos de cuantificación de IgE específica disponible actualmente en España. (1 UA=2,42 ng). *(López, 2005).	10
Tabla 6. Relaciones molares y reacciones testadas.....	22
Tabla 7. Concentraciones de conjugado preseleccionadas para estudio de reconocimiento.	26
Tabla 8. Valores de SNR obtenidos en el ensayo de reconocimiento de la IgE utilizando conjugados inmovilizados procedentes de las reacciones de Mannich (A) y éster activo (B). No detectable (nd) cuando $SNR_{media} < 3$	27
Tabla 9. SNR obtenidas al cuantificar en formato de disco las IgEs obtenidas mediante precipitación con sulfato amónico y tratamiento con Tween® del suero. No detectable (nd) cuando $SNR_{media} < 3$	28
Tabla 10. SNR obtenida en un inmunoensayo utilizando dos tipos A (BioLegend) y B (Ingenasa) de anticuerpos anti-IgEs humanas inmovilizados, variando la concentración y variando la concentración de IgE humana detectada. No detectable (nd) cuando $SNR_{media} < 3$	32

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BSA: albúmina de suero bovino, del inglés "bovine serum albumin".

CB: tampón carbonato, del inglés "carbonate buffer".

DVD: disco versátil digital.

EDC: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbadiimida.

HRP: peroxiasa de rábano picante, del inglés "horseradish peroxidase".

HSA: albúmina del suero humano, del inglés "human serum albumin".

Ig: inmunoglobulina.

LD: límite de detección.

NHS: N-hidroxisuccinimida.

PBS: tampón fosfato salino, del inglés "phosphate buffered saline".

PBS-T: tampón fosfato salino con 0,05 % Tween® 20.

ppm: partes por millón.

RAM: reacciones adversas a medicamentos.

SNR: relación señal/ruido, del inglés "signal noise ratio".

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina.

TTL: test de transformación linfocitaria.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Reacciones adversas a medicamentos

1.2 Método de diagnóstico de alergias a penicilinas

1.3 Métodos de diagnóstico alternativo

1.4 Selección del alérgeno modelo

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Reacciones adversas a medicamentos

Durante el siglo XX, la medicina ha experimentado un gran avance a nivel mundial. En especial, en los países desarrollados, ha descendido la tasa de mortalidad y la esperanza de vida ha aumentado notablemente. Este desarrollo ha sido posible gracias a la mejora de las condiciones sociales y sanitarias, así como a la investigación en el campo de la biomedicina. Todo ello, permite que actualmente en España, los ciudadanos posean un derecho constitucional a la salud y al acceso al sistema sanitario. Debido a ello, el uso de medicamentos ha aumentado de manera importante y forma parte del actual sistema de salud tanto a nivel nacional como a nivel mundial. Los fármacos ofrecen múltiples beneficios a los pacientes, sin embargo, en ocasiones, se pueden desencadenar reacciones adversas a medicamentos (RAMs). La Organización Mundial de la Salud las define como “cualquier efecto nocivo y no deseado que ocurre a las dosis habitualmente utilizadas en humanos para la profilaxis, diagnóstico o tratamiento” (WHO, 2000).

Las RAMs se clasificaron inicialmente por Deswarte (1993) como predecibles e impredecibles, siendo ambas clases divididas en cuatro subgrupos. Tres años más tarde, Escolano y Sierra (1996), realizaron una clasificación un poco más general dividiendo las RAMs en reacciones de tipo A y B. Dichas ordenaciones, se relacionan entre sí. Las reacciones predecibles se corresponden con las de tipo A y las impredecibles con las de tipo B (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de reacciones adversas a medicamentos.

Clasificación de las RAMs según Deswarte, 1993	Clasificación de las RAMs según Escolano y Sierra, 1996
REACCIONES PREDECIBLES	REACCIONES DE TIPO A
Se clasifican en: <i>Sobredosis</i> <i>Efectos secundarios</i> <i>Efectos indirectos</i> <i>Interacciones entre fármacos</i>	Pueden afectar a cualquier persona con dosis y exposición suficiente. Son predecibles a partir de las propiedades farmacológicas conocidas del fármaco.
REACCIONES IMPREDECIBLES	REACCIONES DE TIPO B
Se clasifican en: <i>Intolerancia</i> <i>Idiosincrasia</i> <i>Alergia a medicamentos</i> <i>Reacciones pseudoalérgicas</i>	Se restringen a un grupo pequeño y susceptible de la población. No están relacionadas con las acciones farmacológicas del medicamento.

Basándonos en el sistema de clasificación de Deswarte, las **reacciones adversas predecibles** se relacionan con los efectos farmacológicos del fármaco y no responden a mecanismos inmunológicos. Este tipo de reacciones corresponden al 85-90 % del total de reacciones adversas y se dividen a su vez en cuatro subgrupos: sobredosis, efectos secundarios, efectos indirectos o interacciones entre fármacos.

Las **reacciones adversas impredecibles** no están relacionadas con las acciones farmacológicas del fármaco, son las menos frecuentes y ocurren en sujetos predispuestos y susceptibles. En este grupo se encuentran las reacciones alérgicas. Estas reacciones se clasifican en cuatro subgrupos: intolerancia al fármaco, reacciones idiosincrásicas, alergia a los fármacos y reacciones pseudoalérgicas (Deswarte, 1993).

Las reacciones de *intolerancia* se definen como el efecto farmacológico indeseable a dosis bajas e incluso por debajo de las dosis normales de uso del fármaco. La *idiosincrasia* es un efecto anormal e inesperado causado generalmente por anomalías en el metabolismo o en la excreción del fármaco; estas reacciones pueden deberse a algún defecto genético conocido (Adkinson, 1998).

Por otro lado, las *reacciones alérgicas* se presentan como resultado de una respuesta inmune tras exposición previa al fármaco o a una sustancia relacionada y formación de anticuerpos específicos, mientras que las *reacciones pseudoalérgicas* son debidas en muchos casos a la activación de efectores inmunológicos inespecíficos (Gredilla *et al.*, 2000).

1.1.1 Reacciones alérgicas a medicamentos

La alergia a los medicamentos es una respuesta anómala del organismo frente al fármaco, mediada en una reacción inmunológica, impredecible e independiente de los efectos farmacológicos propios del medicamento.

La prevalencia real de la alergia a medicamentos no es muy conocida debido a la escasez de pruebas diagnósticas estandarizadas. La mayoría de autores aceptan porcentajes entre el 6 y el 10 % de las reacciones adversas a fármacos (Cortada *et al.*, 2007). Los datos a menudo se encuentran infravalorados por falta de notificación de reacciones y al mismo tiempo sobrevalorados debido al mal uso del término “alergia” ante cualquier reacción de dudosa explicación. Sin embargo, cuando se realiza un estudio alergológico apropiado, sólo se confirma con certeza en el 29 % de estos casos (Alergológica, 2005).

La alergia a medicamentos constituye el tercer motivo de consulta en los Servicios de Alergología, por detrás del asma y de la rinitis, y constituye aproximadamente el 15 % de todas las consultas de alergia (Lobera, 2012).

Los fármacos más frecuentemente implicados en alergia son los antibióticos betalactámicos, seguidos por los medicamentos no antibióticos (antiinflamatorios no esteroideos, pirazonas, anestésicos locales, etc.). Los macrólidos, las quinolonas y las sulfamidas ocupan el tercer lugar y por último se encuentran los aminoglucósidos y las tetraciclinas (Figura 1).

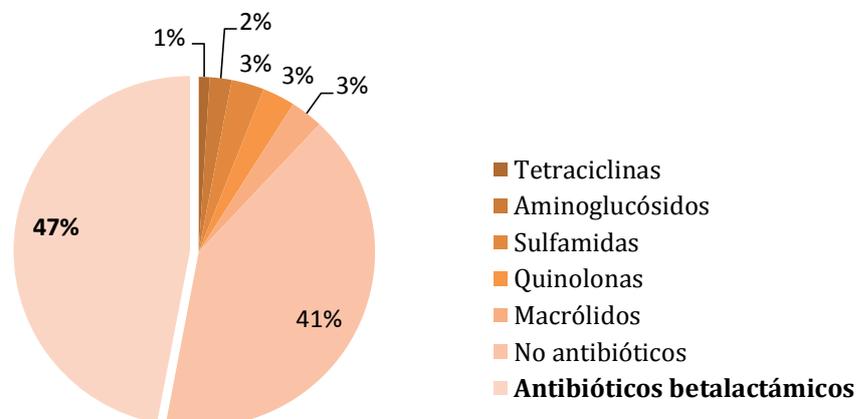


Figura 1. Prevalencia de la alergia a medicamentos. (Alergológica, 2005).

Estos datos son comparables con los datos obtenidos en años anteriores, pudiendo afirmar que los principales medicamentos responsables de las reacciones alérgicas siguen siendo los antibióticos betalactámicos (Caballero, 2009).

Antibióticos que años atrás producían frecuentes reacciones alérgicas hoy en día no son frecuentes. En el caso de las tetraciclinas y las sulfamidas, por ejemplo, su consumo ha disminuido mucho y por consiguiente, el número de reacciones alérgicas producidas por las mismas también, siendo un 1 % la prevalencia alérgica a las tetraciclinas y un 3 % la prevalencia alérgica a las sulfamidas.

Cabe destacar que dentro de las alergias a antibióticos betalactámicos, las penicilinas y sus derivados ocupan el primer lugar en las consultas alergológicas. Son las responsables de más de la mitad de las reacciones alérgicas frente a antibióticos (59 %). El consumo de penicilinas a nivel hospitalario actualmente es muy alto (Figura 2) y esto puede ser el motivo de la alta prevalencia de alergia frente a este grupo de fármacos.

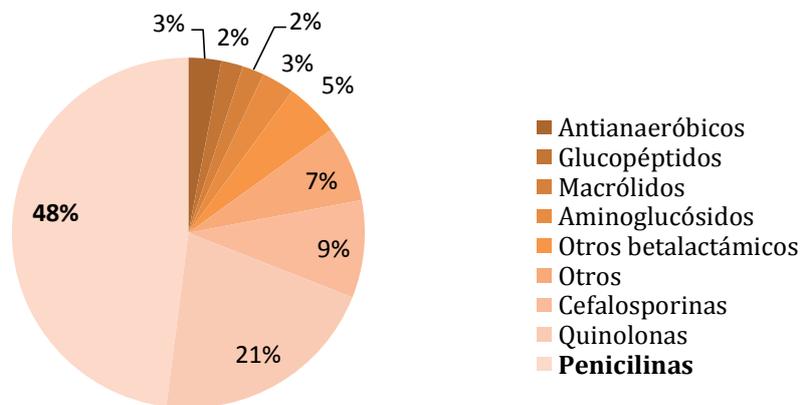


Figura 2. Consumo proporcional de antibióticos en el hospital universitario de Bellvitge en un período de 12 meses expresado en dosis diarias definidas por 1000. (Martín y Gudiol, 2003).

La clasificación de las reacciones de hipersensibilidad de Gell y Coombs (1963) es la más común. Existen cuatro tipos de reacciones dependiendo del tipo de respuesta inflamatoria implicada y del tiempo transcurrido desde que un enfermo sensibilizado entra en contacto con el alérgeno hasta que comienza la reacción inmunológica que provoca la inflamación. Si la reacción ocurre en unos pocos minutos se denomina de tipo I o *reacción de hipersensibilidad inmediata, alergia o atopia*; si los síntomas comienzan después de horas, la reacción es de tipo II o III y se denomina *reacción de hipersensibilidad tardía* y finalmente, si aparece después de varios días se clasifica como una *reacción de hipersensibilidad retardada* o de tipo IV (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad de Gell y Coombs (1963).

Clasificación inmunológica	Tiempo de latencia	Mecanismo mediador	Mecanismo de acción
I. Inmediata	2-30 min.	IgE	Mastocitos y sus mediadores
II. Mediada por Anticuerpos	5-8 h.	IgG, IgM contra tejidos	Activación del complemento Activación de leucocitos
III. Mediada por inmuno-complejos	2-8 h.	Inmunocomplejos circulantes (IgM, IgG)	Activación del complemento Activación de leucocitos
IV. Mediada por linfocitos T	Días, semanas	LT CD4+ LT CD8+	Macrófagos activados Lisis de células diana

La mayoría de las respuestas alérgicas o de hipersensibilidad son multifásicas, combinándose elementos de los diversos tipos de reacciones de hipersensibilidad en la cascada de la reacción alérgica.

- Las **reacciones de tipo I** son reacciones en las que los antígenos se combinan con inmunoglobulinas (Ig) E específicas que se hallan fijadas por su extremo Fc a receptores de la membrana de mastocitos y basófilos de la sangre periférica (VanArsdel, 1994), dando lugar a la degranulación de los mastocitos y basófilos.
- Las **reacciones de tipo II**, el mecanismo es mediado por IgG y rara vez por IgM. Los anticuerpos que intervienen van dirigidos contra antígenos de la superficie celular o antígenos específicos de tejidos produciendo una lisis celular.
- Las **reacciones de tipo III**, son mediadas por IgG y los anticuerpos se dirigen contra antígenos ampliamente distribuidos, o antígenos solubles en suero formando inmunocomplejos que precipitan en diferentes tejidos.
- Las **reacciones de tipo IV** son procesos de hipersensibilidad tardía mediada por linfocitos T y sus productos solubles. Se reclutan linfocitos T especialmente sensibilizados e inducidos a producir citoquinas que mediarán la inflamación local, dependiendo de las otras células efectoras implicadas en la reacción, dando lugar a distintos subtipos de reacciones tipo IV: **tipo IVa** son mediadas por linfocitos Th1, con secreción de INF- γ , TNF- α , IL-18 y activación de macrófagos; las de **tipo IVb** son secundarias a una respuesta de Th2, con secreción de IL-4, IL-5, IL-13, que desencadenan síntesis de IgE e IgG₄, desactivan los macrófagos y activan mastocitos y basófilos; las reacciones de **tipo IVc** implican a células efectoras citotóxicas, capaces de migrar al tejido inflamado y matar o inducir la apoptosis de las células tisulares; por último, las de **tipo IVd** dan lugar a una inflamación neutrofílica estéril mediada por linfocitos T.

La clasificación de una reacción alérgica es importante para determinar los diversos procedimientos de diagnóstico, las opciones para su tratamiento y las posibilidades de reactividad cruzada con medicamentos similares (Giner, 2013).

1.1.2 Reacciones alérgicas a antibióticos betalactámicos

Cualquier antibiótico puede producir una reacción alérgica, aunque los implicados con mayor frecuencia son los antibióticos betalactámicos, que incluyen las penicilinas como la amoxicilina, y las cefalosporinas. El tipo de reacciones alérgicas más comúnmente relacionadas con este tipo de antibióticos son las *reacciones de hipersensibilidad inmediata (tipo I)* y las *de hipersensibilidad retardada (tipo IV)*.

La mayoría de medicamentos son compuestos de bajo peso molecular y composición química simple, y sus estructuras no son fácilmente reconocibles por el sistema inmune. Sin embargo, algunos fármacos de bajo peso molecular (<1.000 Daltons) pueden adquirir inmunogenicidad por unión covalente a macromoléculas que, en general, son proteínas plasmáticas o proteínas de la superficie celular. El fármaco se conoce como hapteno y la nueva molécula, complejo hapteno-portador. Los complejos hapteno-portador son capaces de estimular a los linfocitos T y/o provocar respuestas de anticuerpos (Alpizar, 2000; Ingraham, 1871).

La penicilina es un fármaco que se comporta como hapteno, ya que el anillo betalactámico en condiciones fisiológicas se abre y reacciona con los residuos de lisina de las proteínas, formando un complejo que es el determinante antigénico principal de la penicilina y otros betalactámicos siendo capaz de estimular respuestas mediadas por anticuerpos, o por las células T (Brander *et al.*, 1995).

En las reacciones de tipo I, este complejo puede ser reconocido por las regiones variables de anticuerpos IgEs anclados a la superficie de las células B, las cuales endocitan y procesan el complejo. Posteriormente, el complejo principal de histocompatibilidad II produce la interacción y posterior activación del linfocito T, el cual producirá diferentes señales para que los linfocitos B produzcan más anticuerpos, dependiendo del tipo de linfocito.

La primera respuesta de IgE es un hecho local que ocurre en el lugar de entrada del alérgeno (mucosa y ganglios linfáticos locales); en el que participan células presentadoras de antígenos, linfocitos Th y linfocitos B que evolucionan a células plasmáticas productoras de IgE. La IgE pasa después a la circulación sistémica y se une a los receptores de IgE de los basófilos sanguíneos y a los mastocitos de todo el organismo (Figura 3).

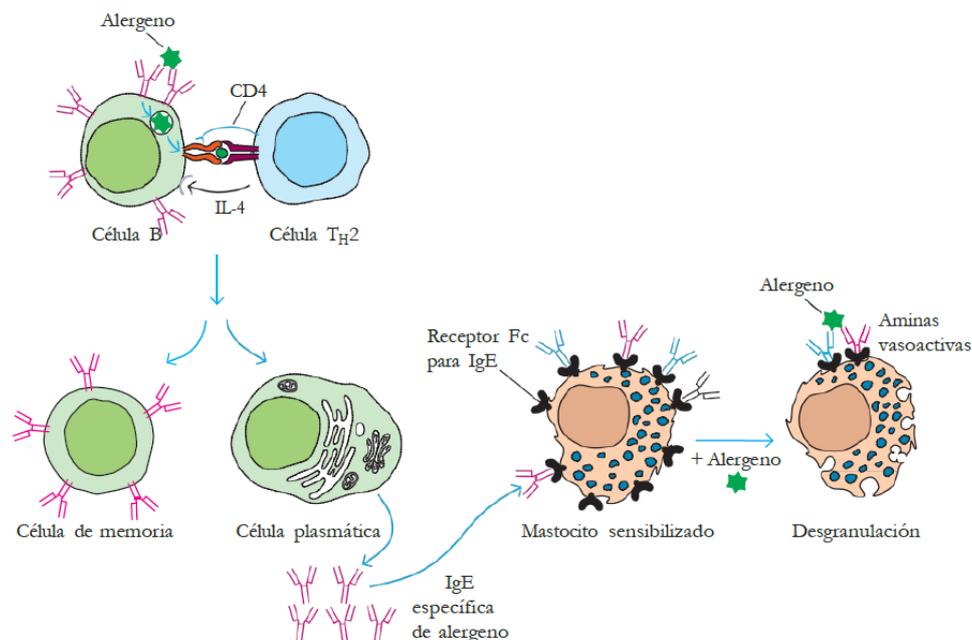


Figura 3. Mecanismo general subyacente a una reacción de hipersensibilidad de tipo I (Inmunología de Kuby, 2007).

El desarrollo de **las reacciones de hipersensibilidad de tipo IV o hipersensibilidad tardía**, se inicia con una primera fase de sensibilización a una o dos semanas después del primer contacto con el antígeno. Tras ello, las células Th proliferan y se diferencian en células Th1. En general, las células T que se activan durante la fase de sensibilización con CD4+, sobre todo del subtipo Th1, pero en algunos casos se observa que células CB8+ inducen la reacción de esta clase. En la fase efectora tras la exposición subsecuente de las células Th1 sensibilizadas al antígeno, estas células secretan diversas citocinas y quimiocinas.

Estos factores atraen y activan macrófagos y otras células inflamatorias inespecíficas. Los macrófagos activados son más eficaces para presentar los antígenos, por lo que perpetúan la reacción y funcionan como células efectoras primarias (Figura 4).

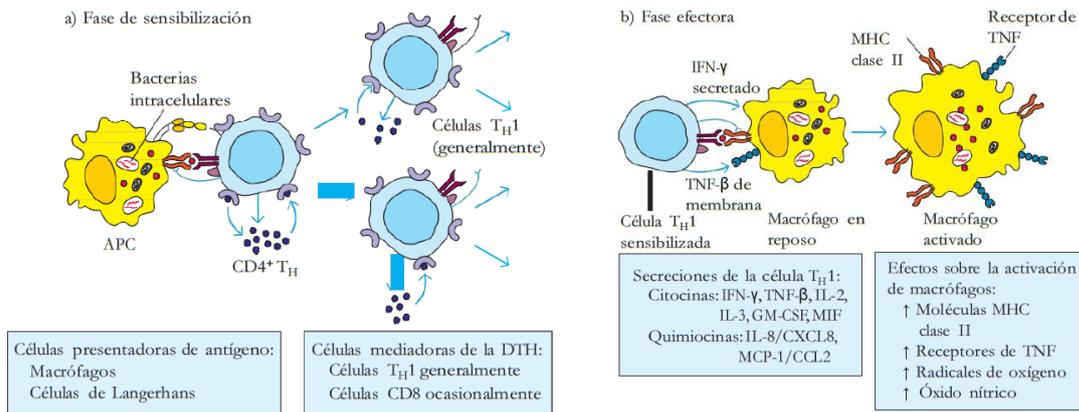


Figura 4. Mecanismo general subyacente a una reacción de hipersensibilidad de tipo IV o de hipersensibilidad tardía (Inmunología de Kuby, 2007).

1.2 Método de diagnóstico de alergias a penicilinas

Existe un problema importante a la hora de diagnosticar alergia a antibióticos betalactámicos y es que no existen técnicas que ayuden a confirmar las sospechas clínicas. El diagnóstico se basa principalmente en el historial clínico detallado de la reacción. Para confirmar las sospechas del historial, se pasa a estudios *in vitro* y/o estudios *in vivo*.

En el caso de las **reacciones de tipo I o de hipersensibilidad inmediata**, los estudios *in vivo*, incluyen las *pruebas cutáneas* y las *pruebas de provocación o de exposición controlada* cuando el resto de las pruebas tienen resultado negativo y sea necesaria una confirmación (Arriba-Méndez, 2010). Mientras que los estudios en laboratorio incluyen la *determinación de IgE específica* en suero o pruebas de medida de mediadores inflamatorios.

En el caso de las **reacciones de tipo IV o de hipersensibilidad retardada**, se utilizan pruebas cutáneas como métodos *in vivo* y se realiza el *test de transformación linfocitaria* (TTL) como método de laboratorio (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de los métodos de diagnóstico de alergias a fármacos.

Reacciones de hipersensibilidad inmediata (tipo I)		Reacciones de hipersensibilidad retardada (tipo IV)	
Métodos <i>in vivo</i>	Métodos <i>in vitro</i>	Métodos <i>in vivo</i>	Métodos <i>in vitro</i>
Prueba cutánea intraepidérmica (Prick)	Cuantificación de IgEs totales y/o específicas	Prueba cutánea intradérmica (ID)	Test de transformación linfocitaria (TTL)
Prueba cutánea intradérmica (ID)	Test de activación de basófilos	Prueba epicutánea (parches)	
Prueba de provocación	Medida de mediadores inflamatorios	Prueba de provocación	

En general, se indica el tipo de pruebas necesarias, teniendo en cuenta el tipo y la gravedad de la reacción, el estado del paciente, la necesidad del medicamento y las alternativas farmacológicas válidas entre otros datos (Lobera, 2012). Un elemento importante a la hora de estudiar estas reacciones es el tiempo entre el momento del cuadro y el del estudio, ya que la sensibilidad de las pruebas cutáneas y de la determinación de IgE disminuye con el tiempo (Blanca, 1999).

1.2.1 Métodos de diagnóstico *in vivo*

A menudo se identifica y valora la hipersensibilidad tipo I mediante pruebas cutáneas. Se introducen pequeñas cantidades de alérgenos potenciales en sitios específicos de la piel por *inyección intradérmica* o raspado superficial. Puede aplicarse a la vez cierto número de pruebas a sitios del antebrazo o el dorso del individuo. En ese momento, los mastocitos locales se desgranulan y la histamina y otros mediadores liberados desde éstos producen una reacción de roncha y rubor en 30 min si la persona es alérgica a la sustancia en cuestión.

La *prueba intraepidérmica* o *Prick test* consiste en la introducción una pequeña proporción del extracto alérgico en la epidermis del paciente por medio de una punción.

La lectura de las pruebas intradérmicas se realiza a las 48 y 72 horas, y las *pruebas epicutáneas* (parches), se utilizan para el estudio de las reacciones tardías. La sensibilidad de estas pruebas es baja. Según Ponvert *et al.* (1999), las pruebas cutáneas diagnosticarían un 73 % de reacciones inmediatas mientras que sólo lo harían con el 37 % de las no inmediatas.

Las *pruebas de provocación (o de exposición controlada)*, son unas pruebas generalmente necesarias para el diagnóstico de las reacciones no inmediatas, ya que pocas veces quedan diagnosticadas con las pruebas cutáneas. Para las reacciones inmediatas también son a menudo necesarias. Estas pruebas consisten en la administración de cantidades crecientes del fármaco estudiado cada 30 minutos o una hora hasta llegar a la dosis terapéutica para la edad y peso del paciente. De esta manera se podrá diagnosticar como alérgico al paciente si presenta síntomas durante o al finalizar la prueba. Sin embargo, esta técnica de diagnóstico presenta un alto riesgo de causar reacciones alérgicas graves.

1.2.2 Métodos de diagnóstico *in vitro*

Las pruebas de diagnóstico de alergia a fármacos realizadas en laboratorio buscan constatar la reacción alérgica cuantificando los anticuerpos IgE específicos, estudiando los mediadores que se liberan o analizando si existe proliferación de linfocitos T al contacto con el fármaco.

1.2.2.1 Cuantificación de IgEs totales y/o específicas

Este tipo de estudios se realizan únicamente en reacciones inmediatas y mediadas por IgE. Son métodos que determinan la concentración total sérica de anticuerpo IgE mediante diferentes pruebas.

La prueba de *radioinmunosorbencia (RIST)* se basa en un inmunoensayo, que puede identificar cantidades nanomolares de IgEs totales. El suero del paciente se hace reaccionar con cuentas de agarosa o discos de papel cubiertos con anticuerpos anti-IgE de conejo. Después de lavar las cuentas o los discos, se añade anticuerpo anti-IgE de conejo marcado con ^{125}I . La radiactividad de las cuentas o los discos, medida con un contador gamma, es proporcional al contenido de IgE en el suero del paciente (Figura 5a).

La prueba de la *radioalergosorbencia (RAST)*, similar a la anterior, detecta la concentración sérica de IgE específica de un alérgeno determinado al mezclar el alérgeno con cuentas o discos y añadir el suero del paciente. Tras ello, se lavan para eliminar el anticuerpo que no se fijó.

A continuación, se mide la cantidad de IgE específica fija al alérgeno de fase sólida mediante la adición de anticuerpo anti-IgE de conejo marcado con ^{125}I , el lavado de las cuentas o los discos y la lectura de la radiactividad fija con el contador gamma (Figura 5b). La sensibilidad de estas pruebas es baja para los antibióticos betalactámicos, siendo inferior al 25 % (Arriba-Méndez, 2010). El RAST parece ser algo menos específico (67-83 %), pero más sensible (43-75 %) (Fontaine *et al.*, 2007).

Existe otro tipo de prueba para determinar IgEs específicas, el CAP. En esta prueba, el alérgeno se encuentra unido a una fase sólida, de manera que los anticuerpos IgE específicos pueden unirse a ellos cuando se añade suero de pacientes. Tras realizar lavados, se añaden anticuerpos que reconocen IgE marcados con un fluorocromo, que interacciona con su sustrato emitiendo fluorescencia. La especificidad del CAP llega al 83-100 % (Fontaine *et al.*, 2007).

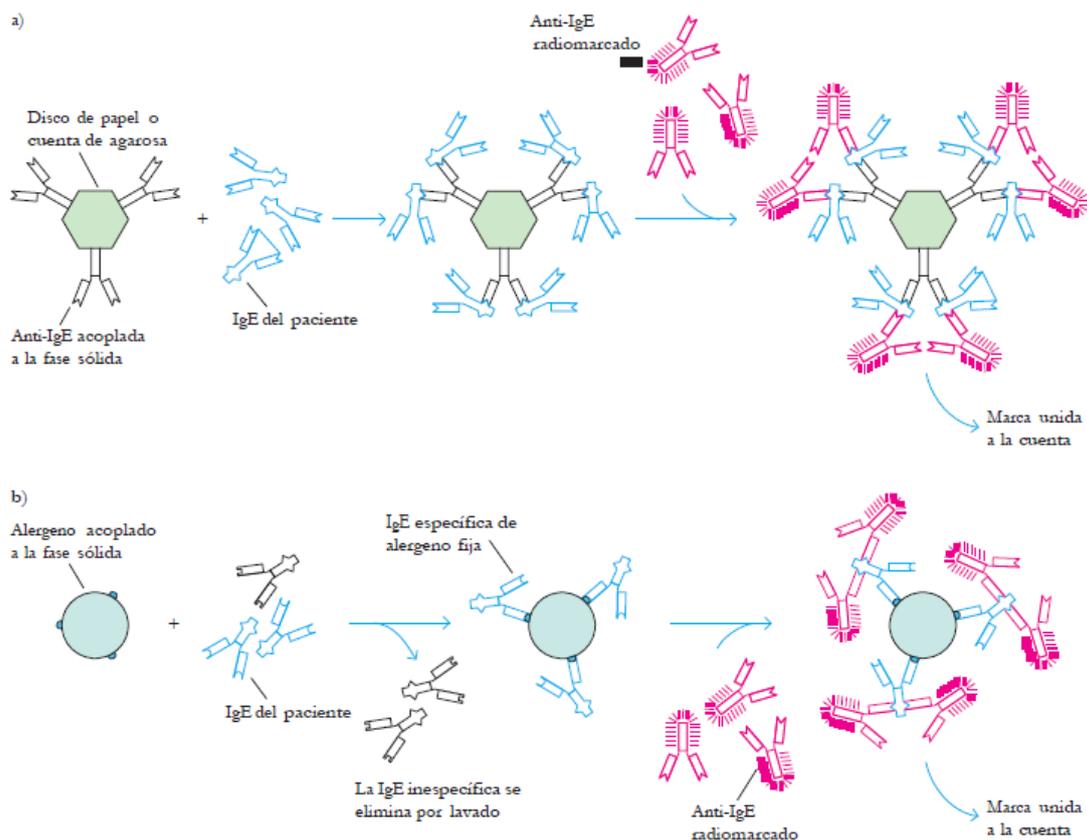


Figura 5. Procedimientos *in vitro* empleados para valorar la reacción de hipersensibilidad de tipo I (Inmunología de Kuby, 2007).

1.2.2.2 Estudio de los mediadores liberados

En el caso de las reacciones inmediatas, la técnica que más se ha desarrollado en los últimos años y que es más aceptada es el *test de activación de los basófilos*, que mide la expresión del marcador CD63 por citometría de flujo en la superficie de los basófilos. Este marcador aparece cuando los basófilos están activados, tras su incubación con el fármaco estudiado.

La *medición de triptasa* puede ser útil en las anafilaxias por fármacos. Los niveles más altos se detectan entre 6 y 24 horas tras el inicio de la reacción y suelen ser proporcionales a la reacción.

1.2.2.3 Estudio de linfocitos T

Para el estudio de reacciones no inmediatas frente a betalactámicos y otros medicamentos, existe el TTL, que actualmente está en desuso en la práctica común debido a su baja sensibilidad. Esta técnica consiste en enfrentar las células aisladas de la sangre venosa del paciente a las sustancias sospechosas de la reacción clínica, aunque en este caso, durante períodos prolongados de tiempo, a fin de observar posteriormente la proliferación linfocitaria estimulada en presencia de dicho medicamento detectada mediante la adición de timidina triada al medio, ya que ésta se incorpora al ADN sintetizado *de novo*. La radiactividad emitida se mide entonces con un contador de emisiones beta.

1.3 Métodos de diagnóstico alternativo

En su conjunto, los exámenes de laboratorio para el diagnóstico de alergia a medicamentos aportan pocos datos de información clínica, siendo necesario, en la mayoría de las ocasiones, la realización de estudios *in vivo*. Por desgracia, estos estudios a menudo entrañan un riesgo de reacción en el paciente sensibilizado, por lo que requiere personal hospitalario cualificado. Además, un diagnóstico erróneo de alergia, conlleva muchas veces a la utilización de alternativas terapéuticas menos efectivas, más costosas y más tóxicas. En la Tabla 4, se observan las principales ventajas e inconvenientes de ambos tipos de ensayos.

Tabla 4. Comparación técnicas *in vivo* con técnicas *in vitro*.

	Técnicas <i>In Vivo</i>	Técnicas <i>In Vitro</i>
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> · Diagnóstico sencillo · Técnicas muy estudiadas 	<ul style="list-style-type: none"> · Técnicas poco invasivas · Capacidad de multiplexado · Bajo coste · Técnica cómoda para el paciente
Inconvenientes	<ul style="list-style-type: none"> · Se requiere personal cualificado · Posibilidad de causar reacciones alérgicas graves · Falsos positivos · Necesarias múltiples pruebas en el paciente 	<ul style="list-style-type: none"> · Métodos estandarizados en escasos fármacos · Diagnóstico complejo · Técnicas poco desarrolladas · Baja sensibilidad, necesidad de recurrir a técnicas <i>in vivo</i>

Debido a estos factores, se necesita desarrollar nuevas técnicas de diagnóstico que permitan diferenciar de manera inequívoca una alergia a un medicamento de cualquier otro tipo de reacción adversa. Se busca un método sencillo y de bajo coste, menos agresivo y arriesgado que las actuales técnicas cutáneas de diagnóstico y que permita analizar varios fármacos de manera simultánea con metodología *in vitro* para no tener que realizar ensayos sobre los pacientes directamente.

1.3.1 Determinación de IgEs sanguíneas

Las IgEs son biomarcadores adecuados para el diagnóstico de respuestas alérgicas a antibióticos betalactámicos como la amoxicilina. Encontrar un método que detecte y cuantifique estas biomoléculas, nos permitiría una diagnosis más eficaz de las enfermedades alérgicas de tipo inmediato. Los inmunoensayos para cuantificar los niveles de IgE específica frente a diversos alérgenos se desarrollan a gran velocidad.

Desgraciadamente, las IgE son las inmunoglobulinas que se encuentran en menor proporción en la sangre, siendo su concentración de entre 17 y 450 ng/mL en el suero en condiciones normales. Cuando se produce una reacción alérgica, estos niveles aumentan dependiendo de la cantidad y proporción de los alérgenos absorbidos. Las personas con alergias presentan niveles elevados de IgE. Los niveles elevados de IgE total se utilizaron al principio para identificar a los sujetos atópicos, aunque hoy en día se sabe que los niveles séricos de IgE total carecen de especificidad diagnóstica.

Como consecuencia de la baja especificidad de la IgE total, la medida de IgE específica se convierte en el primer análisis *in vitro* empleado como método confirmatorio diagnóstico alternativo a las pruebas *in vivo* para identificar el estado de sensibilización (López, 2005). Existen varias técnicas comerciales (Tabla 5) que se basan en este principio de diagnóstico de alérgenos.

Tabla 5. Características de los principales ensayos de cuantificación de IgE específica disponible actualmente en España. (1 UA=2,42 ng). *(López, 2005).

Empresa	Fase de reacción	Rango de detección	Método de detección	Autoanalizador
PHADIA	CAP (fase sólida)	0,1-100 KUA/L	Fluorescencia	UniCAP 100 ImmunoCAP 250 ImmunoCAP 1000
SIEMENS Healthcare Diagnostics	Tubos de cristal (fase líquida)	0,1-100 KUA/L	Quimioluminiscencia	Immulate 2000
	Placas ELISA (fase líquida)	3-1000 UA/mL IgEs específicas	ELISA	AlaSTAT microplate
	Partículas paramagnéticas (fase sólida)	>0,1 KUA/L	Quimioluminiscencia	Advia Centaur
HYCOR	Discos de papel (fase sólida)	0,35-100 KUA/L	ELISA	Hytech

Un método que detecte IgEs específicas frente al fármaco, permitiría indicar si se han producido IgEs contra el fármaco en cuestión y, conociendo la relación entre éstas y las IgEs totales, se podría diagnosticar alergia. La utilidad de medir los niveles de IgE ha quedado sobradamente demostrada en las últimas tres décadas de uso clínico. Los laboratorios de diagnóstico de alergia han empleado durante más de 30 años ensayos comerciales para medir tanto IgE total como IgE específica.

El primer ensayo para cuantificar los niveles de IgE específica apareció en 1967 y, desde entonces, ha experimentado una serie de mejoras para aumentar la sensibilidad analítica y la reproducibilidad.

A modo de ejemplo, la técnica comercial de ImmunoCAP, comercializada por PHADIA (Thermo Scientific). En esta técnica, se pretende realizar un análisis cuantitativo de las IgEs específicas al fármaco, mediante un ensayo de tipo sándwich, donde se establece una fase sólida junto con el material fuente del alérgeno estandarizado, los componentes alérgicos recombinantes y los marcadores pertinentes para conseguir un diagnóstico eficaz. Sin embargo, uno de los inconvenientes de esta técnica, se basa en que la técnica es poco sensible y los resultados a menudo son fuente de falsos positivos.

Además, la lista de alérgenos detectables a menudo es corta y no incluyen muchos antígenos responsables de la alergia a antibióticos betalactámicos. Por otro lado, este tipo de técnicas comerciales son poco económicas pudiendo abarcar únicamente a un porcentaje de pacientes muy pequeño.

Las partículas magnéticas pueden ser un soporte sólido adecuado a la hora de concentrar las IgEs del suero. Captar las IgEs totales del suero de pacientes alérgicos, permitiría tras una elución, realizar un inmunoensayo sobre disco que cuantifique los niveles de IgEs totales y específicas al fármaco en cuestión mediante un ensayo de tipo biosensor.

1.3.2 Biosensores

Los biosensores son una alternativa con elevadas posibilidades en esta área. Son dispositivos que permiten la medición de parámetros biológicos o químicos combinando un componente de naturaleza biológica y otro físico-químico. El transductor convierte la señal generada por el bioreconocimiento en una respuesta medible por el detector. A diferencia de los bioensayos y sistemas convencionales, los biosensores se caracterizan por ser selectivos, sensibles, rápidos, portátiles, fáciles de operar, baratos y proporcionan, en general, una respuesta cuantitativa.

El disco versátil digital (DVD) se emple normalmente para almacenar información, pero puede ser también empleado como plataforma biosensora. El DVD actúa como superficie para la inmovilización de los bioreceptores por adsorción pasiva para posteriormente realizar los ensayos de bioreconocimiento. El lector de discos actúa como sistema de barrido de la superficie sensora generando la correspondiente imagen de la micromatriz (Morais *et al.*, 2009). Los bioreceptores reconocen los analitos y finalmente se podrá realizar la detección. Dicha detección se realiza con un lector de DVD, en el que un láser de 650 nm incide sobre toda la superficie del disco. El reconocimiento bioreceptor-analito producirá un cambio en la luz reflejada por el disco. Un software específico se encarga de transformar las señales detectadas en una imagen, analizada posteriormente (Tortajada-Genaro *et al.*, 2012) con un software especial que cuantifica la señal en cada punto. La Figura 6 muestra la tecnología del disco compacto.

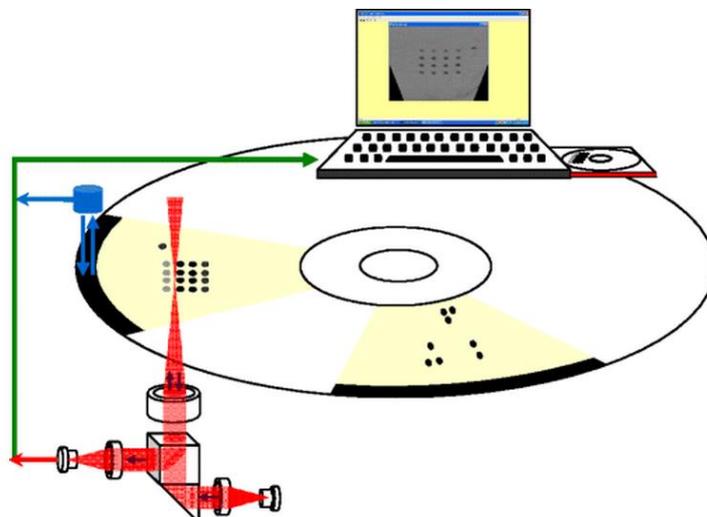


Figura 6. Tecnología de disco compacto. (Morais *et al.*, 2008)

Las principales ventajas que aporta dicha herramienta son el uso de menor cantidad de reactivo que en otros inmunoensayos. Además, la realización de más inmunoensayos en menor tiempo permite capacidades de trabajo mucho menores que con otras técnicas.

Su utilización para diversos ensayos en formato de micromatriz (Morais *et al.*, 2009) para la determinación de biomarcadores (Morais *et al.*, 2008) o alérgenos alimentarios (Tortajada-Genaro *et al.*, 2012) ha demostrado tener sensibilidad y especificidad satisfactoria.

1.4 Selección del alérgeno modelo

La alergia a amoxicilina empleada como sistema modelo en este estudio se basó en una búsqueda bibliográfica y fruto de la colaboración del Servicio de Alergias del Hospital Universitario Politécnico de La Fe (Valencia), en el contexto de un proyecto de colaboración UPV-La Fe 2014.

1.4.1 Antibióticos betalactámicos

La selección se centró en los antibióticos betalactámicos dado que, tras más de 70 años siguen siendo los antimicrobianos más prescritos tanto a nivel hospitalario como a nivel de atención primaria en toda Europa (Figura 7). Su consumo representó más del 70 % del total de antibióticos prescritos en España durante el año 2005 en atención primaria (Campos *et al.*, 2007).

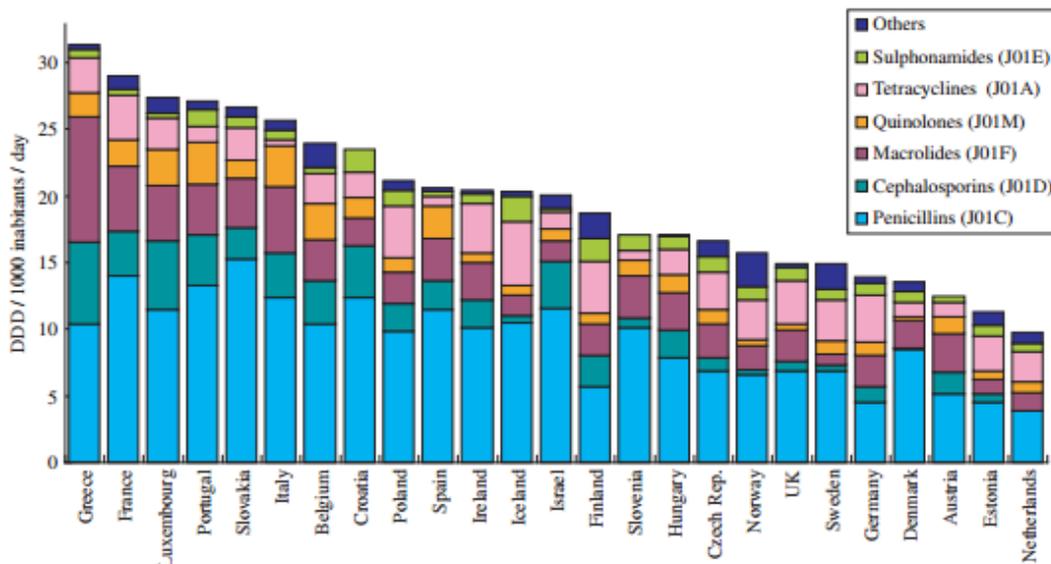


Figura 7. Consumo de antibióticos en Europa expresado en dosis diarias definidas por mil habitantes y día (DDD/1000/día) (Ferech *et al.*, 2006).

Su elevado consumo causa también una mayor prevalencia en las alergias a este tipo de compuestos, llegando a ser los responsables de casi la mitad de las reacciones alérgicas a medicamentos.

Se observó que de entre las diferentes familias de los antibióticos betalactámicos, destacan las **penicilinas**, que contienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico. La alergia a las penicilinas supone un 48 % de las alergias a esta familia de antibióticos, siendo por tanto el antibiótico que más casos de alergia supone de manera normal.

1.4.2 Amoxicilina

Dentro de las penicilinas semisintéticas, se destaca la *amoxicilina* (Figura 8) por ser la principal responsable de las reacciones alérgicas a antibióticos betalactámicos. La amoxicilina, al igual que el resto de penicilinas, es sensible a la acción de las betalactamasas, enzimas presentes en los estafilococos, por lo que actualmente muchas veces se administra junto con la amoxicilina, ácido clavulánico, un inhibidor de las betalactamasas.

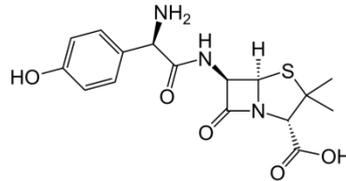


Figura 8. Estructura química de la amoxicilina.

Se documentó que la combinación amoxicilina/ácido clavulánico ocupa el primer lugar en los principios activos más prescritos entre los años 2002 y 2007, seguido en segundo lugar por la amoxicilina (Serna *et al.*, 2011) y lo mismo se observó durante cinco años diferentes en regiones de Cataluña (Solé *et al.*, 2004).

Su venta y consumo ha experimentado un aumento en los últimos años, llegando a alcanzar hasta el 55 % del uso total de antibióticos a nivel global (Van Boeckel *et al.*, 2014). En la lista de antibióticos betalactámicos que causan más reacciones alérgicas, la amoxicilina se encuentra en un primer lugar (Fernández y Pedraz, 2007). Los síntomas de alergia son observados tras consumir un antibiótico con o sin ácido clavulánico asociado (Ripoll, 2002). Por lo tanto, se consideró que su efecto va en relación al elevado uso debido a los hábitos de prescripción clínica.

Se estudió su utilización como molécula modelo en diferentes estudios de alergias (Xue *et al.*, 2011; Ariza *et al.*, 2014). Por otra parte, su diagnóstico actualmente es muy complejo, dando lugar a menudo a errores que afectan a la calidad de vida de los pacientes, ya que a menudo se ven obligados a buscar un antibiótico alternativo más caro o someterse a pruebas de desensibilización.

Todos estos datos condujeron a la selección de la amoxicilina como antibiótico modelo en la diagnosis de alergias a medicamentos con la herramienta propuesta en este TFG.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos generales

En este trabajo de final de grado, se pretende contribuir en el desarrollo de un ensayo *in vitro* para el diagnóstico de alergia a amoxicilina capaz de detectar y cuantificar las IgEs totales y específicas en suero humano utilizando la tecnología de disco compacto.

En concreto, se centra en la preparación de los reactivos necesarios en el ensayo, que incluyen los conjugados fármaco-proteína para inmovilizar como sondas y las partículas magnéticas conjugadas a anticuerpos anti-IgE utilizados como herramienta de captura y concentración de IgEs presentes en suero.

2.2 Objetivos específicos

1. Preparar los conjugados amoxicilina-HSA para su inmovilización en disco y posterior cuantificación de IgEs específicas en un ensayo de micromatrices.
2. Optimizar las condiciones de inmovilización y detección en formato de disco compacto de los conjugados amoxicilina-HSA.
3. Establecer las condiciones adecuadas para la conjugación de las partículas magnéticas a anticuerpos anti-IgE y cuantificar el producto formado.
4. Poner a punto las condiciones de captura y elución de las IgEs por parte de las partículas magnéticas conjugadas y cuantificar el extracto.
5. Proponer un formato de ensayo en disco compacto que permita cuantificar IgEs totales y específicas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Protocolo general

3.2 Preparación de los conjugados de inmovilización

3.3 Preparación de las partículas magnéticas conjugadas

3.4 Captura y elución de IgEs mediante partículas magnéticas conjugadas

3.5 Medida del extracto de IgEs

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Protocolo general

El esquema general del ensayo establecido para el diagnóstico de alergia, consiste en primer lugar, en la captura de las IgEs humanas totales del suero pre-tratado con Tween® 20 utilizando partículas magnéticas conjugadas a anticuerpos anti-IgEs (Figura 9).

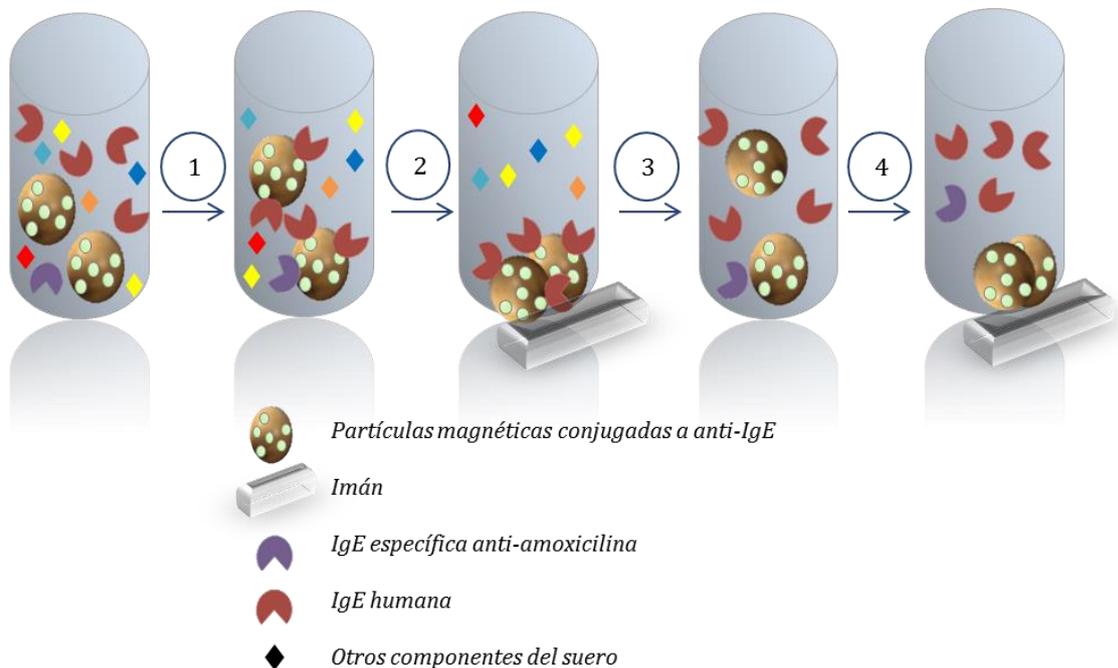


Figura 9. Concentración de las IgEs totales y específicas anti-amoxicilina del suero utilizando las partículas magnéticas conjugadas a anti-IgE humanas como sistema de captura. Primero se capturan las IgEs del suero (1) para posterior magneto-concentración para eliminar otros componentes (2), liberan las IgEs (3) y se recuperan las IgEs concentradas (4).

Posteriormente, las IgEs son cuantificadas en un ensayo de micromatrices de proteínas con tecnología de disco compacto. Para ello, se utilizan dos tipos de sondas inmovilizadas en la superficie de policarbonato del disco: anticuerpos anti-IgE para la determinación de las IgEs totales y conjugados proteicos del fármaco para la determinación de las IgEs específicas a la amoxicilina. También se incluyeron controles positivos y negativos en la micromatriz.

3.2 Preparación de los conjugados de inmovilización

3.2.1 Conjugación de la amoxicilina

Para la conjugación de la amoxicilina, se utiliza la albúmina de suero humano (HSA; Sigma-Aldrich). La conjugación se realiza mediante dos reacciones:

3.2.1.1 Reacción de condensación de Mannich

El protocolo de conjugación es como el descrito por Faraj *et al.* (1981), con pequeñas modificaciones. En primer lugar, se mezclan 82 μL de formaldehído (Sigma-Aldrich), 204 μL de tampón acetato sódico (3 M pH 5,5) y 306 μL ($3,78 \cdot 10^{-7}$ moles en agua MiliQ) de HSA a una concentración de 81 mg/mL.

Finalmente, se añaden 408 μL de las diferentes disoluciones de amoxicilina (GlaxoSmithKline) para establecer las cuatro relaciones molares amoxicilina:HSA, siendo: 25:1, 50:1, 100:1 y 200:1. Se deja 2 horas en agitación a temperatura ambiente y oscuridad. Tras ello, se centrifuga 16 minutos a 10.000 rpm para desechar los agregados.

3.2.1.2 Reacción del éster activo

El protocolo de conjugación es como el descrito por Langone y Van Vunakis (1982), con pequeñas modificaciones. Primero se realiza una activación de la amoxicilina mezclando N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma-Aldrich), 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (Sigma-Aldrich) y amoxicilina a una relación molar 0,1:0,1:0,15 respectivamente. La activación se realiza en un volumen final de 500 μL . Se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente y oscuridad.

Después, se conjuga la amoxicilina activada con la HSA. La reacción se realiza a cuatro relaciones molares diferentes de amoxicilina activada:HSA en un volumen final de 600 μL . Se mezclan 300 μL de HSA ($3,78 \cdot 10^{-7}$ moles en tampón carbonato) a una concentración de 83 mg/mL y 300 μL de amoxicilina a las concentraciones necesarias para conseguir cuatro relaciones molares iniciales amoxicilina:HSA diferentes, siendo: 25:1, 50:1, 100:1 y 200:1. Se incuba 2 horas a temperatura ambiente, en agitación y oscuridad. Finalmente se realiza una centrifugación de 16 minutos a 10.000 rpm recuperando el sobrenadante donde quedan nuestros conjugados.

3.2.2 Purificación de los conjugados

Se aíslan los conjugados utilizando una columna de exclusión molecular (Dextran Desalting Columns 5-150 μm). Esta columna se conecta a una bomba peristáltica y se ajusta el flujo a 1 mL/min. A continuación, se dispensan 50 mL de PBS (fosfato 0,1 M, NaCl 0,13 M, KCl 0,27 M; 0,5 M pH 7,5) para equilibrar la columna y luego se añade 0,42 mL de los conjugados de cada uno de las relaciones molares de la reacción del éster activo y 0,795 mL de los cuatro conjugados de cada una de las relaciones molares en el caso de la reacción de Mannich. Posteriormente, se añaden 20 mL de PBS y se recogen fracciones cada minuto para cada una de las diferentes relaciones molares de ambas reacciones. Se obtiene un total de 20 fracciones por cada relación molar y reacción. Finalmente, se lava la columna con 50 mL de PBS y se almacena en nevera tras dejar pasar 15 mL de PBS azida sódica (0,02 % azida sódica en PBS).

Tras realizar el blanco con el tampón específico para cada una de las reacciones se mide la absorbancia a 280 nm utilizando el NanoDrop (NanoDrop 2000 Thermo Scientific).

Por otro lado, también se realiza un test para cuantificación de proteína mediante el protocolo de Bradford. Para ello, se prepara una recta patrón de calibrado con HSA, la proteína sobre la cual se realiza la conjugación. Se añade en una placa ELISA 150 μL de agua MiliQ, 10 μL de muestra problema o curva patrón de calibrado y 40 μL de reactivo Bradford (Bio-Rad). Tras ello, se mide la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro de placas (Wallac, VICTOR™ 1420 multilabel counter). Posteriormente, las absorbancias de la muestra problema se interpolan en la curva de calibrado construida y se calcula la concentración de HSA presente en la muestra. Los conjugados se llevan a una concentración final de 4 mg/mL en PBS y se alicuotan antes de ser almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evitar pérdidas de proteína debido a excesivos ciclos de congelación/descongelación.

3.2.3 Caracterización de los conjugados

Se realiza un inmunoensayo en formato de micromatriz sobre la superficie de un DVD y detección mediante un lector de DVDs. Se inmovilizan en disco de diferentes disoluciones en tampón carbonato (Na_2CO_3 0,032 M, NaHCO_3 0,068 M; 0,1 M pH 9,2) de los conjugados de amoxicilina junto con un control negativo utilizando el equipo AD 1500 (BioDot, Inc, Irvine, CA) con humedad controlada al 80 %. El protocolo de impresión utilizado fue el descrito por Morais *et al.* (2009). Los conjugados se dejan incubar en disco toda la noche a 4 °C. Tras la incubación, se lava con PBS-T (PBS 0,05 % Tween® 20) y agua antes de realizar las incubaciones con diferentes concentraciones de anticuerpo anti-amoxicilina procedente de ratón (Abcam) durante 30 minutos a humedad y temperatura ambiente. Para el revelado, se incuba de nuevo 30 min las ocho zonas con anticuerpo anti-ratón marcado con oro (Sigma), concentración 1000 ng/mL en PBS-T.

Finalmente se revela realizando la formación de plata (Sigma) incubando 8 min en oscuridad, reacción catalizada por el oro y que permite la detección. Por último, se lava sólo con agua. Tras ello, se lee y se analiza utilizando un lector de DVD controlado por el programa Biodisk (propio del grupo de investigación). El análisis se basa en obtener la SNR (Signal Noise Ratio), que se calcula dividiendo el valor de señal obtenido en las muestras entre la desviación estándar de los valores de señal de fondo. El límite de detección (LD) es la menor cantidad de analito cuya señal puede ser distinguida de la del ruido. En el método analítico empleado, el LD se establece cuando el SNR es 3.

3.3 Preparación de las partículas magnéticas conjugadas

Se realiza la conjugación de las partículas magnéticas (Dynabeads® M-270 Epoxy 2,8 µm Life Technologies) con anticuerpo monoclonal anti-IgE humano procedente de ratón (Ingenasa, España).

Se pesan 5 mg de las partículas magnéticas ($3,3 \cdot 10^8$ partículas) y se resuspenden en 1 mL de tampón fosfato de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,02 M, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,08 M; 0,1 M pH 7,4). Se vortea 30 s y se deja en agitación 10 min. Tras ello, se deposita el tubo con las partículas sobre un imán durante 1 min, retirando el sobrenadante y se resuspenden las partículas magnéticas en 100 µL de tampón fosfato de sodio y se vortea durante 30 s. Se añade 100 µg de anticuerpo anti-IgE y 100 µL de tampón sulfato amónico (3 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en tampón fosfato de sodio pH 7,4), constituyendo cada sustancia un tercio del volumen final de reacción. Se deja incubar 24 horas a 37 °C con rotación constante. Después, se deposita sobre el imán 2 min y se retira el sobrenadante. Posteriormente, se bloquean los sitios activos de las partículas lavando 4 veces con 1 mL de tampón PBS con albúmina del suero bovino (BSA) al 0,1 %. Los lavados se realizan añadiendo 1 mL de tampón, resuspendiendo las partículas magnéticas en él y retirando el sobrenadante al inmovilizar el tubo sobre el imán durante 1 min.

Finalmente, se resuspenden las partículas magnéticas en 165 µL de tampón PBS BSA 0,1 %, para tener una concentración aproximada de $2 \cdot 10^9$ partículas/mL.

3.4 Captura y elución de IgEs mediante partículas magnéticas conjugadas

Concentraciones conocidas de IgE en PBS se incuban con las partículas magnéticas. Se recurre a un formato de ensayo donde las partículas magnéticas conjugadas se mantienen a la concentración que indica el fabricante como la más óptima, $2 \cdot 10^9$ partículas/mL.

Para la captura, se deja incubar 1 hora a 4 °C en agitación constante. A continuación, se realizan tres lavados con 1 mL de tampón PBS para eliminar las IgEs no unidas a las partículas magnéticas.

Tras el último lavado, se concentran las partículas magnéticas con la ayuda del imán y se elimina el sobrenadante, para poder añadir 100 µL de tampón citrato (0,1 M pH 3,1), que rompe la unión de las IgEs con las anti-IgEs ancladas a las partículas magnéticas. Tras incubar 2 min a temperatura ambiente y en agitación, se recupera el sobrenadante y se lleva a pH neutro con 48,1 µL de tampón Tris-HCl (1 M pH 8,7). Del mismo modo, las partículas magnéticas, se lavan tres veces con 1 mL de tampón PBS 0,1 % BSA para llevarlas a pH fisiológico tras la elución en medio ácido y se resuspenden en PBS para llevarlas a un medio neutro y poder ser reutilizadas tras su almacenamiento.

3.5 Medida del extracto de IgEs

3.5.1 ELISA

Se inmovilizan sobre la superficie de la placa anticuerpos anti-IgEs humanas de ratón por adsorción pasiva, incubando las disoluciones de este anticuerpo toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se lava la placa con PBS-T y se añade una disolución de bloqueo, PBS-T complementado con 0,1 % BSA que se deja incubando en agitación durante 1 hora. Se realiza un lavado de la placa y después se incuba con las fracciones recogidas tras la elución de las IgEs de las partículas magnéticas durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras realizar de nuevo un lavado de la placa, se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente con la disolución de un trazador, un anticuerpo anti-IgEs humanas de cabra marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP; Sigma-Aldrich). Tras ello, se realiza un lavado y se procede al revelado.

Para el revelado se utiliza una disolución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB; Sigma-Aldrich) a 0,25 mg/mL, H₂O₂ (Sigma-Aldrich) 2 mM en tampón citrato (0,1 M pH 5,5) que se deja 10 minutos y posteriormente se para la reacción con 50 µL de H₂SO₄ 2,5 M.

Se lee la absorbancia a 450 nm corregida por la absorbancia del fondo a 650 nm en un espectrofotómetro de placas (Figura 10; Wallac, VICTOR™ 1420 multilabel counter).



Figura 10. Espectrofotómetro de placas utilizado en la medida de la absorbancia del extracto de IgEs cuantificado mediante el método ELISA

3.5.2 Cuantificación de IgEs totales mediante disco

Se ensaya la capacidad de detección de IgEs de 2 anticuerpos monoclonales diferentes. La cuantificación se realiza inmovilizando en disco diferentes disoluciones en tampón carbonato de anticuerpos anti-IgEs humanas.

Tras la incubación, se lava con PBS-T y agua antes de realizar las incubaciones con las diferentes soluciones con concentraciones conocidas de IgEs durante 1 hora a humedad y temperatura ambiente. Para el revelado, se incuba durante 30 minutos con anticuerpo anti-IgE humana marcado con HRP (Sigma-Aldrich). Finalmente se revela incubando durante 8 min el disco con TMB (Sigma-Aldrich). En paralelo a cada ensayo se realiza una curva de calibrado utilizando IgE humana (Abcam).

Tras el revelado del disco, se capta la imagen utilizando el lector de DVD presentado en la Figura 11 y se analiza utilizando un programa propio del grupo (Biodisk). El análisis de las imágenes se realiza tal y como se ha descrito en el punto 3.2.3.



Figura 11. Lector de DVD utilizado en la detección

3.5.3 Cuantificación de IgEs totales y específicas a partir de suero pre-tratado utilizando la tecnología de micromatrices de proteínas en disco

3.5.3.1 Dilución del suero

Se diluyó el suero en Tween® 20 (Scharlau) a una concentración del 0,5 %.

3.5.3.2 Concentración con sulfato amónico

Se preparó una disolución madre saturada de esta sal suministrada por Scharlau (sulfato amónico 4,32 M). El suero se diluyó en suero fisiológico en proporción 1:1. La dilución del suero se llevó al 30 % de sulfato amónico a partir de la disolución madre, realizándose la mezcla en frío lentamente. Se incubó a 4 °C en agitación durante 30 minutos y luego se centrifugó 20 minutos a 4 °C y 3000 g. Se recuperó el sobrenadante y éste se llevó al 60 % de sulfato amónico a partir de la disolución madre repitiéndose de nuevo todo el protocolo realizado anteriormente. Finalizada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 500 µL de suero fisiológico (NaCl 0,9 %). Por último, para eliminar las sales se utilizó un Microcon® 10 kDa Centrifugal Filter Device.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención de los conjugados de amoxicilina

4.2 Inmovilización de los conjugados de amoxicilina en la superficie del disco

4.3 Puesta a punto del sistema de captura de IgEs

4.4 Micromatriz de proteínas

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención de los conjugados de amoxicilina

Con la finalidad de cuantificar las IgEs humanas específicas a amoxicilina presentes en suero mediante un ensayo de micromatrices de proteínas, se debe formar un conjugado proteico de amoxicilina que las capture en la superficie del disco.

4.1.1 Selección de la proteína portadora

Existen numerosas proteínas que pueden conjugarse a la amoxicilina para lograr su inmovilización sobre la superficie de policarbonato del disco. De acuerdo a la experiencia del grupo de investigación basada en diferentes estudios de haptización de plaguicidas, agentes dopantes, etc., se seleccionó la HSA como proteína portadora. Los criterios de selección fueron:

- La albúmina sérica humana tiene un peso molecular de unos 66 kDa, contiene 585 aminoácidos y está cargada negativamente a pH fisiológico, lo que posibilita su inmovilización en disco vía adsorción pasiva su inmovilización vía pasiva. Se compone de tres dominios en hélice, cada uno compuesto por dos subunidades (Figura 12).

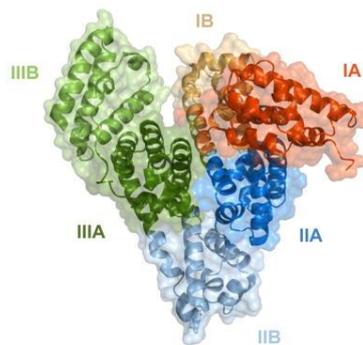


Figura 12. Estructura 3D de la HSA. Cada dominio está marcado con un color y cada subunidad está marcada con una sombra diferente. Protein Data Bank, ID: 1A06. (Majorek *et al.*, 2012)

- En relación a la interacción cruzada, la HSA fue seleccionada frente a la ovoalbúmina o la albúmina de suero bovino para evitar reconocimientos cruzados entre especies. Se pueden producir falsos positivos debidos a la presencia de IgEs humanas frente a proteínas de la leche procedente de cabra/oveja/vacuno o frente a proteínas presentes en el huevo en pacientes alérgicos a dichos alimentos.
- Respecto a la selección de la reacción de conjugación, la HSA contiene 81 residuos de Lys/Arg. Estos aminoácidos contienen grupos amino, capaces de conjugarse con la amoxicilina.

Cabe destacar, que en condiciones fisiológicas, la haptización proteica de la amoxicilina, es un proceso que ocurre en la respuesta alérgica. Sin embargo, el mecanismo implicado en la haptización de fármacos aún se está investigando (Ariza *et al.*, 2012).

4.1.2 Síntesis de los conjugados

El objetivo fue realizar la reacción de conjugación y su posterior purificación para así poder inmovilizar la amoxicilina al disco. Para estudios *in vitro*, existen diferentes reacciones válidas en la conjugación de moléculas a proteínas, como por ejemplo la reacción del anhídrido mixto (Erlanger, 1980; Rajkowski *et al.*, 1977), la reacción del éster activo (Langone y Van Vunakis, 1982; Bauminger y Wilchek, 1980) o la reacción de Mannich (Faraj *et al.*, 1981).

En este trabajo se escogieron las reacciones de Mannich y del éster activo por ofrecer mejores resultados de conjugación con amoxicilina en experimentos anteriores.

- La reacción de Mannich consiste en la condensación de un compuesto que contiene un hidrógeno activo con otro compuesto que contiene uno o varios grupos amino, en presencia de formaldehído. Los conjugados producidos mediante esta reacción contienen enlaces covalentes (Hermanson, 2008). La albúmina sérica contiene múltiples grupos capaces de reaccionar con la amoxicilina en dos sitios activos diferentes, tal y como se observa en la Figura 13.

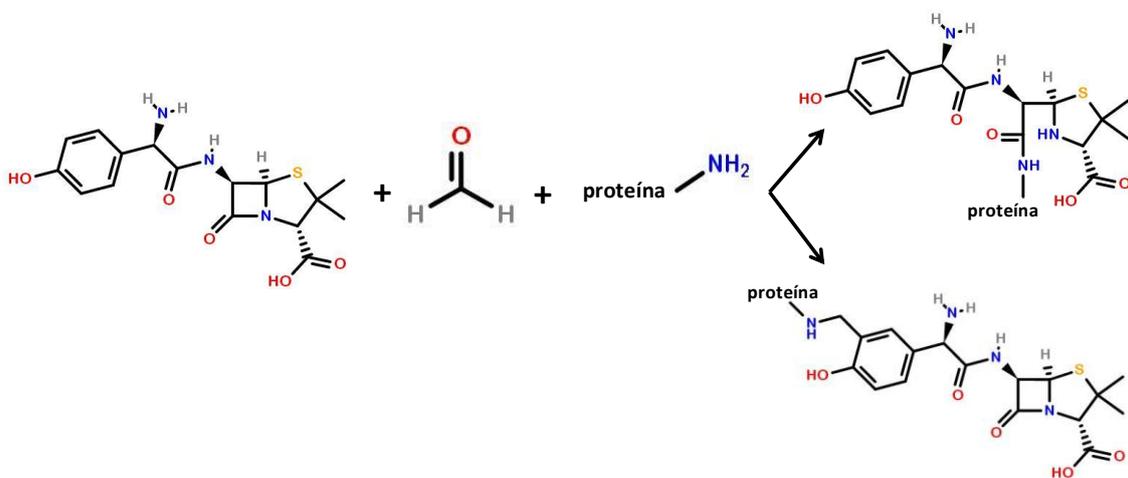


Figura 13. Reacción de conjugación de la amoxicilina mediante la reacción de Mannich.

- La reacción del éster activo se basa en la activación de la amoxicilina en primer lugar y la posterior conjugación con la HSA. El EDC une dos moléculas mediante la formación de un enlace amino entre un grupo carboxílico de una molécula y un grupo amino de la otra. En nuestro caso, tal y como se observa en la Figura 14, el ácido carboxílico presente en la amoxicilina se activó en presencia de EDC y tras ello se añadió la HSA, que contiene múltiples aminas primarias en los residuos aminoácidos.

El compuesto NHS, se añadió a dicho protocolo con la finalidad de mejorar la eficiencia y de crear intermediarios amino-reactivos. El EDC se une con el NHS, formando un compuesto mucho más estable que permite la posterior conjugación con las aminas primarias de la proteína HSA.

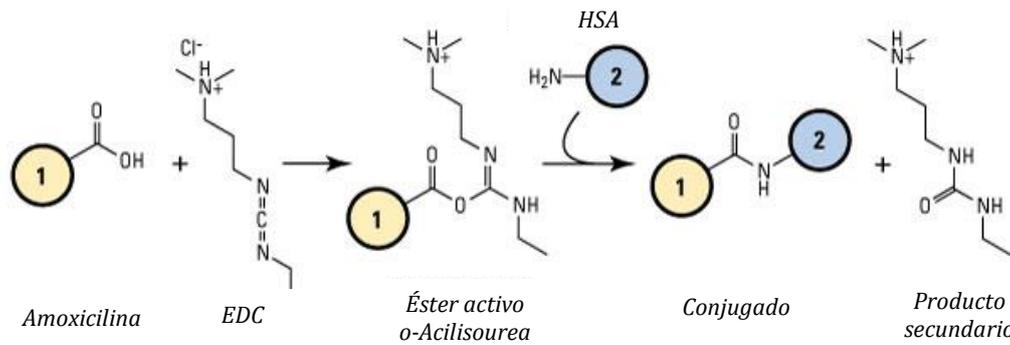


Figura 14. Reacción de conjugación de la amoxicilina mediante la reacción de éster activo (Hermanson, 2008).

Para ambas reacciones, es necesario tener en cuenta que cuantos más residuos activos hayan en la proteína HSA, mayor será el rendimiento de conjugación, sin embargo, únicamente reaccionarán aquellos grupos que estén en la superficie de la proteína. Hay que considerar que la conformación tridimensional de la HSA a menudo bloquea sitios activos e impide el acceso de la amoxicilina para reaccionar y unirse covalentemente.

En los experimentos de síntesis se establecieron relaciones molares amoxicilina:HSA diferentes para cada una de las reacciones propuestas, siendo la HSA el reactivo limitante (Tabla 6). Estudios farmacocinéticos revelaron que *in vivo* la relación molar antibiótico-proteína no supera 2:1 (Ariza *et al.*, 2012). Sin embargo, en este estudio no se pretendió reflejar las condiciones *in vivo*, sino encontrar la relación que permita un mejor reconocimiento de la amoxicilina por parte del anticuerpo en el inmunoensayo realizado *in vitro*.

Tabla 6. Relaciones molares y reacciones testadas.

Reacción de conjugación	Relación molar amoxicilina: HSA
Mannich	25:1
	50:1
	100:1
	200:1
Éster activo	25:1
	50:1
	100:1
	200:1

4.1.3 Caracterización de los conjugados

Se purificaron los conjugados mediante una columna de exclusión molecular, para separarlos de los demás componentes de la reacción no conjugados según su tamaño.

La HSA y los conjugados HSA-amoxicilina no pueden penetrar en los poros de la fase estacionaria sólida y son eluidos en primer lugar, mientras que la amoxicilina (de menor tamaño) penetra en el interior del material poroso de tal forma que la trayectoria recorrida es mucho mayor y permanece más tiempo en la columna.

Se recogieron 20 fracciones de 1 mL (1 mL/minuto) para cada una de las relaciones molares. Se registraron las absorbancias a 280 nm de cada una de las fracciones con la finalidad de obtener los perfiles de elución (Figura 15). A dicha longitud de onda es a la que absorben tanto la HSA como la amoxicilina.

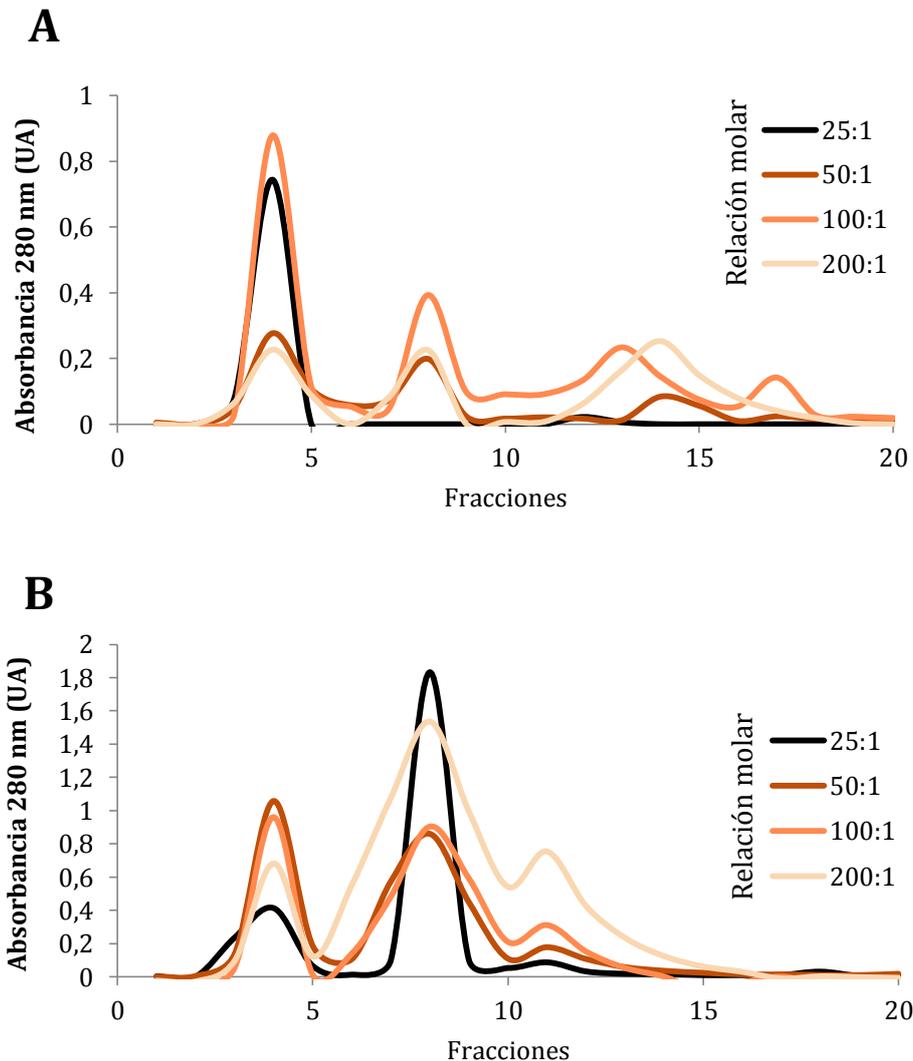


Figura 15. Perfiles de elución de los productos de las reacciones de conjugación obtenidos por la reacción de Mannich (A) y la reacción del éster activo (B) a diferentes relaciones molares amoxicilina:HSA.

En todos los perfiles de elución se observaron dos picos. El *primer pico* (fracciones del 3-5) fue debido a la proteína HSA tanto en su forma libre como en su forma conjugada a la amoxicilina (pequeña variación de la masa molecular). El *segundo pico* (fracciones 7-9) fue originado por la elución de la amoxicilina en exceso en la reacción.

Se realizó una cuantificación proteica mediante el método Bradford para verificar la presencia de HSA. Comparado con otros métodos de cuantificación de proteínas, la principal ventaja de este método es que es muy sensible, siendo capaz de detectar entre 1 y 100 μg de proteína. Además de ésta, presenta muchas ventajas más, siendo uno de los métodos más baratos, ya que sólo se necesita un reactivo. El sistema además de ser rápido (ya que finaliza a los 5 minutos aproximadamente), llega a ser estable hasta una hora, tras la cual los conjugados empiezan a precipitar (Bradford, 1976).

Se realizó una recta patrón con HSA (0 - 1 mg/mL) para estimar la concentración de proteína presente, midiendo la absorbancia a 590 nm de los productos de la reacción colorimétrica. La Figura 16 muestra las concentraciones de proteína HSA en los diferentes extractos de purificación. Se observó una mayor concentración de proteína en la fracción 4 para ambas reacciones.

La cantidad de HSA determinada fue la misma para las diferentes relaciones molares, dado que con esta técnica no fue posible discriminar entre HSA (66.000 Da) y el conjugado HSA-amoxicilina (66.365,4 Da).

La fracción 4 proveniente de la reacción de Mannich contuvo el $65\pm 4\%$ de la proteína eluida proveniente de la reacción de Mannich y un $69,2\pm 1,1\%$ proveniente de la reacción de éster activo. Dicha fracción se utilizará en ensayos posteriores.

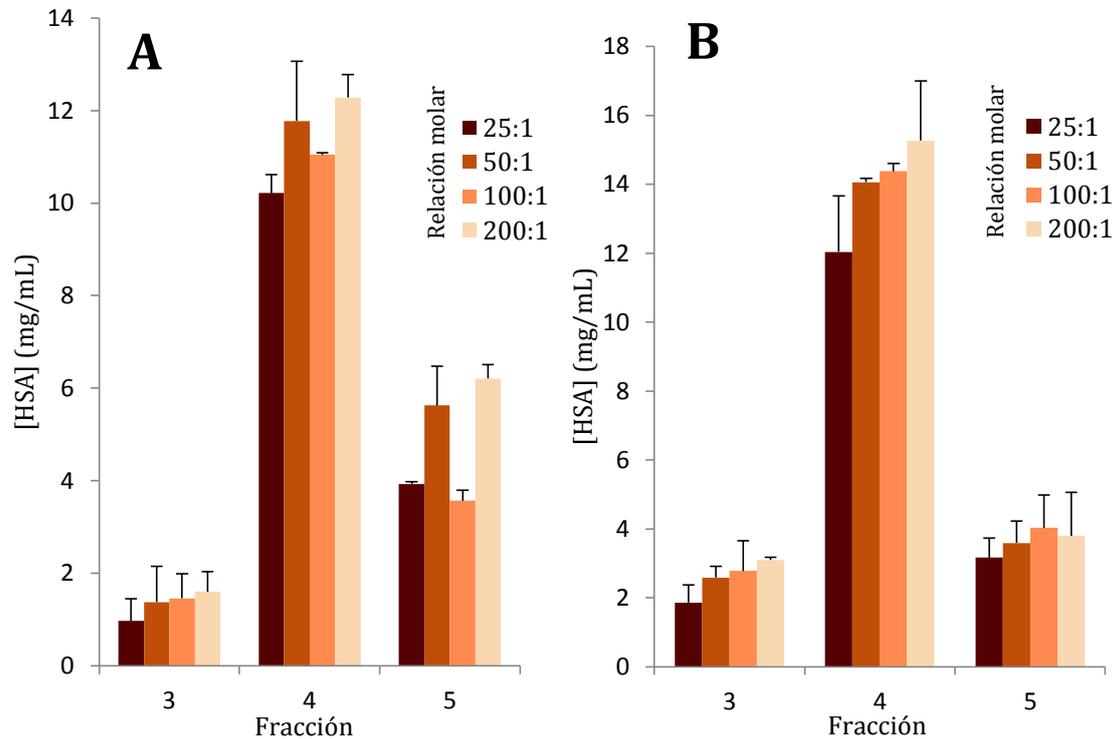


Figura 16. Concentraciones de proteína HSA libre y conjugada en las fracciones 3, 4 y 5 en columna de exclusión molecular para los conjugados procedentes de la reacción de Mannich (A) y para los conjugados procedentes de la reacción de éster activo (B) a diferentes relaciones molares.

4.2 Inmovilización de los conjugados de amoxicilina en la superficie del disco

Con la finalidad de obtener información sobre la cantidad de conjugado sintetizado, se realizó un inmunoensayo utilizando la tecnología de disco compacto. El sistema utilizado fue: conjugados/anticuerpo específico anti-amoxicilina/anticuerpo anti-ratón marcado con oro, según se observa en la Figura 17. Para el revelado, se utilizó Ag^+ dando depósito de plata, reacción catalizada por el oro.

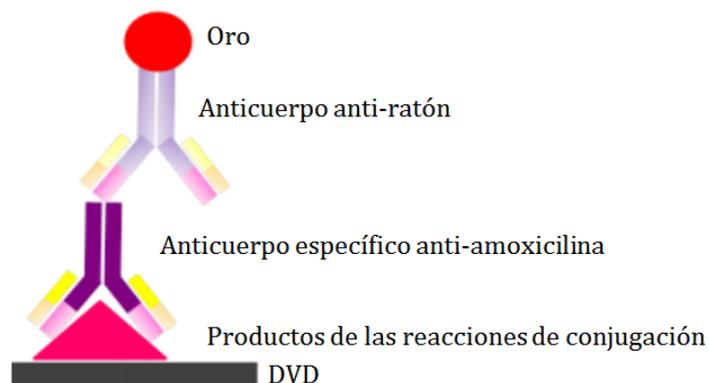


Figura 17. Inmunoensayo utilizado para la optimización de la concentración de conjugado y la concentración de anticuerpo primario.

4.2.1 Optimización del tampón de inmovilización

Los tampones de inmovilización son claves para el correcto anclaje de los conjugados. Se estudió el efecto del tampón de inmovilización, utilizando el tampón carbonato (pH 9,2) y el tampón PBS (pH 7,5).

El conjugado del éster activo (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en disolución tampón fue microimpreso en la superficie del disco (50 nL).

La Figura 18 muestra las diferencias en las SNRs obtenidas en las mismas condiciones de inmovilización y revelado de un conjugado, variando únicamente el tampón de inmovilización. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando tampón carbonato. Las condiciones básicas favoreció la ionización de los residuos y en consecuencia, dando lugar a una adsorción más efectiva de las proteínas a la superficie del disco.

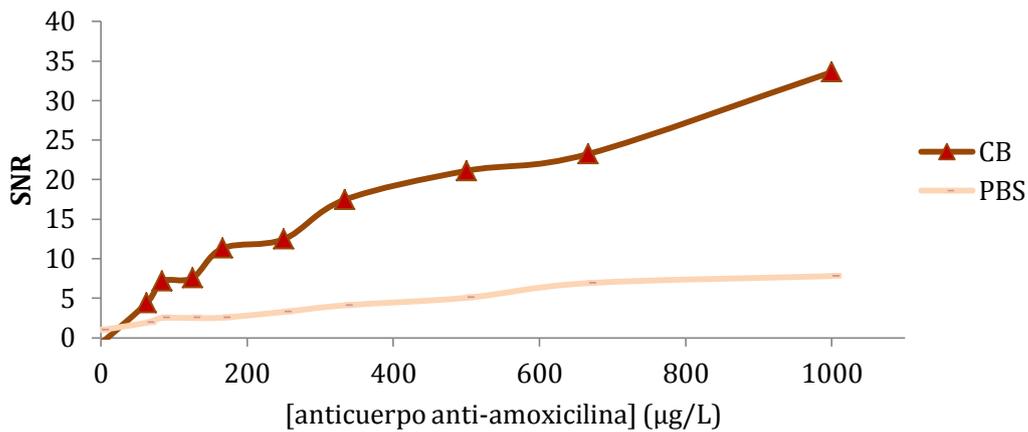


Figura 18. Señal obtenida mediante la inmovilización de los conjugados proteicos utilizando tampón carbonato (CB) o tampón PBS (PBS).

4.2.2 Optimización de la concentración de conjugado

Se inmovilizó mediante adsorción pasiva sobre la superficie de policarbonato del DVD los conjugados sintetizados y purificados en formato de micromatriz. Se utilizó una concentración de anticuerpo anti-amoxicilina de ratón de 1000 $\mu\text{g}/\text{L}$ y una concentración de anticuerpo anti-ratón marcado con oro de 10000 $\mu\text{g}/\text{L}$. La Figura 19 muestra una de las micromatrices obtenidas.

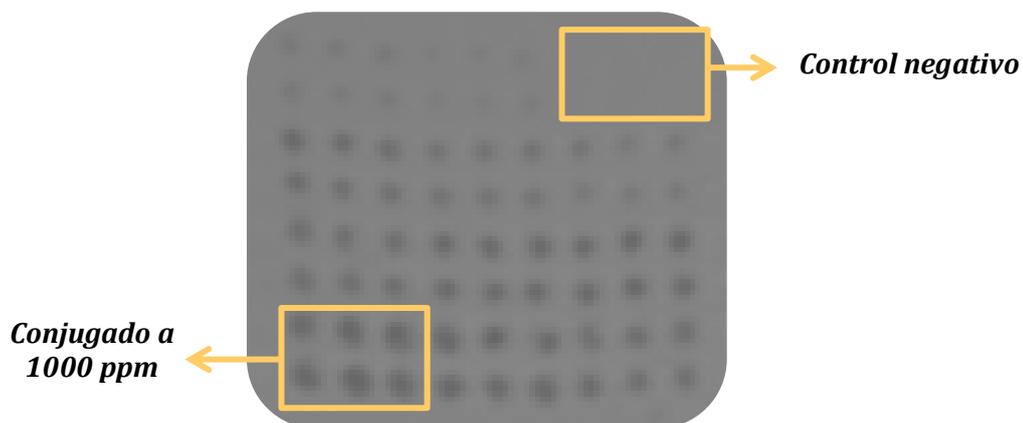


Figura 19. Micromatriz proteica obtenida inmovilizando 11 concentraciones diferentes del conjugado proveniente de la reacción de éster activo, relación molar 50:1 más un control negativo. Se imprimieron 12 bloques con 6 réplicas.

En la Figura 20 se muestran los valores de señal obtenidos al inmovilizar en disco diferentes concentraciones de conjugados obtenidos para las diferentes reacciones de síntesis. Las concentraciones óptimas de conjugado fueron aquellas concentraciones que presentaron mayor SNR y mayor reproducibilidad.

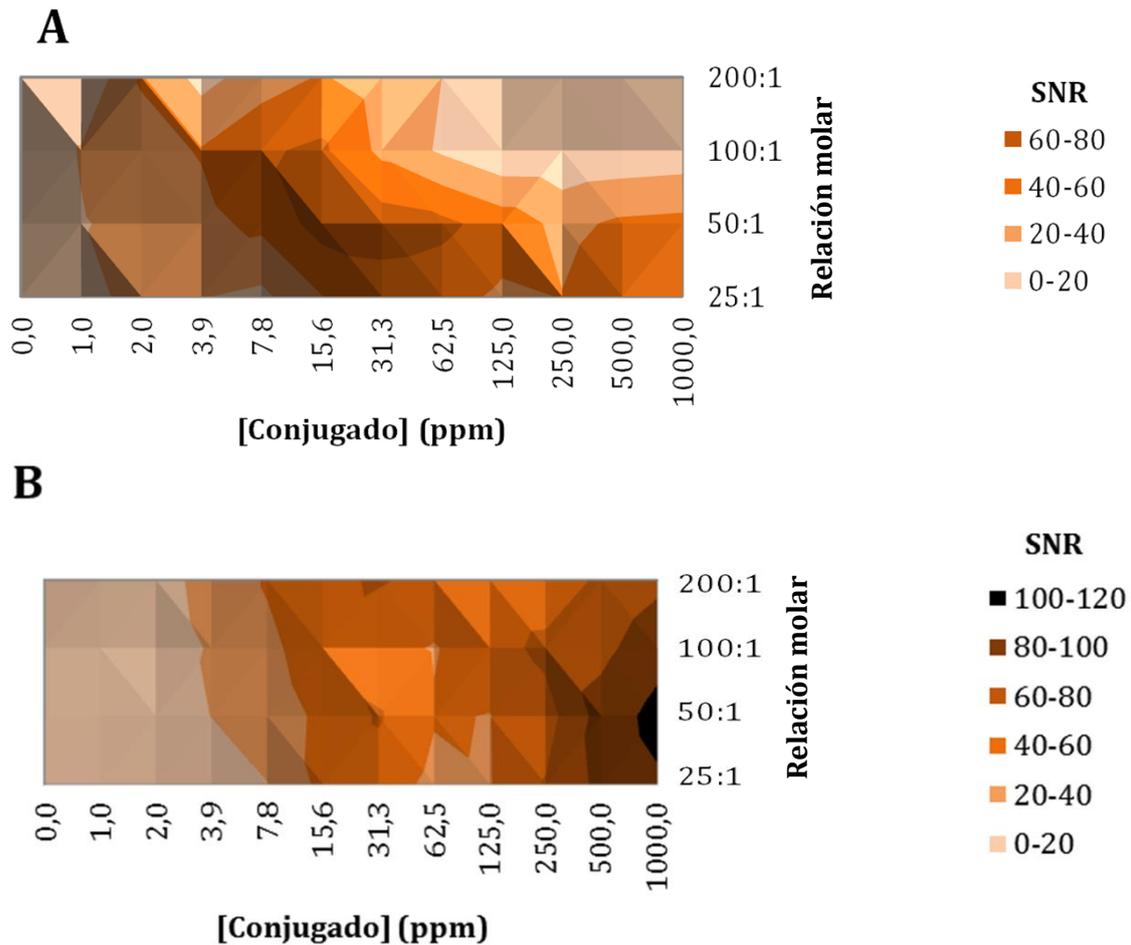


Figura 20. SNR obtenida en función de la concentración de conjugado y la relación molar en la reacción de síntesis: Mannich (A) y éster activo (B).

La inmovilización de los conjugados provenientes de la reacción del éster activo produjo valores de SNR hasta un 50 % más altos que aquellos provenientes de la reacción de Mannich. Sin embargo, para conseguir la máxima señal en disco en los conjugados provenientes de la reacción del éster activo se necesitaron concentraciones de conjugados muy altas.

La Tabla 7 muestra las concentraciones de conjugado pre-seleccionadas. No se realizó la selección definitiva porque podrían variar las condiciones de reconocimiento durante la optimización del ensayo. El reconocimiento del conjugado por parte del anticuerpo dependerá de la disposición y de los sitios activos accesibles, así como su capacidad de ser reconocidos en el revelado.

Tabla 7. Concentraciones de conjugado preseleccionadas para estudio de reconocimiento.

Relación molar	Reacción de Mannich				Reacción del éster activo			
	25:1	50:1	100:1	200:1	25:1	50:1	100:1	200:1
Conjugado [ppm]	31,3	31,3	7,8	31,3	1000	1000	1000	1000

4.2.3 Reconocimiento de la inmunoglobulina

Se realizó un ensayo de reconocimiento en el cual se mantuvo constante la concentración de conjugado y se modificó la concentración de anticuerpo anti-amoxicilina. Para ello, se evaluaron diferentes concentraciones de anticuerpo específico frente a amoxicilina (500 - 42 µg/L) combinado a una concentración fija de anticuerpo secundario marcado con oro (10000 µg/L). También se incluyeron dos controles negativos, uno del anticuerpo primario y otro del anticuerpo secundario. La Tabla 8 nos muestra las respuestas registradas por el detector obtenidas en el ensayo.

Tabla 8. Valores de SNR obtenidos en el ensayo de reconocimiento de la IgE utilizando conjugados inmovilizados procedentes de las reacciones de Mannich (A) y éster activo (B). No detectable (nd) cuando $SNR_{media} < 3$.

		Concentración de anticuerpo anti-amoxicilina (ug/L)							
		500	333	250	167	125	83	63	42
Relación molar (A)	25:1	19,4±1,3	11,4±3,6	17,3±2,6	5,5±3,4	0,1±1,7	3,7±0,9	4,3±0,9	nd
	50:1	30,2±8,6	3,2±2,3	26,9±4,1	7,2±2,5	14,9±3,4	3,8±0,8	5,3±2,5	2,6±0,6
	100:1	51,8±5,1	23,3±3,4	26,1±3,1	11,1±2,4	17,7±2,6	6,6±1,5	10,5±1,4	4,5±0,6
	200:1	42,7±6,7	26,0±4,6	34,4±4,6	14,5±4,4	12,8±1,4	7,4±1,3	10,7±2,2	4,4±0,9
Relación molar (B)	25:1	0,2±1,6	2,9±2,9	3,9±1,3	1,3±1,5	4,6±3,6	1,4±1,7	0,3±0,9	nd
	50:1	16,5±4,2	11,9±1,8	13,7±0,6	3,4±1,2	7,1±1,8	2,9±0,5	4,9±0,8	nd
	100:1	16,9±9,5	8,5±3,1	19,6±2,8	4,7±0,8	8,8±1,5	3,3±0,4	5,7±0,5	nd
	200:1	30,2±5,2	17,1±9,1	19,3±2,3	6,2±2,8	9,7±2,9	6,1±1,6	11,7±3,6	3,3±0,5

Los conjugados que proporcionaron una SNR mayor y menor desviación estándar relativa fueron aquellos provenientes de la reacción de Mannich a una *relación molar de 100:1*. Por lo tanto, se alcanzó el objetivo de sintetizar un conjugado HSA-amoxicilina con prestaciones analíticas adecuadas para ensayos de micromatrices proteicas en términos de sensibilidad y reproducibilidad.

4.3 Puesta a punto del sistema de captura de IgEs

Las IgEs son las inmunoglobulinas menos abundantes en sangre (mil veces inferior a las IgGs). En pacientes sanos, el rango de concentración de IgEs totales es 17-400 ng de IgEs/mL de sangre, mientras que en individuos alérgicos los valores serán ligeramente superiores debido a la producción de las IgEs específicas. Por lo tanto, un reto importante en la determinación de IgEs en suero está en desarrollar un método sensible para detectarlas y cuantificarlas.

4.3.1 Ensayo con muestras séricas

En un proyecto anterior centrado en la detección de biomarcadores sobre suero mediante tecnología de disco compacto, se obtuvo que utilizando Tween® 0,5 % en el tratamiento del suero, se consigue disminuir el ruido de fondo. El Tween® es un detergente no iónico que no desnaturaliza las proteínas, sino que es capaz de solubilizarlas y evitar que se adhieran al DVD. De este modo, se eliminaba parte del efecto matriz del suero sin necesidad de diluir la muestra. También se utilizó la precipitación con sulfato amónico, con el objetivo de concentrar los anticuerpos presentes en el suero.

Este principio se basa en que las proteínas son solubles gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre sus grupos polares y las moléculas de agua (Teijón y Garrido, 2006). Sin embargo, cuando se añade sulfato de amonio, una sal altamente hidrofílica, favorece la agregación y precipitación de las proteínas. La precipitación de los anticuerpos se produce a una saturación de sulfato amónico entre el 30 y 40 % (Rojas-Espinosa, 2006). Utilizando ambas aproximaciones, en el presente TFG se analizó una muestra de suero de un paciente control no alérgico y una muestra de suero de un paciente alérgico a la amoxicilina cedidos por el Grupo de Alergología del Hospital La Fe. La Tabla 9 presenta los resultados obtenidos, tanto para IgEs totales como para IgEs específicas concentradas a partir de precipitación con sulfato amónico y a partir de un tratamiento con Tween® al 0,5 %.

Tabla 9. SNR obtenidas al cuantificar en formato de disco las IgEs obtenidas mediante precipitación con sulfato amónico y tratamiento con Tween® del suero. No detectable (nd) cuando $SNR_{media} < 3$.

		Suero Control		Suero Paciente alérgico	
		Tween 0,5%	Concentración sulfato amónico	Tween 0,5%	Concentración sulfato amónico
SNR	IgEs específicas	nd	nd	nd	3,61±1,78
	IgEs totales	4,15±0,08	nd	5,29±0,01	nd
[IgEs] (ng/mL)	IgEs específicas	nd	nd	nd	106,86±68,53
	IgEs totales	134,37±19,32	nd	165,89±19,38	nd

Los datos observados en la tabla muestran que fue posible cuantificar IgEs a partir del suero pre-tratado con Tween® al 0,5 % o concentración con sulfato amónico. No obstante, se constató la necesidad de un método con mayor capacidad de concentrar las IgEs presentes en suero.

Tal como se observó, se pueden realizar purificaciones proteicas utilizando columnas de afinidad o diferentes precipitaciones específicas, tales como sulfato amónico, ácido caprílico o el dietilaminoetanol. Sin embargo, estos métodos son largos y en ocasiones caros, además pueden dar falsos positivos y bajar la sensibilidad.

el presente TFG se estudió la concentración basada en partículas magnéticas conjugadas a anti-IgEs humanas o inmunocentración.

4.3.2 Síntesis del sistema de captura

La reacción estudiada fue la conjugación de las partículas magnéticas a anticuerpos anti-IgEs. Se seleccionaron las partículas magnéticas Dynabeads® M-270 que son partículas paramagnéticas de 2.8 μm que contienen grupos epoxi en su superficie. Estos grupos se unen covalentemente con grupos tiol y amino primarios presentes en los anticuerpos mediante tiempos de incubación cortos. Las partículas exhiben baja inespecificidad lo cual reduce la necesidad de utilizar agentes de bloqueo. Por otro lado, las partículas permiten una fácil separación magnética. Dichas características hacen que sean ideales para inmunoprecipitación de proteínas.

La reacción de conjugación consistió en la formación de un enlace covalente entre los grupos amino de los anticuerpos o proteínas y los grupos epoxi de las partículas magnéticas (Figura 21).

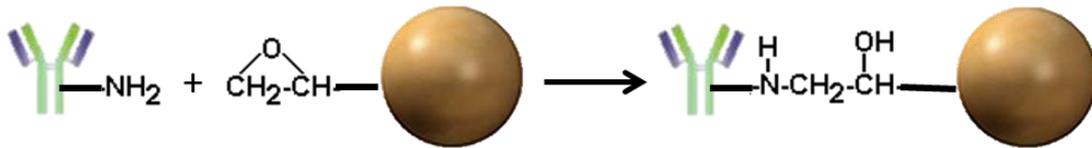


Figura 21. Reacción de conjugación entre los grupos amino de los anticuerpos anti-IgEs y los grupos epoxi de las partículas magnéticas.

La conjugación se realizó manteniendo un exceso de proteína según las recomendaciones del fabricante, y manteniendo 1:3 el volumen de proteína en relación al volumen final de reacción. Para la caracterización de la conjugación, se cuantificaron las proteínas presentes de las disoluciones pre- y post-conjugación mediante el método Bradford.

4.3.2.1 Conjugación con anti-IgEs

Se realizaron dos experimentos de conjugación variando la cantidad de IgEs añadidas, pero manteniendo constante la concentración final.

- El primer ensayo se realizó conjugando 100 μg de anti-IgEs a 5 mg de partículas magnéticas ($3,3 \cdot 10^8$ partículas) en un volumen final de 300 μL . Los datos obtenidos midiendo la absorbancia ($\lambda=590$), mostraron un rendimiento del $4,0 \pm 0,5\%$. Esto es, la unión de 0,8 μg de anticuerpos anti-IgEs por miligramo de partículas.
- En el segundo ensayo se varió el volumen final, siendo éste 100 μL . Se añadieron 33,3 μg de anti-IgEs a 5 mg de partículas magnéticas. Los datos obtenidos midiendo la absorbancia ($\lambda=590$), mostraron un rendimiento del $5,5 \pm 0,5\%$. Lo cual indica una conjugación de 1,1 μg de anticuerpos anti-IgEs por cada miligramo de partículas magnéticas aproximadamente.

Según el fabricante las partículas suelen conjugar 5-10 μg de IgG por miligramo de partículas magnéticas. Por lo tanto, el rendimiento de conjugación con IgEs fue bajo comparado con datos de conjugación de IgGs.

4.3.2.2 Conjugación híbrida (HRP y anti-IgEs)

Se realizó una conjugación híbrida con 20 μg de HRP (a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y 50 μg de anti-IgEs (a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) que permitiera la confirmación de la reacción. Las partículas sintetizadas se incubaron con sustrato TMB, de modo que la HRP catalizó la reacción de oxidación originando un producto coloreado. La medida de la absorbancia confirmó la conjugación de las proteínas a las partículas.

Por otro lado, se realizó la cuantificación proteica de los extractos. Los resultados mostraron una disminución de $16 \pm 7\%$ en el contenido proteico del sobrenadante respecto a la disolución inicial, lo cual significó una conjugación de $2,24 \pm 0,98$ μg de proteína por mg de partículas magnéticas.

4.3.3 Ensayos de captura y elución utilizando partículas magnéticas

Para caracterizar la captura de las IgEs, se utilizó una disolución de 20 μg de IgEs humanas en PBS, se incubaron las partículas magnéticas conjugadas durante 1 hora y se realizó la posterior elución (Figura 9).

Los extractos se cuantificaron realizando un ELISA tipo sándwich. Se tapizó la placa con anticuerpos anti-IgE humana, se incubó con las disoluciones obtenidas tras la captura y elución de las IgEs y se reveló con anticuerpos anti-IgEs marcados con HRP. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura 22.

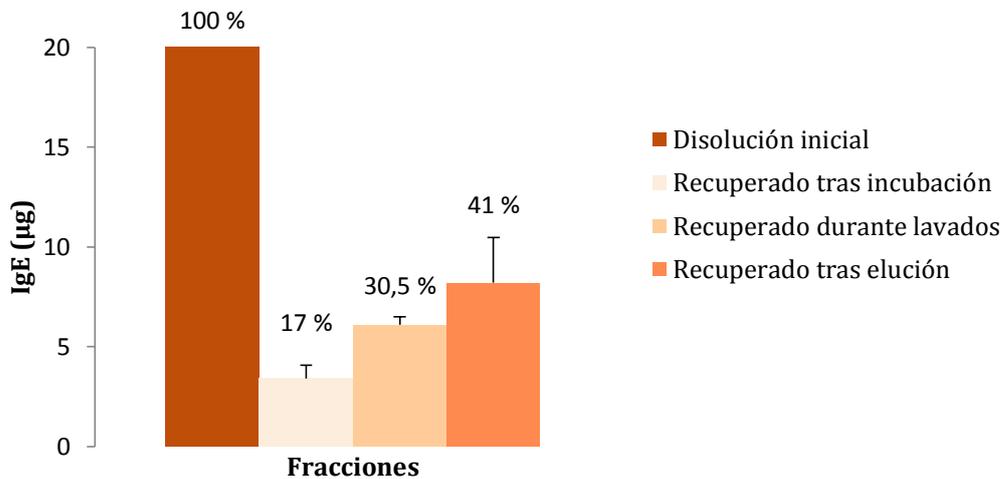


Figura 22. IgE obtenida en ensayo de captura y elución, utilizando partículas magnéticas conjugadas a anticuerpos anti-IgE humana, cuantificada mediante método ELISA.

Los resultados obtenidos mostraron un rendimiento de captura fue de $52,5 \pm 12,3\%$ (9,5 μg), calculado a partir del sobrenadante tras la incubación y los lavados. Por otro lado, se calculó un rendimiento de elución respecto a las capturadas de $78 \pm 21\%$ (8,19 μg). El rendimiento total del ensayo, por lo tanto, fue de $41 \pm 16\%$.

Este ensayo muestra la utilidad de las partículas magnéticas conjugadas en ensayos *in vitro* de recuperación de IgEs en disoluciones de tampón PBS. Sin embargo, futuras investigaciones han de realizarse para mejorar los rendimientos alcanzados.

4.4 Micromatriz de proteínas

4.4.1 Diseño

Se elaboró un formato de micromatrices que permite la cuantificación de IgEs totales y específicas utilizando la tecnología de disco compacto. La Figura 23 muestra la disposición en disco de los reactivos (HSA-amoxicilina y anticuerpo anti-IgE). El sistema contiene controles negativos y positivos con la finalidad de garantizar la calidad de resultados. El control negativo era HSA (dispensado a 1 mg/mL) para detectar falsos positivos en nuestros análisis. El control positivo se realizó con la inmovilización de IgE humana. La concentración de IgE (250 ng/mL).

El conjugado HSA-amoxicilina, obtenido mediante la reacción de Mannich con una relación molar 100:1 fue el conjugado inmovilizado en disco (a 7,81 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para la determinación de IgEs específicas. El anticuerpo anti-IgEs fue inmovilizado para determinación de las IgEs totales.

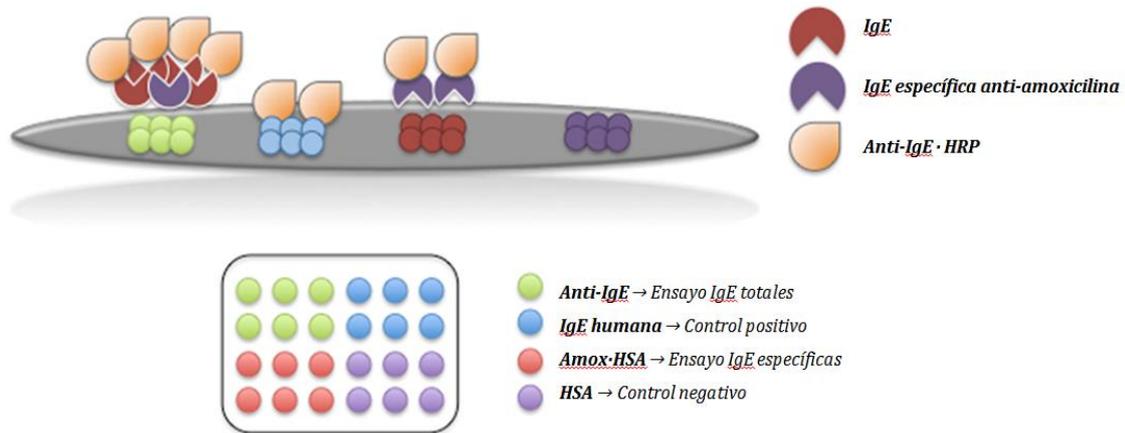


Figura 23. Cuantificación de IgEs totales y específicas anti-amoxicilina, mediante inmunoensayo utilizando la tecnología de disco compacto.

4.4.2 Selección del anticuerpo de inmovilización

Se estudió la cuantificación de IgEs totales inmovilizando dos anti-IgEs provenientes de marcas comerciales diferentes (BioLegend e Ingenasa). Se optimizó la concentración de anticuerpo a inmovilizar, según el ensayo representado en la Figura 24.

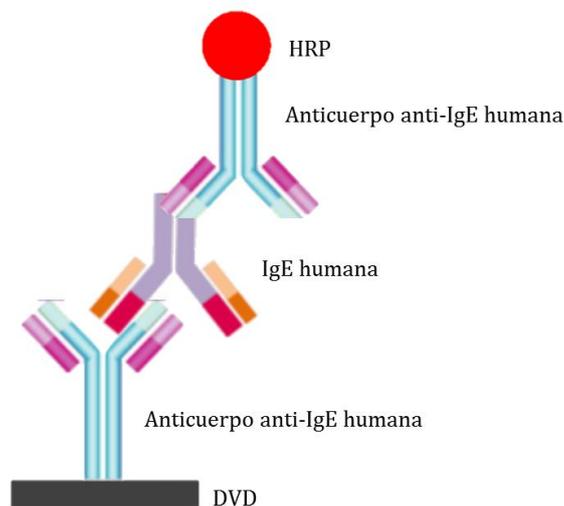


Figura 24. Sistema utilizado en el inmunoensayo de optimización del ensayo en disco.

Se variaron las concentraciones de anticuerpo anti-IgE inmovilizado a la superficie del disco (625–10000 ng/mL en tampón carbonato), así como los patrones de IgE humana para el reconocimiento (0–6061 ng/mL en PBS-T 0,1 % BSA). Las concentraciones de IgEs humanas más pequeñas correspondían con los niveles de IgEs humanas en sangre de pacientes alérgicos.

La Tabla 10 muestra los valores de señal obtenidos utilizando ambos tipos de anticuerpos. Tomando como criterio la SNR máxima obtenida y la ausencia de señales en los controles negativos, se seleccionó el anticuerpo proporcionado por BioLegend a una concentración de 5000 ng/mL. En estas condiciones, se detectaron concentraciones de hasta 8 ng/mL de IgEs.

Tabla 10. SNR obtenida en un inmunoensayo utilizando dos tipos A (BioLegend) y B (Ingenasa) de anticuerpos anti-IgEs humanas inmovilizados, variando la concentración y variando la concentración de IgE humana detectada. No detectable (nd) cuando $SNR_{media} < 3$.

A		[IgEs] (ng/mL)							
		6061	2020	673	224	75	25	8	Control
[Anti-IgE] (ng/mL)	625	26,4±3,2	7,9±3,5	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	1250	38,4±1,0	30,4±10,0	16,6±12,3	10,3±1,8	3,9±2,6	4,0±1,9	nd	3,5±2,3
	2500	30,0±6,4	35,1±5,4	21,2±5,9	14,7±7,6	8,9±2,7	3,6±3,9	nd	nd
	5000	41,9±3,4	33,3±3,1	23,3±1,5	21,5±1,2	15,9±2,1	17,2±2,8	8,8±3,9	nd
	10000	12,4±4,8	11,7±1,8	9,1±4,3	11,7±2,4	10,8±5,6	6,2±3,0	9,7±9,2	8,7±2,1
	Control	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

B		[IgEs] (ng/mL)							
		6061	2020	673	224	75	25	8	Control
[Anti-IgE] (ng/mL) (B)	625	13,7±4,4	3,9±7,3	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	1250	17,5±2,1	5,8±1,5	4,7±2,8	3,2±1,1	nd	nd	nd	nd
	2500	29,4±2,8	19,5±3,9	11,9±1,6	6,2±1,2	3,8±1,2	9,7±2,0	nd	nd
	5000	38,8±1,2	29,3±1,3	20,9±2,1	12,8±2,5	8,3±3,4	5,7±1,4	nd	nd
	10000	48,4±3,3	42,8±4,5	32,5±1,1	27,8±2,2	21,8±2,5	12,9±0,5	9,9±1,4	9,9±1,9
	Control	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

4.4.3 Ensayo con patrones concentrados con partículas magnéticas

Se realizó un ensayo de captura y elución de una disolución con 1 µg de IgEs humanas, empleando las partículas magnéticas híbridas sintetizadas en este proyecto.

Posteriormente, se procedió a la cuantificación de las IgEs recuperadas utilizando el formato en disco propuesto. Tras realizar una curva patrón con IgEs humanas (0-1000 ng/mL), los resultados obtenidos mostraron una recuperación del 49,0±0,5 % de las IgEs añadidas.

Se observó que dicho rendimiento fue comparable al rendimiento total de recuperación obtenido en la cuantificación utilizando el método ELISA. Por lo tanto, se demostró la validez del método basado en micromatrices proteicas en disco compacto para la cuantificación de IgEs totales concentradas utilizando partículas magnéticas conjugadas a anti-IgEs.

Sin embargo, la sensibilidad alcanzada no fue adecuada para la determinación de IgEs específicas dado sus bajos niveles en pacientes alérgicos. Para alcanzar este objetivo, se propone mejorar el rendimiento de inmunoconcentración de las IgEs revisando los protocolos de síntesis de los conjugados partícula magnética-anticuerpo anti-IgE y los protocolos captura-elución.

5. CONCLUSIONES

El TFG ha proporcionado resultados de interés que contribuirán en el desarrollo de un método capaz de diagnosticar pacientes alérgicos a fármacos.

- Los conjugados de amoxicilina-HSA se han sintetizado mediante la reacción de Mannich utilizando una relación molar 100:1. Los conjugados proporcionan respuestas positivas utilizando un anticuerpo específico frente a amoxicilina, indicando que su inmovilización en disco y su uso en el formato de micromatrices de proteínas con la tecnología de disco compacto para cuantificación de IgEs específicas contra amoxicilina son adecuados.
- Se han sintetizado los reactivos para realizar una inmunoconcentración basada en partículas magnéticas. La conjugación de las partículas a anticuerpos anti-IgE ha resultado en un rendimiento del $4,5 \pm 0,5$ % en el caso de las partículas simples y un 16 ± 7 % en el caso de las partículas híbridas, lo cual significa una conjugación de $2,24 \pm 0,98$ μg de proteína por mg de partículas magnéticas.
- La concentración de IgEs mediante partículas magnéticas ha demostrado ser capaz de capturar y eluir IgEs presentes en un modelo *in vitro*. El rendimiento total del proceso resultó ser de 41 % - 49 %, no alcanzando el rendimiento necesario para una cuantificación óptima.
- Se ha optimizado un modelo de ensayo en disco para la cuantificación de IgEs totales y específicas a amoxicilina con control negativo y control positivo. El anticuerpo de la casa comercial BioLegend con una concentración de 5000 ng/mL se ha seleccionado como óptima para cuantificación de IgE totales.
- La cuantificación de IgEs totales y específicas procedentes del suero pre-tratado con Tween® y de la precipitación con sulfato amónico demostró la validez de la tecnología de disco en la cuantificación, sin embargo, reveló que se necesita mayor concentración de las IgEs del suero. Futuras investigaciones deben hacerse para utilizar las partículas magnéticas conjugadas como método de concentración directo a partir del suero.

Los resultados alcanzados en este TFG muestran el camino a seguir para poder llegar a cuantificar IgEs provenientes de suero de pacientes reales mediante un método *in vitro* sencillo y rápido, evitando los ensayos *in vivo*.

Además, los avances que se alcancen podrán hacer que el método sea fácilmente extendido al análisis otros antibióticos betalactámicos, como por ejemplo la penicilina, ampliando la capacidad de multiplexado del método en el diagnóstico de alergias.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ADKINSON, N.F. (1998). Drug allergy, en: *Allergy: Principles and Practice*. 5ª Edición. Elliot Middleton. St. Louis, 86: 1212-1225.
- ALERGOLÓGICA 2005 (2006). Factores Epidemiológicos, Clínicos y Socioeconómicos de las enfermedades alérgicas en España en 2005. *Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica y Alergia*. Schering Plough. Egraf S.A. Madrid.
- ALPIZAR, Y. (2000). La penicilina y sus derivados como agentes desencadenantes de la respuesta inmune. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 16: 99-104.
- ARIZA, A.; COLLADO, D.; VIDA, Y.; MONTÁÑEZ, M.I.; PÉREZ-INESTROSA, E.; BLANCA, M.; TORRES, M.J.; CAÑADA, F.J.; PÉREZ-SALA, D. (2014). Study of Protein Haptentation by Amoxicillin Through the Use of a Biotinylated Antibiotic. *Clinical and Translational Allergy*, 4(3): 37.
- ARIZA, A.; GARZON, D.; ABÁNADES, D.R.; DE LOS RÍOS, V.; VISTOLI, G.; TORRES, M.J.; CARINI, M.; ALDINI, G.; PÉREZ-SALA, D. (2012). Protein haptentation by amoxicillin: High resolution mass spectrometry analysis and identification of target proteins in serum. *Journal of Proteomics*, 77: 504-520.
- ARRIBA-MÉNDEZ, S. (2010). Reunión de primavera de la SCCALP. Mesa redonda: Inmunología. Novedades en el diagnóstico y tratamiento de la alergia a los medicamentos en los niños. *Boletín de la Sociedad de Pediatría de Asturias, Cantabria, Castilla y León*, 50: 87-92.
- BAUMINGER, S.; WILCHEK, M. (1980). The use of carbodiimides in the preparation of immunizing conjugates. *Methods in Enzymology*, 70: 151-159.
- BLANCA, M. (1999). Natural evolution of skin test sensitivity in patients allergic to β -lactam antibiotics. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103: 918-924.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Chemistry*, 72: 248-254.
- BRANDER, C.; MAURI-HELLWEG, D.; BETTENS, F.; ROLLI, H.; GOLDMAN, M.; PICHLER, W.J. (1995). Heterogeneous T cell a response to beta-lactam-modified self-structures are observed in penicillin-allergic individuals. *Journal of Immunology*, 155(5): 2670-2678.
- CABALLERO, F. (2009). Alergológica 2005. Methodological Aspects and Sample Characteristics of the Study. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 19(2): 2-6.
- CAMPOS, J.; FERECHE, M.; LAZARO, E.; DE ABAJO, F.; OTEO, J.; STEPHENS, P. (2007). Surveillance of outpatient antibiotic consumption in Spain according to sales data and reimbursement data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60: 698-701.
- CORTADA, J.M.; LÓPEZ, M.C.; BLASCO, A.; MAYORGA, C.; TORRES, M.J. (2007). Introducción, conceptos generales, epidemiología. Fisiopatología: los fármacos como antígenos, en: *Tratado de Alergología*. Ergon. Madrid, 1297 pp.
- DESWARTE, R.D. (1993). Drug allergy, en: *Allergic Diseases. Diagnosis and Management*. 4ª Edición. Lippincott Company Editorial. Philadelphia, 16: 395-554.
- ERLANGER, B.F. (1980). The preparation of antigenic haptent-carrier conjugates: a survey. *Methods in Enzymology*, 70: 85-104.
- ESCOLANO, F.; SIERRA, P. (1996). Reacciones alérgicas durante la anestesia. *Revista Española de Anestesiología y Reanimación*, 43: 17-26.

- FARAJ, B.A.; FAROUK, M. A. (1981). Development and application of a radioimmunoassay for tetracycline. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 217: 10-14.
- FERECH, M.; COENEN, S.; MALHOTRA-KUMAR, S.; DVORAKOVA, K.; HENDRICKX, E.; SUETENS, C.; GOOSSENS, H. (2006). European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58: 401-407.
- FERNÁNDEZ, J.; PEDRAZ, J. (2007). Síndrome de hipersensibilidad a fármacos. *Seminarios de la Fundación Española de Reumatología*, 8: 55-67.
- FONTAINE, C.; MAYORGA, C.; BOUSQUET, P.J.; ARNOUX, B.; TORRES, M.J.; BLANCA, M.; DEMOLY, P. (2007). Relevance of the determination of serum-specific IgE antibodies in the diagnosis of immediate beta-lactam allergy. *Allergy*, 62(1): 47-52.
- GELL, P.G.H.; COOMBS, R.R.A. (1963). The classification of allergic reactions underlying disease, en: *Clinical Aspects of Immunology*. Blackwell Science Publications. Oxford, 217-237.
- GINER, M.T. (2013). Alergia a medicamentos. Conceptos básicos y actitud a seguir por el pediatra. *Pediatría Integral*, 17(9): 637-651.
- GREDILLA, E.; GIMENO, M.; LONGARELA, A.; ARCO, J.; QUEVEDO, M.A. y BARRANCO, P. (2000). Sospecha de reacción adversa tipo alérgico a los AINEs en una neuralgia por herpes zóster agudo en territorio del trigémino. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 7: 258-262.
- HERMANSON, G.T. (2008). *Bioconjugate Techniques*. 2ª Edición. Academic Press. USA, 1202 pp.
- INGRAHAM, J.L.; INGRAHAM, C.A.; NIETO, J.J.; QUESADA, E.; VENTOSA, A. (1871). *Introducción a la Microbiología*. Reverté.
- TEIJÓN, J.M.; GARRIDO, A. (2006). *Fundamentos de bioquímica estructural*. 2ª Edición. Editorial Tébar, S. L. España, 444 pp.
- KINDT, T.J.; GOLDSBY, R.A.; OSBORNE, B.A. (2007). *Inmunología de Kuby*. McGraw-Hill Interamericana. México. 699 pp.
- LANGONE, J.J.; VAN VUNAKIS, H. (1982). Radioimmunoassay of nicotine, cotinine and g-3-(-piridyl)-g-oxo-N-methylbutyramide. *Methods Enzymology*, 84: 628-640.
- LOBERA, T. (2012). ¿Qué es la alergia a los medicamentos?, en: *Libro de las enfermedades alérgicas de la fundación BBVA*. Editorial Nerea, S.A. España, 283-289.
- LÓPEZ, M. (2005). Estandarización de IgE específica. *Documento consenso del comité de Inmunología Clínica de la SEAIC*, 22 pp.
- MAJOREK, K.A.; POREBSKI, P.J.; AYAL, A.; ZIMMERMAN, M.D.; JABLONSKA, K.; STEWART, A.J.; CHRUSZCZ, M.; MINOR, W. (2012). Structural and immunologic characterization of bovine, horse and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology*, 52(3-4): 174-182.
- MARTÍN, M.; GUDIOL, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(1): 42-55.
- MORAIS, S.; TAMARIT-LÓPEZ, J.; CARRASCOSA, J.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, Á. (2008). Analytical prospect of compact disk technology in immunosensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391: 2837-2844.
- MORAIS, S.; TORTAJADA-GENARO, L.A.; ARNADIS-CHOVER, T.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, Á. (2009). Multiplexed Microimmunoassays on a Digital Versatile Disk. *Analytical Chemistry*, 81: 5646-5654.
- PONVERT, C.; LE CLAINCHE, L.; DE BLIC, J.; LE BOURGEOIS, M.; SCHEINMANN, P.; PAUPE, J. (1999). Allergy to beta-lactam antibiotics in children. *Pediatrics*, 104(4): 45.

- RAJKOWSKI, K.M.; CITTANOVA, N.; DESFOSES, B.; JAYLE, M.F. (1977). The conjugation of testosterone with horseradish peroxidase and a sensitive enzyme assay for the conjugate. *Steroids*, 29: 701-713.
- RIPOLL, M.A.; ORERO, A.; GONZÁLEZ, J. (2002). Prescripción de antibióticos en Atención Primaria en España. Motivos y características. *Medicina General*, 48: 785-790.
- ROJAS-ESPINOSA, Ó. (2006). *Inmunología (de memoria)*. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. México, 529 pp.
- SERNA, M.C.; RIBES, E.; REAL, J.; GALVÁN, L.; GASCÓ, E.; GODOY, P. (2011). Alta exposición a antibióticos en la población y sus diferencias por género y edad. *Atención Primaria*, 43(5): 236-244.
- SOLÉ, J.; RODRÍGUEZ, G.; GRAHIT, V.; JUNCADILLA, E. (2004). *Revista Atención Primaria*, 34(3): 128-133.
- TORTAJADA-GENARO, L.A.; SANTIAGO-FELIPE, S.; MORAIS, S.; GABALDÓN, J.A.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, Á. (2012). Multiplexed DNA detection of food allergens on a digital versatile disk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 36-43.
- VAN BOECKEL, T.P.; GANDRA, S.; ASHOK, A.; CAUDRON, Q.; GRENFELL, B.T.; LEVIN, S.A.; LAXMINARAYAN, R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(8): 742-750.
- VANARSDEL, P.P. (1994). Trastornos por hipersensibilidad, en: *El Manual Merck*. 9ª Edición. Doyma libros, S.A. España, 351-382.
- WHO (1973). The use of computers in international drug monitoring. *WHO Chronicle*, 27: 476-480.
- XUE, T.; SONG, K.; XUE, X.P. (2011). Synthesis of artificial antigens of amoxicillin and preparation of monoclonal antibody to amoxicillin. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 27(7): 770-772.

