



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA
I DEL MEDI NATURAL

Trabajo Fin de Grado en Biotecnología

Aproximaciones analíticas para el diagnóstico *in vitro* de reacciones alérgicas

Curso académico 2018-2019

València, julio 2019 València

Autora: Cristina Serrano Pelejero

Tutor: Sergi Morais Ezquerro

Tutora experimental: M^a José Juárez Rodríguez



Aproximaciones analíticas para el diagnóstico *in vitro* de reacciones alérgicas

València, julio 2019

RESUMEN

La alergia a fármacos, y en concreto a antibióticos β -lactámicos, tiene cada vez una mayor incidencia (del 5 al 15%). A pesar de este elevado porcentaje, los antibióticos β -lactámicos, sobre todo amoxicilina y penicilina, siguen siendo uno de los fármacos más prescritos y distribuidos en la Unión Europea, por lo que es interesante disponer de pruebas de diagnóstico para una prescripción más segura de estos.

Por este motivo, en este trabajo se plantea el desarrollo de metodologías y nuevas aproximaciones analíticas que permitan la detección y cuantificación de niveles de IgE específicas a antibióticos β -lactámicos en muestras de suero humano, utilizando la tecnología de disco compacto. Con las aproximaciones desarrolladas se plantea abordar estudios que permitan una mejor selección y dosificación de antibióticos de acuerdo a los resultados analíticos.

Palabras clave: antibióticos β -lactámicos; alergia; IgE específica; micromatriz; Disco compacto

Analytical approaches for *in vitro* diagnostic of allergic reactions

València, July 2019

ABSTRACT

Drug allergy, especially β -lactam antibiotics allergy, has an increasing incidence (5 to 15%). Although this high percentage, β -lactam antibiotics, mostly amoxicillin and penicillin, are still one of the most drugs prescribed and distributed in the European Union, making it interesting to develop diagnostic tests that allow for a safer prescription.

For this reason, in this work the development of different methodologies is proposed, as well as new analytical approaches which allow the determination IgE in human serum, using compact disc technology. With these approaches, different studies that allow a better selection and dosage of antibiotics are approached, according to the analytical results.

Key words: β -lactam antibiotics; allergy; specific IgE; microarray; compact disc.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que me han ayudado tanto en la realización de este Trabajo Fin de Grado como durante estos cuatro años de mi vida.

Gracias a Sergi Morais, tutor de este trabajo, por tu paciencia, dedicación y preocupación por ayudarme a conseguir un buen resultado final. Gracias por todo lo aprendido en estos meses.

A MJ Juárez, por guiarme en la parte experimental, por atender mis dudas aun cuando había días que no pudieras estar para nadie, por todo el material que te he “cogido prestado” y por ser el alma del laboratorio.

A todos los investigadores del laboratorio, por hacerme sentir una más en el grupo y hacer que las horas se pasaran un poco más rápido.

A mis amigos, en especial a Mauro y a Sergi, compañeros inigualables de TFG, por animarme a seguir, aguantarme y por crecer conmigo a lo largo de estos cuatro años.

Gracias, infinitas gracias, a mi madre y mi padre, por apoyarme durante todo el camino y ayudarme a ver más allá siempre que he sentido que no podía más. Sois y seréis siempre lo más importante en mi vida.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Alergia	1
1.2. Alergia a antibióticos	2
1.3. Diagnóstico de la alergia a antibióticos β -lactámicos	5
1.3.1. Pruebas <i>in vivo</i>	5
1.3.2. Ensayos <i>in vitro</i> para la cuantificación de IgE	6
1.3.2.1. IgE total sérica	7
1.3.2.2. IgE específica a alérgenos	7
1.3.2.2.1. Inmunoensayos	8
1.4. Formatos de ensayo alternativos	10
1.4.1. Microarrays	10
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. Reactivos y materiales	12
3.2. Protocolo del inmunoensayo	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
4.1. Selección del anticuerpo de captura para la determinación de IgE total	14
4.2. Efecto matriz en la determinación de IgE	16
4.3. Métodos de calibración alternativos	18
4.3.1. Calibración interna	18
4.3.2. Calibración homóloga para IgE específica a amoxicilina y penicilina G	20
4.4. Estandarización de señales utilizando un patrón interno	22
4.5. Análisis de muestras de suero	26
5. CONCLUSIONES	29
6. BIBLIOGRAFÍA	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de las familias de antibióticos β -lactámicos. Fuente: Blumenthal et al., 2019.

Figura 2. Rutas de haptización de penicilinas. Fuente: Castells y Bonamichi-Santos, 2019.

Figura 3. Métodos *in vivo* de diagnóstico de la alergia a antibióticos β -lactámicos: *prick test* (A) y prueba de intradermorreacción (B) Fuente: Sánchez-González et al., 2013.

Figura 4. Representación gráfica de los inmunoensayos comerciales ImmunoCAP (ThermoFisher), Immulite 2000 (Siemens) y Hytech 288 Plus (Hycor). Fuente: Goikoetxea et al., 2013.

Figura 5. Sistema de impresión BioDot (A) y esquema de los reactivos impresos en formato *microarray* sobre el DVD (B).

Figura 6. Lector de discos DVD Lab-Player.

Figura 7. Esquemas del inmunoensayo para A) la determinación de IgE total, utilizando el estándar WHO 72/702, B) determinación de IgE específica, y calibración interna utilizando los controles positivos de la primera (C) y segunda etapa (D) del ensayo.

Figura 8. Curvas de calibración obtenidas con Omalizumab, anticuerpo policlonal anti-IgE humana y el receptor Fc ϵ RI como anticuerpos de captura (n=4).

Figura 9. Curvas de calibración obtenidas utilizando diferentes concentraciones de Omalizumab como anticuerpo de captura (40, 20 y 10 mg/L) (n=4).

Figura 10. Curvas de calibrado de IgE total en PBST y suero de conejo. (n=10).

Figura 11. Curva promedio (n=20) de IgE total con el estándar WHO 75/502 utilizando Omalizumab (20 mg/L) como anticuerpo de captura.

Figura 12. Relación entre los coeficientes de variación con la concentración de WHO en las curvas de calibración interna.

Figura 13. Curvas de calibración de WHO e interna.

Figura 14. Curvas de calibración WHO heteróloga y homólogas para IgE específicas a amoxicilina (AMX) y penicilina (PG).

Figura 15. Curva de calibración interna y curvas de calibración homóloga para IgE específicas a amoxicilina y penicilina.

Figura 16. Relación de concentraciones del patrón interno (IgE quimera) diluido en suero libre de IgE (n=7).

Figura 17. Relación entre las señales obtenidas para IgE específica a amoxicilina y penicilina y el patrón interno qIgE-Azt al realizar dos diluciones seriadas (n=2).

Figura 18. Curva de calibración del patrón interno qIgE para IgE específicas a amoxicilina (n=3).

Figura 19. Esquema del *microarray* utilizado en el análisis de muestras de suero.

Figura 20. Correlación Pearson de los resultados de ImmunoCAP y los obtenidos mediante la calibración interna para IgE específica a amoxicilina (A) y a penicilina G (B).

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad según Gell y Coombs. Fuente: Kindt et al., 2007.

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

Tabla 3. Resultados comparativos entre los métodos de cuantificación externos e internos (A) para IgE específicas a amoxicilina y penicilina G.

Tabla 4. Cuantificación de IgE específicas a amoxicilina (A) y penicilina (B) mediante el método del patrón interno (PI).

Tabla 5. Resultados de la cuantificación del análisis de muestras de suero, utilizando las curvas de calibrado WHO, interna y homóloga para IgE específica de amoxicilina (AMX) y penicilina G (PG).

ABREVIATURAS

AMX: Amoxicilina

AZT: Aztreonam

BSA: Albúmina de suero bovino

GAM-HRP: IgG de cabra anti-IgG de ratón marcado con la enzima peroxidasa de rábano.

HRP: Peroxidasa de rábano

HSA: Albúmina de suero humano

LD: límite de detección

PBS: tampón fosfato salino

PBST: tampón fosfato salino con 0,05% de Tween-20.

PG: Penicilina G, Penicilina, Bencilpenicilina

qIgE: IgE quimera

TMB: 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina

WHO: Organización Mundial de la Salud

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Alergia

Etimológicamente, la palabra alergia significa reacción extraña, y en medicina la alergia es considerada como una enfermedad debida a una reacción de hipersensibilidad del sistema inmune producida en respuesta a sustancias ajenas al organismo, llamadas antígenos, que en condiciones normales no causan ninguna reacción adversa (Shearer y Fleisher, 2003). Todos los antígenos son reconocidos por linfocitos específicos del huésped, sin embargo, sólo algunos son capaces de activarlos y generar anticuerpos en respuesta a su entrada, uniéndose a estos específica y reversiblemente (Abbas y Lichtman, 2008).

Estas reacciones de hipersensibilidad se clasifican según Gell y Coombs en 4 categorías diferentes, atendiendo a su modo de acción. En la Tabla 1 se muestran los mediadores, mecanismos y ejemplos de manifestaciones y alérgenos típicos de los diferentes tipos de hipersensibilidad.

Tabla 1. Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad según Gell y Coombs. Fuente: Kindt et al., 2007.

Hipersensibilidad	Mediador	Mecanismo	Manifestaciones	Alérgenos
Tipo I	IgE	El antígeno se une a la IgE fija en la superficie de mastocitos y basófilos, liberando mediadores vasoactivos.	Anafilaxis sistémica, asma, ronchas, eccema.	Pólenes, fármacos, alimento.
Tipo II	IgG o IgM	El anticuerpo media la destrucción de la célula a la que se le ha unido el antígeno, mediante activación del complemento.	Anemia hemolítica autoinmunitaria, eritroblastosis fetal, transfusionales.	Fármacos.
Tipo III	Inmunocomplejos	Antígeno-anticuerpo se depositan en diversos tejidos e inducen la activación del complemento.	Enfermedad del suero, artritis reumatoide, lupus eritematoso diseminado.	Polvos, mohos.
Tipo IV	Células	Las células T _H 1 sensibilizadas liberan citocinas que activan macrófagos.	Dermatitis por contacto, rechazo de injerto.	Virus, hongos, intracelulares, antígenos de contacto.

De los cuatro tipos de hipersensibilidad, la más común es la Tipo I, referida clínicamente como “alergia inmediata” por presentar manifestaciones adversas en la primera hora después del contacto con el antígeno (Romano et al., 2011). Este tipo de hipersensibilidad se caracteriza por la activación de linfocitos Th₂ y la síntesis específica de la inmunoglobulina E.

Los anticuerpos IgE son glucoproteínas que presentan una estructura básica de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas (Abbas y Lichtman, 2008), y con un peso aproximado de 190 kDa (Hamilton, 2003). La secuencia típica de acontecimientos que desencadenan una reacción de hipersensibilidad inmediata comienza con una primera exposición al antígeno, activando los linfocitos Th₂ específicos; producción de anticuerpos IgE,

y unión a los receptores de Fc de los mastocitos, los cuales se activarán cuando el individuo vuelva a exponerse al antígeno de modo que, en ese acontecimiento, los mastocitos liberarán una serie de mediadores, generando la reacción patológica.

Los antígenos que provocan reacciones de hipersensibilidad inmediata, también llamados alérgenos, son proteínas o sustancias químicas unidas a proteínas a las que la persona alérgica se expone de manera continua, desviando la producción de IgG a IgE (Abbas y Lichtman, 2008).

Los alérgenos tienen orígenes muy diversos, pudiendo ser desde alimentos a medicamentos. Aquellos que pueden interactuar directamente con el sistema inmune y generar una respuesta inmune son mayoritariamente macromoléculas que poseen una masa molecular elevada, como son la insulina y otras hormonas (Torneró, P. Fundación BBVA). Los medicamentos pueden generar diversas reacciones adversas en el paciente, la mayoría de ellas, conocidas como reacciones tipo A, relacionadas principalmente con su acción farmacológica (Giner, 2013). Sin embargo, entre un 5 y un 10% de las reacciones adversas responden a mecanismos inmunológicos (Mayorga et al., 2017). Estas reacciones adversas se conocen como tipo B y son independientes de la acción farmacológica del medicamento (Giner, 2013). Así pues, en principio cualquier fármaco es capaz de provocar una reacción de hipersensibilidad (Castells & Bonamichi-Santos, 2019), siendo los antibióticos los fármacos de baja masa molecular que con más frecuencia producen reacciones de hipersensibilidad, debido principalmente a una mayor exposición a estos (Blanca et al., 2001).

1.2. Alergia a antibióticos

Los antibióticos son fármacos capaces de evitar el desarrollo de ciertos organismos patógenos. Estos se clasifican en dos grandes familias, atendiendo a su estructura: β -lactámicos y no β -lactámicos. Los antibióticos no β -lactámicos presentan estructuras e inmunogenicidades diferentes entre ellos (Doña et al., 2017).

Por otra parte, los antibióticos β -lactámicos se dividen en subfamilias (Figura 1). Todos ellos presentan una estructura química general que consiste en un anillo de 4 miembros (3 carbonos y 1 nitrógeno) conocido como anillo β -lactama. Este anillo está condensado, excepto en antibióticos monobactámicos, junto a otro anillo que varía en cada grupo, pudiendo ser de 5 o 6 miembros. Además, todas las subfamilias, excepto los clavámicos, presentan cadenas laterales diferentes, pudiendo ser subdivididos en diferentes clases. Por ejemplo, la familia de las penicilinas agrupa compuestos como la penicilina G (bencilpenicilina), amoxicilina o ampicilina (Ariza et al., 2015).

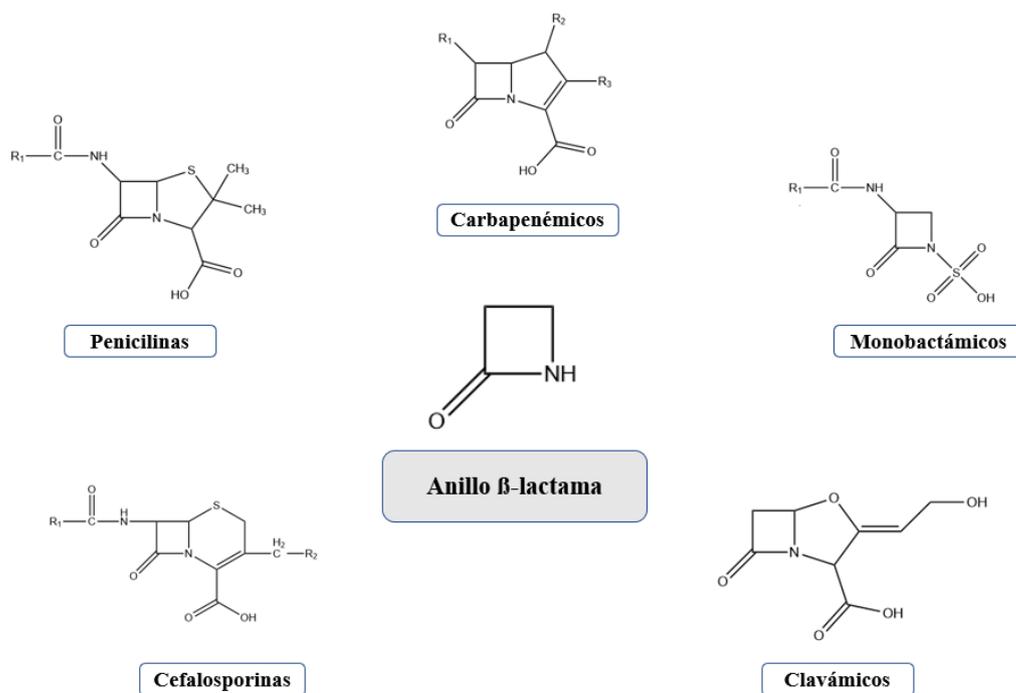


Figura 1. Estructura química de las familias de antibióticos β -lactámicos. Fuente: Blumenthal et al., 2019.

Los antibióticos β -lactámicos son la familia más numerosa de antibióticos y también la más utilizada clínicamente, siendo actualmente los más consumidos a nivel mundial: su uso aumentó en un 65% entre los años 2000 y 2015 en países en desarrollo (Chiriac et al., 2019) y se estima que si su consumo continúa al ritmo actual, éste se incremente en un 202% en 2030. Según indican Doña *et al.* (2017), del total de pacientes con alergia confirmada a fármacos, el 18% son alérgicos a antibióticos β -lactámicos. Otros antibióticos que causan alergias son las quinolonas (7%), macrólidos (2%), metronidazol (1,8%), y clindamicina y sulfonamidas (< 1%). También los antibióticos no β -lactámicos pueden provocar reacciones de hipersensibilidad inmediata, como la gentamicina y estreptomina, pero en mucha menor medida que los antibióticos β -lactámicos ya que su consumo es mucho menor (Baldo et al., 2001).

Aunque los antibióticos β -lactámicos pueden generar los 4 tipos de reacciones de hipersensibilidad descritas anteriormente, las más comunes son la Tipo IV (no inmediata), mediada por células T específicas, y la Tipo I (inmediata), mediada por inmunoglobulina E específica, siendo además esta última la mejor caracterizada (Blanca et al., 2001; Doña et al., 2017).

Como la mayoría de los fármacos, los antibióticos β -lactámicos son pequeñas moléculas que por sí solas no generan respuesta en el sistema inmune (haptenos), si no que requieren de una proteína portadora para ser reconocidos por los anticuerpos (Castells y Bonamichi-Santos, 2019). El proceso por el que un hapteno se une a una proteína portadora se conoce como haptenización. En este proceso, el hapteno se une covalentemente a una proteína que puede ser tanto de origen sérico (globulinas o albúminas) como celular (de membrana o nuclear). Esta

unión se puede producir por diferentes rutas mediante la apertura de los diferentes anillos que componen la molécula (Figura 2).

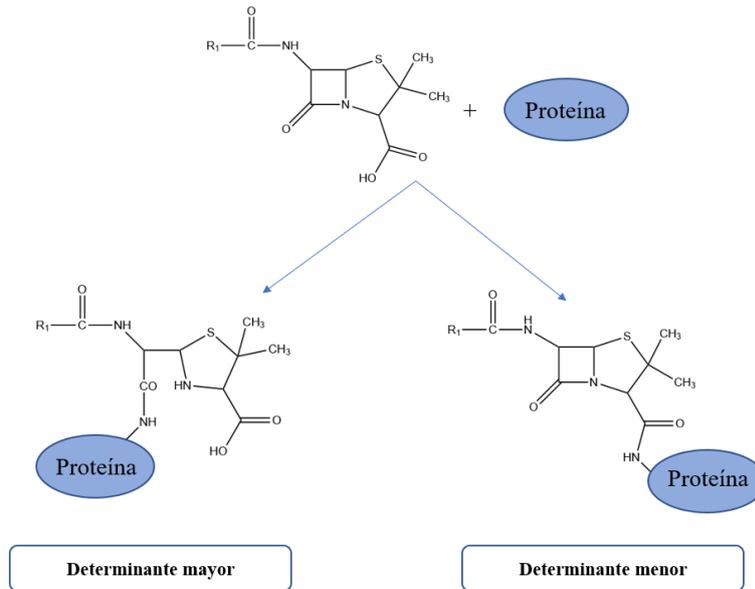


Figura 2. Rutas de haptización de penicilinas. Fuente: Castells y Bonamichi-Santos, 2019.

Los haptenos derivados de penicilinas se producen bajo condiciones fisiológicas, generando, por apertura del anillo β -lactámico, el determinante mayor, llamado así por representar el 95% de las formas hapténicas que presenta este antibiótico, y que son responsables de la mayor parte (75%) de las reacciones de hipersensibilidad inmediata debidas a este tipo de fármacos. También pueden degradarse en otros determinantes, aunque en menor proporción (5%), siendo conocidos como determinantes menores (Guzmán et al., 2009).

Aunque la amoxicilina se está convirtiendo en la causante principal de las reacciones alérgicas a antibióticos debido a los hábitos de prescripción (Doña et al., 2017), la alergia a la penicilina es la más registrada en hospitales, con una prevalencia estimada de un 5 a un 15% (Blumenthal et al., 2019). La prevalencia real, sin embargo, es difícil de determinar, ya que muchos individuos que se identifican como alérgicos no lo son realmente o, con menor frecuencia, no están bien diagnosticados. Esto ha hecho que se prescriban innecesariamente antibióticos alternativos, suponiendo un problema tanto para la salud del paciente como para la sostenibilidad del sistema de salud. Así por ejemplo, sustituir el uso de penicilina por otros antibióticos que pueden ser menos efectivos y más tóxicos para el paciente, resulta en un mayor número de hospitalizaciones más prolongadas (Sousa-Pinto et al., 2018). Además, el uso inadecuado de antibióticos puede llevar a resistencia bacteriana.

1.3. Diagnóstico de la alergia a antibióticos β -lactámicos

El diagnóstico de la alergia es complejo y, normalmente, sobreestimado (Doña et al., 2017). Por ejemplo, aproximadamente un 8% de los estadounidenses están clasificados como alérgicos a penicilinas, sin embargo, menos del 5% de ellos están adecuadamente diagnosticados (Sousa-Pinto et al., 2018). El problema radica en que la capacidad inmunogénica de los haptenos de antibióticos β -lactámicos no depende tan solo de los determinantes mayores, sino también de los menores, y de sus cadenas laterales (Guzmán et al., 2009). Esto hace que pacientes que son alérgicos a un tipo de antibiótico β -lactámico no lo sean necesariamente a otro. Incluso en el mismo grupo, un paciente puede ser alérgico a un tipo de penicilina y no al resto (Blanca et al., 1990). Además, los pacientes realmente alérgicos pueden sufrir una pérdida de sensibilización con los años (Sousa-Pinto et al., 2018), es decir, una reducción en el nivel de IgE específica circulante. Así pues, un historial clínico detallado es probablemente el paso más importante en el diagnóstico de estas alergias.

Este incluye parámetros como el tiempo entre la administración del antibiótico y la aparición de síntomas, el tipo de reacción que se ha experimentado o la utilización de otros fármacos. Sin embargo, este estudio puede ser incompleto, y los datos que aporta no son completamente fiables: la cronología de los eventos puede ser imprecisa, el paciente puede no recordar el nombre del fármaco que le provocó la reacción, y las manifestaciones de esta pueden ser muy variadas (Mayorga et al., 2017).

1.3.1. Pruebas *in vivo*

Las pruebas cutáneas son la técnica más utilizada para evaluar las reacciones alérgicas inmediatas, aquellas mediadas por IgE (Torres et al., 2016), aunque también se utilizan para diagnosticar alergias mediadas por linfocitos T específicos (alergias tardías). Estas pruebas permiten medir la degranulación de los mastocitos en la piel en individuos sensibilizados frente a un alérgeno (Torres y Fontán, 2013). Para evaluar las reacciones inmediatas se utilizan la prueba de intradermorreacción, el *prick test* y las pruebas de provocación oral controlada (Figura 3).



Figura 3. Métodos *in vivo* de diagnóstico de la alergia a antibióticos β -lactámicos: *prick test* (A) y prueba de intradermorreacción (B) Fuente: Sánchez-González et al., 2013.

El *prick test* (Figura 3A) consiste en reproducir la reacción alérgica sobre la piel del paciente. Para ello se deposita una gota del alérgeno sobre la piel y se pincha a través de ella con una lanceta de forma perpendicular. Se considera que la respuesta es positiva cuando aparece una pápula y eritema en la zona de punción de tamaño mayor a 3 mm (Quezada, 1981). Con este tipo de pruebas, el resultado se obtiene en unos 15 minutos (Torres y Fontán, 2013), sin embargo, un resultado positivo en la prueba sólo informa al alergólogo de la existencia de IgE específicas; no indica necesariamente que exista enfermedad alérgica. Estos ensayos no poseen protocolos detallados ni validados para todos los antibióticos. Además, la sensibilidad depende del alérgeno utilizado (del determinante, de su cadena lateral y de la naturaleza de la proteína portadora a la que se une), y es generalmente baja, requiriendo una gran concentración de antibiótico para realizar la prueba. Esto resulta en falsos positivos, por las propiedades irritativas del medicamento.

La prueba de intradermorreacción (Figura 3B) consiste en la inoculación directa del alérgeno en la dermis con una aguja fina y con la jeringa paralela a la piel, provocando la formación de una ampolla de 1 ó 2 mm. La prueba se considera positiva cuando esta ampolla formada es de al menos 5 mm de diámetro (Doña et al., 2017).

Por último, las pruebas de provocación consisten en la administración vía oral a dosis crecientes del producto sospechoso de provocar alergia. Este tipo de prueba se realiza cuando se duda del resultado positivo de las pruebas anteriores y son consideradas como el diagnóstico definitivo de reacciones alérgicas, tanto a alimentos como a medicamentos (Quezada, 1981). Estas pruebas deben realizarse siempre evaluando los riesgos y están contraindicadas en casos de anafilaxia grave, de enfermedades autoinmunes inducidas por fármacos y vasculitis sistémicas, entre otros (Giner, 2013). Además de ser poco fiables, las pruebas *in vivo* requieren de la exposición al antígeno, siendo potencialmente peligrosas para el paciente. Es por esto que se hace necesario el desarrollo de técnicas que permitan la detección y cuantificación de IgE *in vitro*, capaces de complementar y mejorar el diagnóstico de las alergias a antibióticos β -lactámicos (Doña et al., 2017).

1.3.2. Ensayos *in vitro* para la cuantificación de IgE

La determinación *in vitro* de IgE se puede llevar a cabo, utilizando tanto suero como plasma. Sin embargo, el uso de anticoagulantes para obtener el plasma del paciente puede resultar en interferencias en el proceso de cuantificación. Por ello, se recomienda emplear suero (LÓPEZ, M. SEAIC). La concentración de inmunoglobulina E en suero, aunque dependiente de la edad, es muy inferior a la del resto de inmunoglobulinas (Abbas y Lichtman, 2008), por lo que su cuantificación precisa representa un reto.

Actualmente, se utilizan diferentes inmunoensayos para medir la concentración de IgE en suero: ensayos directos e indirectos (requieren el uso de material marcado para medir la concentración de antígeno o anticuerpo presente), que permiten la determinación de niveles de IgE total y específica a un alérgeno en la muestra de un paciente (LÓPEZ, M. SEAIC).

1.3.2.1. IgE total sérica

El uso de ensayos para determinar la presencia de IgE total en suero es frecuente en las consultas de alergología (Vidal y Gude, 2007). Sin embargo, estos ensayos no tienen mucha utilidad práctica, ya que existen individuos no alérgicos con niveles de IgE total elevados, al igual que individuos alérgicos con niveles de IgE total bajos (LÓPEZ, M. SEAIC). Esto implica que niveles altos de IgE en el suero no indican la existencia de alergia, sino que solo son un indicativo de ella (Vidal y Gude, 2007). Por ello la medida de IgE total debe interpretarse cuidadosamente y en el contexto clínico de cada paciente. Además, estos ensayos carecen de selectividad por lo que se hace necesario el desarrollo de ensayos que permitan la determinación *in vitro* de IgE específica de manera que complementen a las pruebas *in vivo*.

1.3.2.2. IgE específica a alérgenos

La presencia de IgE específica a un alérgeno en suero indica que éste se ha sensibilizado contra ese alérgeno en concreto. Las IgE específicas están presentes en el suero en una concentración mucho menor que la IgE total. Para clasificar a los pacientes alérgicos en función de la cantidad de IgE específica, se utiliza la clasificación RAST (*Tabla 2*), utilizando como punto de corte 0,35 unidades (UI/mL o con kUI/L), siendo 1 UI equivalente a 2,4 ng de IgE aproximadamente (Hamilton y Franklin, 2004).

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

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

Existen diferentes ensayos para la determinación de anticuerpos IgE en suero que pueden clasificarse en cualitativos, semicuantitativos y cuantitativos, atendiendo al grado de precisión con el que estos muestran la cantidad de IgE en el suero.

Los ensayos cualitativos no permiten la cuantificación de IgE específica, si no que clasifican los resultados en negativo (ausencia o indetectable) y positivo (presencia o detectable). Un resultado positivo implica solo que la señal de la prueba supera el umbral analítico de referencia. Un ejemplo de ensayo cualitativo son los ensayos con tiras reactivas, en el que la presencia de IgE específica se determina por la presencia o ausencia de color e intensidad.

Los ensayos semicuantitativos proporcionan una idea de la concentración de IgE específica en suero. Para ello, se utiliza una curva dosis-respuesta y los resultados se comparan con un esquema de graduación cualitativa de clases.

Por otra parte, los ensayos cuantitativos ofrecen una estimación ajustada y reproducible de la concentración de IgE en suero. Para ello, los datos obtenidos (señal analítica) se interpolan en una curva de calibración construida con patrones o calibradores. Estos ensayos son los más complejos y sus resultados se expresan como unidades de masa o internacionales (LÓPEZ, M. SEAIC).

Actualmente, los métodos de diagnóstico *in vitro* son dependientes del mecanismo de la alergia, sea mediada por IgE o por células T. En la hipersensibilidad Tipo I, mediada por inmunoglobulinas E, los ensayos se basan en la detección de marcadores específicos después de su estimulación, y su sensibilidad y especificidad varían con el antibiótico probado (Doña et al., 2017).

El método más usado para el diagnóstico de reacciones de hipersensibilidad inmediata son los inmunoensayos, donde se determina la unión del antibiótico a inmunoglobulinas E circulantes en suero. Pero, como se ha visto anteriormente, las inmunoglobulinas E, y más especialmente las específicas a medicamentos, se encuentran en una concentración muy baja en sangre, exigiendo que los métodos sean extremadamente sensibles (Mayorga et al., 2017).

1.3.2.2.1. Inmunoensayos

El inmunoensayo es una técnica analítica que tiene como fundamento el reconocimiento molecular específico y selectivo de un analito por un anticuerpo. En el caso de alergia, los inmunoensayos cuantifican las inmunoglobulinas E específicas a un alérgeno en suero basándose en la detección del complejo alérgeno-IgE. Desde el primer inmunoensayo descrito, se han ido desarrollando nuevos métodos que, junto a la posibilidad de automatización del ensayo, presentan mejor sensibilidad y rapidez. Los inmunoensayos actuales, utilizan un conjugado antigénico hapteno-proteína inmovilizado por adsorción o covalentemente a una superficie (Dolen, 2003). En caso de presencia de IgE específica en suero, ésta reconoce el conjugado inmovilizado y forma el inmunocomplejo que se detecta utilizando un anticuerpo secundario marcado. Existen diferentes formas de marcar y detectar este anticuerpo: con un radioisótopo, en el caso de los ensayos RAST (*radioallergosorbent test* en inglés); con enzimas, utilizando ensayos colorimétricos como ELISA (*enzyme-linked: immunosorbent assay* en inglés), o con ensayos de fluorescencia como los FAST (*fluorescent-allergosorbent test* en inglés) (Doña et al., 2017).

Actualmente, el mercado de los inmunoensayos está centrado en 3 aproximaciones: ImmunoCAP (ThermoFisher, previamente comercializado por Phadia), Immulite 2000 (Siemens) y Hytec-288 Plus (Hycor). Estos inmunoensayos están completamente automatizados y difieren en el soporte donde está inmovilizado el conjugado y en el marcaje utilizado (Figura 4).

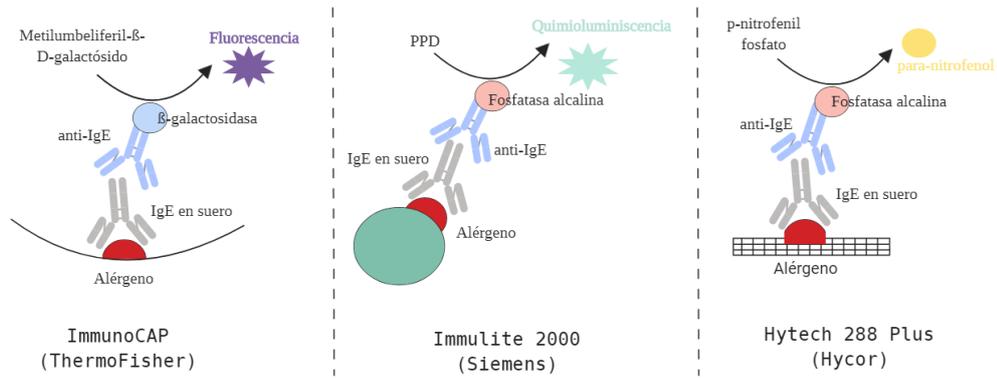


Figura 4. Representación gráfica de los inmunoensayos comerciales ImmunoCAP (ThermoFisher), Immulite 2000 (Siemens) y Hytech 288 Plus (Hycor). Fuente: Goikoetxea et al., 2013.

·ImmunoCAP

En este ensayo, el alérgeno (hapteno-proteína) está unido covalentemente a una fase sólida hidrófila, consistente en un derivado de celulosa, empaquetada en una cápsula. Los anticuerpos secundarios IgE están marcados con la enzima β-galactosidasa, que transforma el metilumbeliferil-β-D-galactósido en un producto que emite fluorescencia. A mayor concentración de IgE específica en suero, mayor intensidad de fluorescencia (Goikoetxea et al., 2013). ImmunoCAP puede determinar IgE específicas de más de 650 alérgenos completos y a más de 90 componentes alergénicos (THERMOFISHER, 2012), y presenta una especificidad y una sensibilidad clínica del 90% y 50%, respectivamente (Romano et al., 2011).

·Immulite 2000

Este ensayo utiliza alérgenos unidos a polímeros de polilisina. El anticuerpo de detección anti-IgE está marcado con la enzima fosfatasa alcalina, que actúa sobre un éster fosfato de adamantil dioxetano (PPD), emitiendo una señal quimioluminiscente. La señal emitida es proporcional a la concentración de IgE específica para cada alérgeno.

·Hytech 288 Plus

Este ensayo utiliza una fase sólida de celulosa que presenta el alérgeno unido covalentemente. Al igual que en Immulite 2000, el anticuerpo anti-IgE está marcado con fosfatasa alcalina, pero esta cataliza la transformación del p-nitrofenil fosfato en para-nitrofenol, un compuesto que presenta coloración amarilla (Goikoetxea et al., 2013). La intensidad de color obtenida es proporcional a la concentración de IgE.

Para cuantificar la cantidad de IgE específicas analizadas, estos ensayos utilizan una curva de calibrado tipo dosis-respuesta de IgE total en suero. Para ello, se utiliza un estándar común primario de IgE humana (OMS 75/502). La curva de calibrado presenta una zona central lineal, siendo ésta dónde el sistema analítico responde cuantitativamente (Dolen, 2003). Los resultados se presentan en unidades internacionales por litro (UI), donde 1 UI es equivalente a 2,4 ng de IgE. (Hamilton y Adkinson, 2004). Así pues, la cuantificación de IgE específica se realiza, interpolando las señales obtenidas en la curva de calibración de IgE total (curva heteróloga). Esta aproximación analítica estima, mediante conversión indirecta, la concentración de IgE específica. Aunque esta es la práctica habitual, desde el punto de vista analítico se trata de una aproximación cuantitativa poco elaborada en el sentido que la calibración se realiza con un patrón de IgE total en vez de utilizar patrones específicos, por lo que los resultados están relativizados a la curva de IgE total.

1.4. Formatos de ensayo alternativos

1.4.1. Microarrays

Los inmunoensayos pueden realizarse también en formato *microarray*. Este formato consiste en una versión miniaturizada del ensayo descrita por Ekins (1986) que permite una medida ultrasensible y simultánea de cientos de analitos en la misma muestra. Esta técnica es aplicable tanto a análisis de DNA/RNA como de proteínas. Básicamente, las biomoléculas están inmovilizadas en un soporte sólido, normalmente vidrio, aunque también plásticos y membranas poliméricas (Templin et al., 2002), en forma de filas y columnas, formando una micromatriz de micropuntos. El sistema de detección más empleado es el óptico (fluorescencia, quimioluminiscencia o radiactividad) (Clarke y Fung, 2008).

El formato *microarray* presenta una serie de ventajas, como la capacidad de determinar simultáneamente IgE específica de varios analitos en una misma muestra, utilizando un volumen pequeño de esta; su elevada sensibilidad y buena reproducibilidad; la posibilidad de implementar controles positivos y negativos, y la obtención rápida de resultados (Sutandy et al., 2013). Sin embargo, presentan una elevada dependencia de la correcta elección de anticuerpos de captura y reconocimiento: estos deben presentar una alta afinidad para evitar uniones inespecíficas que lleven a falsos positivos (Cretich et al., 2014).

Actualmente, existe una versión multiplexada y semicuantitativa del ensayo ImmunoCAP anteriormente explicado: ImmunoCAP ISAC (ThermoFisher). Este puede analizar simultáneamente más de 100 alérgenos alimentarios y ambientales. Sin embargo, no permite el análisis de alergias a antibióticos β -lactámicos, poniendo de manifiesto la necesidad del desarrollo de nuevos métodos *in vitro* en formato de microarray que permitan abordar problemáticas analíticas tales como la calibración del ensayo multiplexado para este tipo de alergias, haciendo uso de sistemas analíticos de bajo coste.

2. OBJETIVOS

Por el momento, no se dispone de un sistema de calibración de IgE sérica específica de antibióticos β -lactámicos, ni de métodos que aborden de forma simple esta problemática, por lo que es necesario avanzar en el desarrollo de nuevas aproximaciones analíticas que se dirijan en esta dirección.

El objetivo principal de este Trabajo Fin de Grado es contribuir en la puesta a punto de un método *in vitro* que permita la determinación directa de IgE específica de antibióticos β -lactámicos con altas prestaciones analíticas como alternativa a los sistemas que se utilizan en la actualidad, y que vayan más allá del estado del arte. Con este objetivo en perspectiva, se plantea la implementación de un proceso de calibración integrado en el ensayo, utilizando la respuesta de los controles positivos, y la puesta a punto de un método de calibración de patrón interno. Para ello, la aproximación analítica consiste en un inmunoensayo directo en formato de microarray, utilizando herramientas de electrónica de consumo: disco DVD y lector de discos como detector.

Para la consecución de este objetivo general, se establecen los siguientes objetivos específicos:

- 1) Obtención de curvas de calibrado alternativas a la curva heteróloga con estándar internacional de referencia para la IgE total (WHO 75/702).
- 2) Determinación de las prestaciones analíticas del ensayo.
- 3) Análisis de muestras de suero de personas sanas y pacientes con patología alérgica y comparación de resultados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos y materiales

Las disoluciones tampón empleadas fueron tampón fosfato salino (PBS) pH 7,5; tampón fosfato salino con 0,05% (m/v) de Tween-20 (PBST) preparado a partir de PBS y Tween- 20 (Scharlau, Barcelona, España); tampón de dilución (Dr. Fooke, Neuss, Alemania); tampón carbonato/bicarbonato 50 mM pH 9,6; tampón ácido 2-morgolinoetanosulfónico (MES) 1,0 M pH 5,5 y tampón carbonato pH 11,0. Todas las sales necesarias para la elaboración de los tampones eran de Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Para la determinación y cuantificación de IgE total se utilizaron como anticuerpos de captura Omalizumab 37,5 mg (compuesto activo del fármaco Xolair), anticuerpo policlonal anti-IgE humana y el receptor de alta afinidad FcεRI, ambos proporcionados por Dr. Fooke. La curva de calibrado de IgE total de referencia se construyó a partir de diluciones del estándar internacional de IgE de suero humano de la Organización Mundial de la Salud (WHO estándar IgE total75/502). Como control negativo se imprimió una disolución de albúmina de suero humana (HSA) de Sigma-Aldrich. Como controles positivos se imprimieron IgE humana (control de la primera etapa (Abcam, Cambridge, Reino Unido), IgG (control de la segunda etapa) de suero de ratón (Sigma-Aldrich), IgG de cabra anti-IgG de ratón marcado con HRP (GAM-HRP) y HRP (controles de la última etapa) procedentes de Abcam y Sigma Aldrich, respectivamente. Los conjugados proteína-antibióticos β-lactámicos de amoxicilina, penicilina G y aztreonam fueron preparados en el laboratorio. La IgE quimera específica para aztreonam es un producto resultado del proyecto COBIOPHAD (<https://www.cobiophad.eu>).

Los discos utilizados fueron DVD-R (16 ×) de la marca Mediarange.

El inmunoensayo para la determinación de IgE específica requiere la utilización de 1) un anticuerpo monoclonal anti-IgE humana (Ingenasa, Madrid, España) como anticuerpo primario para el reconocimiento; 2) un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con HRP (GAM-HRP) como anticuerpo secundario y 3) el sustrato 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB) de SDT-Reagents (Baesweiler, Alemania) como revelador enzimático.

Las muestras de suero fueron proporcionadas por el servicio de alergia del Hospital Universitari i Politènic La Fe, bajo consentimiento informado de los pacientes.

3.2. Protocolo del inmunoensayo

Los reactivos de impresión se dispensaron sobre el DVD en formato micromatriz (5 filas × 4 columnas, 2 réplicas por reactivo, 20 arrays por disco) mediante un dispensador de bajo volumen (50 nL) y sin contacto (AD1500, Biodot, Irvine, CA) (Figura 5) a 25 °C y a una humedad relativa del 80%. La proteína HSA y los conjugados proteína-hapteno-β-lactámico se imprimieron a una concentración de 40 mg/L en tampón carbonato/bicarbonato 50 mM pH 9,6, los anticuerpos de captura y los controles positivos en PBS pH 7,5. El disco se incubó durante 16 h a 37° antes de utilizarlo para la determinación de IgE.

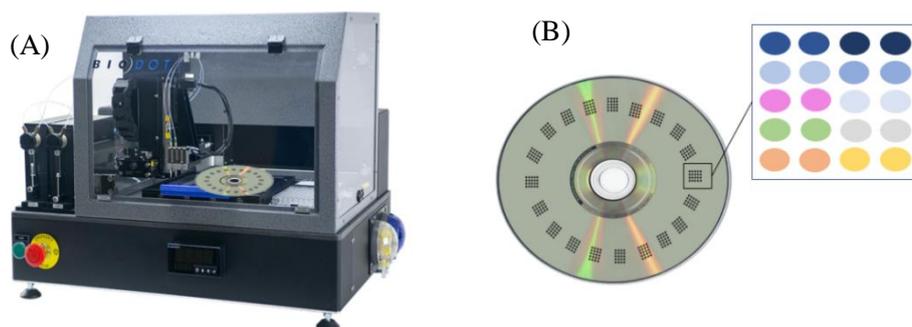


Figura 5. Sistema de impresión BioDot (A) y esquema de los reactivos impresos en formato *microarray* sobre el DVD (B).

Una vez transcurridas las 16 horas de incubación, el disco se lavó con PBST y agua destilada y se secó por centrifugación. A continuación, se añadieron 25 μL de la muestra a analizar en cada array del disco y se dejó incubar a temperatura ambiente. Trascurridos 30 minutos, el disco se lavó y se secó como antes. Luego, se añadieron 25 μL del anticuerpo monoclonal anti-IgE humana a una dilución 1/1000 en tampón de dilución, dejándolo incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el disco se lavó y se secó como en los pasos anteriores. A continuación, se añadieron 25 μL del anticuerpo secundario GAM-HRP a una dilución 1/1000 en tampón de dilución y se dejó incubar a temperatura ambiente. Trascurridos 15 minutos, el disco se lavó y se secó como previamente. Finalmente, se añadieron 25 μL de TMB en todos los arrays, dejando revelar durante 15 minutos, generándose un precipitado azul cuya densidad óptica está relacionada directamente con la concentración de IgE. El disco se lavó con agua destilada y se secó por centrifugación previa la lectura de resultados.

La lectura de los resultados se realizó empleando un lector de discos digitales ópticos Lab-Player, con una longitud de onda de 650 nm (Figura 6), siguiendo el proceso descrito por Morais *et al.* (2016).



Figura 6. Lector de discos DVD Lab-Player.

La determinación de las prestaciones analíticas de las curvas de calibración (E_{c50} , intervalo de cuantificación, límite de detección o R^2), así como los ajustes de las curvas de calibrado con un modelo de regresión no lineal de 4 parámetros logísticos, se realizaron con el programa SigmaPlot 11.0.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los métodos actuales de cuantificación de IgE específica a antibióticos β -lactámicos utilizan una curva de calibración construida mediante concentraciones conocidas del estándar internacional (WHO 75/502) de IgE total. Por lo tanto, la determinación de IgE específica pasa por interpolar los valores de intensidad de señal obtenidas en el ensayo en la curva de calibración de WHO, asumiendo que el grado de reconocimiento molecular conjugado antigénico-IgE específica es comparable al del ensayo sándwich de IgE total. Esta estrategia de calibración con el patrón de WHO hace necesaria la realización de curvas de calibración periódicas para que la cuantificación sea precisa y minimizar así los errores asociados al cálculo de la concentración de IgE específica.

Aprovechando la capacidad multiplex del formato de microarray, se ha planteado estudiar la posibilidad de implementar una calibración interna integrada en cada array del disco y relacionarla con la curva de calibrado de WHO. Otra aproximación planteada es la realización de una calibración homóloga, utilizando IgE específica procedente de pacientes alérgicos.

Para obtener las diferentes curvas de calibración se utilizó un inmunoensayo de 4 etapas, optimizado previamente por el grupo de investigación (Figura 7).

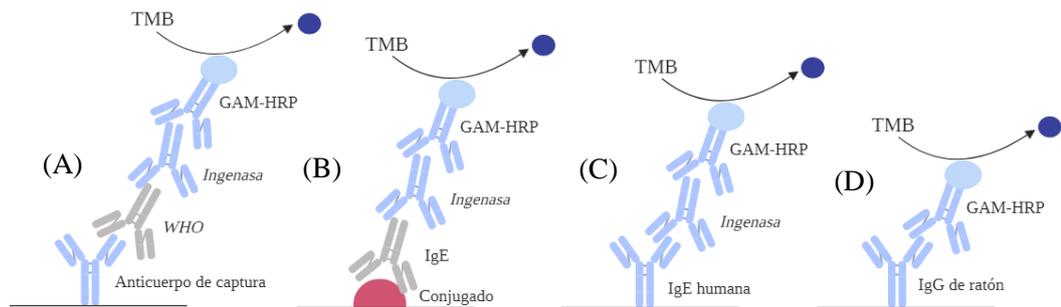


Figura 7. Esquemas del inmunoensayo para A) la determinación de IgE total, utilizando el estándar WHO 72/702, B) determinación de IgE específica, y calibración interna utilizando los controles positivos de la primera (C) y segunda etapa (D) del ensayo.

4.1. Selección del anticuerpo de captura para la determinación de IgE total

Para la obtención de la curva de calibrado con el estándar WHO, utilizada en los ensayos *in vitro* para la cuantificación heteróloga de IgE específica, se estudiaron diferentes receptores de captura: anticuerpo humanizado anti-IgE (fármaco comercial Omalizumab), un anticuerpo policlonal anti-IgE humana y el receptor de IgE de la superficie de mastocitos y basófilos FcεRI. Para la selección del receptor, se realizaron ensayos tipo sándwich, imprimiendo las disoluciones de receptor a una concentración de 20 mg/L, y se compararon las señales para las diferentes concentraciones de WHO (0,00; 0,02; 0,1; 0,39; 1,56; 6,25 y 25 UI/mL). En la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos.

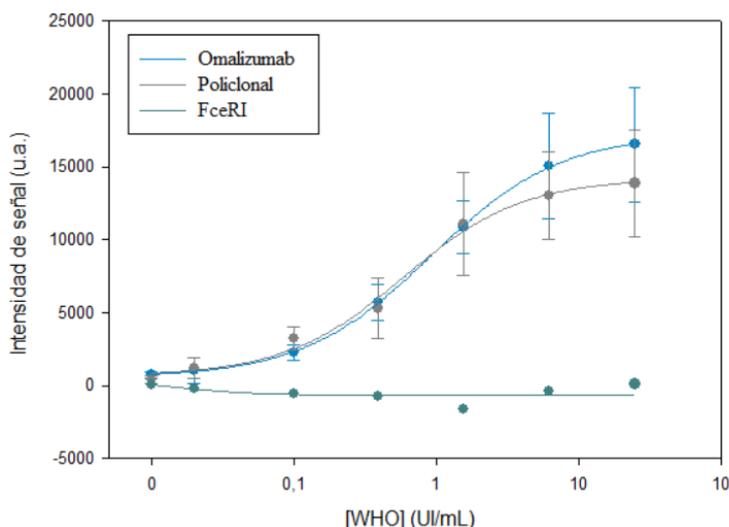


Figura 8. Curvas de calibración obtenidas con Omalizumab, anticuerpo policlonal anti-IgE humana y el receptor FceRI como anticuerpos de captura (n=4).

Como se muestra en la Figura 8, el ensayo con receptor FceRI como especie de captura no respondía a la concentración de IgE. Por el contrario, tanto Omalizumab como el anticuerpo policlonal respondieron cuantitativamente a la concentración de IgE.

El análisis de la varianza realizado con un nivel de confianza del 95%, no mostró diferencias significativas entre las señales obtenidas con los dos anticuerpos de captura ($p=0,353$). Para la selección de uno de ellos, se estudiaron los parámetros analíticos de cada curva: Ec_{50} , límite de detección, intervalo de cuantificación y R^2 , así como la reproducibilidad del ensayo.

El valor de Ec_{50} que presentaba el ensayo con anticuerpo policlonal (0,59 UI/mL) fue similar a la del ensayo imprimiendo Omalizumab (0,80 UI/mL). En cuanto al límite de detección, obtenido mediante la interpolación de la señal resultante de sumar la señal del blanco más 3 veces su desviación estándar ($LD = \bar{x} + 3 \cdot SD$), el ensayo con el anticuerpo policlonal (0,03 UI/mL) fue ligeramente más sensible al del ensayo con Omalizumab (0,05 UI/mL).

La reproducibilidad de los ensayos, evaluada mediante el coeficiente de variación, fue del 11% al 36% (interdisco) y del 0,8% al 26% (intradisco) para Omalizumab, y del 27% al 64% (interdisco) y del 1,1% al 19,7% (intradisco) para el anticuerpo policlonal. Los intervalos de cuantificación fueron similares (0,1 - 3,87 UI/mL para el ensayo con anticuerpo policlonal y de 0,1 - 4,5 UI/mL para Omalizumab). Atendiendo a los parámetros analíticos de cada curva, y al resultado del test estadístico, los dos anticuerpos de captura pueden utilizarse para construir la curva de calibrado de IgE total. No obstante, se seleccionó el anticuerpo humanizado Omalizumab ya que el ensayo presentaba una mejor reproducibilidad interdisco.

Una vez seleccionado el anticuerpo de captura, se estudió el efecto de la concentración de impresión en las prestaciones analíticas del ensayo. Los resultados se muestran en la Figura 9.

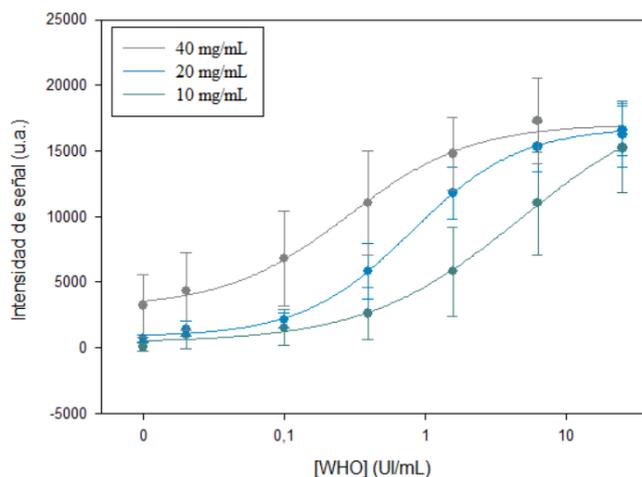


Figura 9. Curvas de calibración obtenidas utilizando diferentes concentraciones de Omalizumab como anticuerpo de captura (40, 20 y 10 mg/L) (n=4).

Atendiendo al resultado del estudio ANOVA con un intervalo de confianza del 95%, se concluyó que sí existían diferencias en las señales dependiendo de la concentración de impresión de Omalizumab ($p < 0,001$), por ello se estudiaron los parámetros analíticos de cada curva para determinar la concentración óptima de impresión. Así, el ensayo con Omalizumab impreso a una concentración de 40 mg/L se obtuvo una señal del blanco muy alta, disminuyendo la relación señal-ruido (límite de detección 0,31 UI/mL). Este valor es 7 veces mayor que el obtenido con el ensayo imprimiendo Omalizumab a 10 y 20 mg/L (0,06 y 0,05 UI/mL, respectivamente). A pesar de presentar un límite de detección similar, el ensayo, imprimiendo 10 mg/L de Omalizumab presentó peores prestaciones analíticas. La reproducibilidad del ensayo varió entre 22 - 59% (interdisco) y entre 1 - 40% (intradisco), frente a los valores de 11 - 36% y 0,8 - 26%, utilizando 20 mg/L como concentración de impresión. Además, imprimiendo 10 mg/L se obtenían peores valores de EC_{50} (4,50 UI/mL frente a 0,8 UI/mL) y un menor intervalo de cuantificación (0,50 - 3,43 UI/mL frente a 0,10 - 4,50 UI/mL). Así pues, se seleccionó 20 mg/L como concentración óptima de impresión de Omalizumab.

4.2. Efecto matriz en la determinación de IgE

El suero es una solución compleja que presenta diferentes componentes que pueden alterar los resultados obtenidos en la determinación y cuantificación de IgE. Para estudiar este efecto se realizaron diferentes diluciones del estándar WHO (0; 0,02; 0,1; 0,39; 1,56; 6,25 y 25 UI/mL) en matrices diferentes: suero de conejo y PBST. Las curvas de calibrado obtenidas se muestran en la Figura 10.

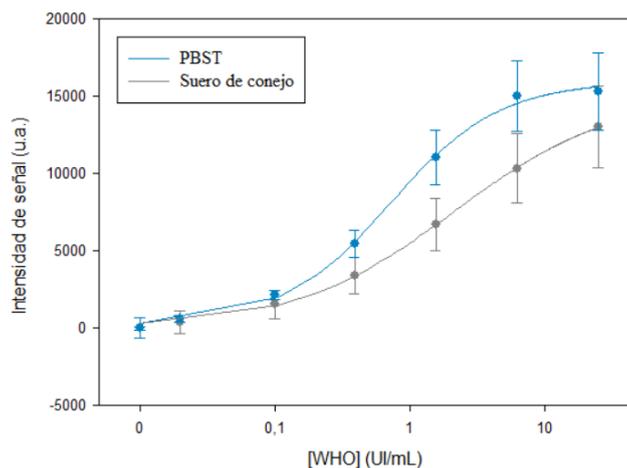


Figura 10. Curvas de calibrado de IgE total en PBST y suero de conejo. (n=10)

Como se muestra en la Figura 10, la pendiente de cada curva es distinta, lo que se traduce en una diferencia en la sensibilidad del ensayo. Estas diferencias se confirmaron mediante un estudio ANOVA, que determinó que la diferencia entre las señales obtenidas en suero de conejo y PBST es significativa ($p=0,002$). Por ello, las calibraciones posteriores se realizaron en medio de dilución PBST. La curva de calibrado de IgE total realizada en PBST que se muestra en la Figura 11 es el resultado de promediar 20 curvas de IgE total con el estándar WHO 75/502 utilizando Omalizumab (20 mg/L) como anticuerpo de captura.

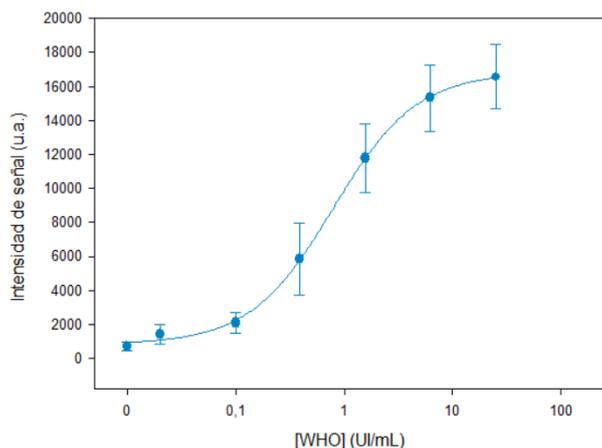


Figura 11. Curva promedio (n=20) de IgE total con el estándar WHO 75/502 utilizando Omalizumab (20 mg/L) como anticuerpo de captura.

Los parámetros analíticos de esta curva son: Ec_{50} (0,80 UI/mL), límite de detección (0,04 UI/mL), intervalo de cuantificación (0,1 - 4,5 UI/mL), R^2 de 0,99, con una reproducibilidad de 11- 36% (interdisco) y de 0,8 -26% (intradisco).

4.3. Métodos de calibración alternativos

4.3.1. Calibración interna

Como se ha comentado anteriormente, la calibración mediante la curva con el estándar WHO es la práctica habitual para la determinación de IgE total. Sin embargo, uno de los problemas que presenta esta estrategia es que es una calibración externa, siendo necesaria su realización periódica para cuantificar con mayor precisión. Gracias a la capacidad multiplex de la aproximación en formato de microarray en disco compacto, se puede obtener una curva de calibración interna en cada array, que permita la cuantificación de IgE específicas a antibióticos β -lactámicos (en concreto, amoxicilina y penicilina G) presentes en cada muestra. Con este objetivo, se plantea una estrategia basada en la utilización de los controles positivos del ensayo como sistema de calibración. El ensayo empleado permite incluir controles positivos de todas las etapas que lo configuran (ver Figura 7), verificando que éstas se han realizado adecuadamente.

En primer lugar, se abordó el estudio de imprimir HRP como control positivo de la etapa de revelado. Para ello, se imprimió HRP en el microarray a diferentes concentraciones (12,5; 25; 50; 100 y 200 mg/L) en tampón carbonato/bicarbonato 50 mM pH 9,6 con el fin de construir una curva de calibrado y poder relacionar las señales con las obtenidas con el patrón de WHO. Sin embargo, las señales que se registraron no se correlacionaban bien con la curva de calibración, por lo que se decidió estudiar otros tampones de impresión (PBS pH 7,5 y tampón MES pH 5,5). Aun así no se pudo obtener una relación entre concentración de enzima impresa y señales obtenidas, probablemente debido a que la inmovilización pasiva afecta al centro activo, y por lo tanto a la generación de producto en el microarray. Otra alternativa probada fue la de utilizar un anticuerpo secundario marcado (GAR-HRP). Utilizando este anticuerpo como control positivo de la etapa de revelado no se obtuvieron señales en el ensayo, posiblemente debido a la presencia de proteína BSA como estabilizante en la disolución del anticuerpo, lo que impedía obtener señales cuantificables y reproducibles. Como resultado se decidió no incorporar un control positivo de la etapa de revelado en el diseño final del array y se pasó a obtener una curva del resto de etapas.

La curva de control positivo de la primera etapa (impresión de IgE humana) permite el control de las etapas de reconocimiento mediante anticuerpo primario, anticuerpo secundario y revelado. Para su realización se imprimió IgE humana, capaz de ser reconocida por el anticuerpo de ratón anti-IgE humana (Ingenasa) independientemente de la concentración de IgE presente en la muestra. Se imprimieron diferentes disoluciones con diferente concentración de IgE humana (0,63; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0 y 20,0 mg/L) en PBS. La señal correspondiente a la concentración de la disolución de control positivo (5,0 mg/L), que resultó ser la máxima interpolable en la curva WHO, se utilizó para calcular la concentración equivalente a WHO, y el resto de concentraciones equivalentes se calcularon de acuerdo al factor de dilución utilizado en la preparación de las disoluciones de impresión. La curva de calibración interna se trazó, utilizando las señales y concentraciones correspondientes al intervalo de cuantificación de la curva de calibración del estándar WHO. El límite de detección de la curva de calibración fue 0,26 UI/mL y el intervalo de cuantificación fue 0,3 - 1,20 UI/mL.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La curva de calibración de la segunda etapa (impresión de IgG de ratón) permite el control de las etapas de reconocimiento mediante anticuerpo secundario y revelado mediante TMB. Esta IgG de ratón es reconocida por el GAM-HRP. Para realizar la curva se imprimieron disoluciones con diferente concentración de este anticuerpo (0,03, 0,063, 0,125, 0,25, 0,5 y 1,0 mg/L) en PBS. Al igual que con la curva de calibración de la primera etapa, estas disoluciones de impresión se relacionaron con concentraciones del estándar WHO interpolando la señal correspondiente a la concentración máxima interpolable en la curva WHO (1,0 mg/L) y aplicando a la concentración obtenida el factor de dilución utilizado en la preparación de las disoluciones de impresión, considerando como curva de calibración interna aquellos puntos que se incluían dentro de su intervalo de cuantificación. El límite de detección de la curva de calibración fue 0,30 UI/mL y el intervalo de cuantificación fue 0,20 - 3,15 UI/mL.

Se realizó un análisis de la varianza multifactorial para un nivel de confianza del 95%, que determinó que existían diferencias significativas entre las concentraciones ($p < 0,001$) pero no entre las señales obtenidas de las dos curvas de calibración ($p = 0,242$), indicando que ambas curvas podían utilizarse por igual como aproximación para una calibración interna.

En la Figura 12 se representan los coeficientes de variación, indicativos de la reproducibilidad del ensayo, de cada concentración para las dos curvas de calibración interna.

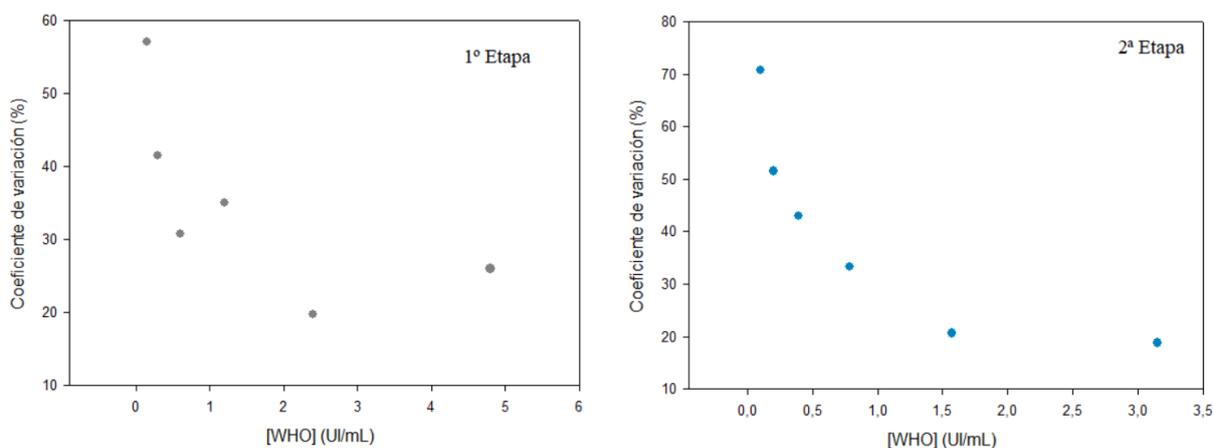


Figura 12. Relación entre los coeficientes de variación con la concentración de WHO en las curvas de calibración interna.

Como se observa en la Figura 12, la reproducibilidad de la respuesta de los controles positivos de la segunda etapa del ensayo fue mejor, obteniendo coeficientes de variación inferiores al 20% para concentraciones superiores a 1 UI/mL. Dado que el límite de detección de ambas curvas era significativamente similar, se seleccionó el control positivo de la segunda etapa (IgG de ratón) impreso a diferentes concentraciones para construir la recta de calibrado que simulara a la de IgE total de WHO. En la Figura 13 se muestran ambas curvas de calibrado.

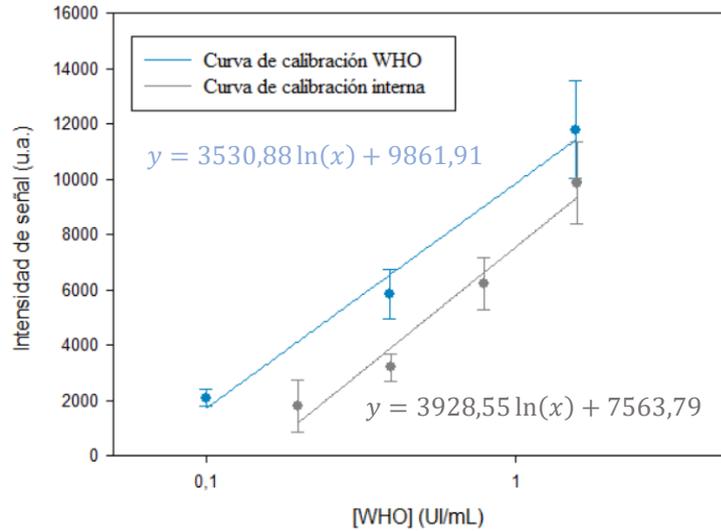


Figura 13. Curvas de calibración de WHO e interna.

Como se observa, ambas curvas son paralelas en el intervalo de cuantificación de la curva de WHO ($R^2=0,98$), presentando pendientes similares. Dando valores de intensidad de señal en el rango de 2500-9500 u.a. y obteniendo la concentración correspondiente de acuerdo a la ecuación de las rectas, se calculó el factor promedio de conversión de concentración entre las dos curvas de calibrado, obteniendo un factor de conversión de $0,57 \pm 0,05$.

Así pues, diferentes diluciones del anticuerpo IgG de ratón se imprimieron (0,063; 0,13; 0,25; 0,5 y 1,0 mg/mL) en el array junto al resto de reactivos, obteniendo una curva de calibración interna. Esta curva, aunque heteróloga, permite cuantificar IgE específica sin necesidad de realizar periódicamente la curva de WHO.

4.3.2. Calibración homóloga para IgE específica a amoxicilina y penicilina G

Además de utilizar un patrón externo, la cuantificación de IgE específica mediante el estándar WHO presenta otro inconveniente, ya que consiste en una aproximación heteróloga, es decir se asume que el grado de reconocimiento molecular conjugado antigénico-IgE específica es interpolable al que se detecta en un ensayo sándwich de IgE total. Además, la curva control de la segunda etapa, aunque interna, continúa siendo una calibración heteróloga ya que está obtenida en relación a la curva WHO.

Con el objetivo de obtener curvas de calibrado homólogas para IgE específica a dos antibióticos β -lactámicos de interés (amoxicilina y penicilina G o bencilpenicilina) se preparó una mezcla de muestras de pacientes alérgicos con concentración conocida de IgE específica determinada por el método de referencia ImmunoCap.

Las curvas obtenidas se compararon con la curva de referencia del estándar WHO para comprobar si podían utilizarse para una cuantificación homóloga de IgE específica en suero (Figura 14).

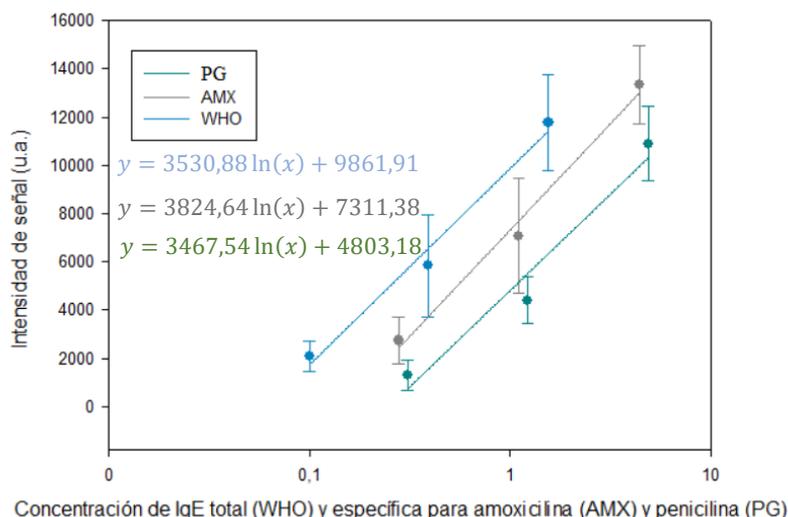


Figura 14. Curvas de calibración WHO heteróloga y homólogas para IgE específicas a amoxicilina (AMX) y penicilina (PG).

Como se observa en la Figura 14, las curvas de calibración de IgE específica a amoxicilina y penicilina G mostraron un comportamiento paralelo a la curva de referencia WHO en el intervalo de cuantificación, ya que presentan la misma pendiente. La diferencia de señal es atribuible al efecto matriz comentado anteriormente: la curva de calibración WHO se obtuvo utilizando PBST, mientras que las diluciones de las curvas homólogas se realizaron en suero. Para una misma señal, los valores de concentración obtenidos por la curva de referencia WHO son menores que los obtenidos mediante las curvas de calibración homóloga, obteniendo valores de IgE específicas infra cuantificados, y evidenciando una necesidad de utilizar un método de calibración alternativo al actual, que además tenga en cuenta el efecto matriz a la hora de cuantificar muestras de suero.

Estas dos curvas se relacionan con la curva de referencia WHO mediante un factor de respuesta que fue de $0,51 \pm 0,03$ y $0,23 \pm 0,01$ para IgE específica a amoxicilina y penicilina, respectivamente. Este factor se obtuvo dando valores de intensidad de señal en el rango de 4000-11000 u.a. y obteniendo la concentración correspondiente de acuerdo a la ecuación de las curvas de calibración.

Los parámetros analíticos del ensayo de IgE específica a amoxicilina fueron: EC_{50} 2,85 UI/mL, límite de detección 0,05 UI/mL, intervalo de cuantificación 0,25 – 4,45 UI/mL ($R^2 = 0,990$), mientras que, para penicilina, los valores de los parámetros analíticos fueron: EC_{50} 3,38 UI/mL, límite de detección 0,11 UI/mL, intervalo de cuantificación 0,61 – 4,93 UI/mL ($R^2 = 0,991$).

El límite de detección y el intervalo de cuantificación de ambas curvas homólogas eran similares a los que mostraba la curva patrón del estándar WHO: 0,045 UI/mL y 0,10 - 4,50 UI/mL respectivamente. Así pues, la estrategia de emplear curvas de calibración homóloga es una aproximación alternativa útil para la cuantificación de IgE específica.

Una vez obtenidas las curvas de calibración interna y homólogas para IgE específica a amoxicilina y penicilina G se compararon para estudiar si existía alguna diferencia entre ellas (Figura 15).

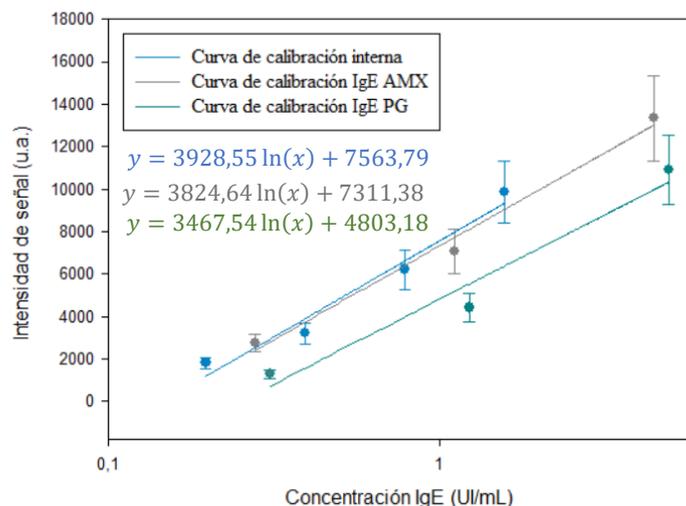


Figura 15. Curva de calibración interna y curvas de calibración homóloga para IgE específicas a amoxicilina y penicilina.

Las gráficas y ecuaciones de la Figura 15 muestran que las curvas de calibración interna y homóloga para IgE específicas a amoxicilina son prácticamente iguales, lo que indica que la curva de calibración interna permite una cuantificación directa de IgE específica a amoxicilina, teniendo en cuenta el grado de reconocimiento molecular conjugado antigénico-IgE específica para este antibiótico, dentro del propio array y sin necesidad de realizar una curva de calibrado externa utilizando patrones WHO. En cuanto a la curva de calibración homóloga para IgE específica a penicilina, el comportamiento es similar y las rectas muestran un pendiente similar por lo que es fácilmente correlacionarlas.

4.4. Estandarización de señales utilizando un patrón interno

El control de la variabilidad de la respuesta del ensayo es un punto clave en cualquier método cuantitativo. Así, el empleo de un patrón interno es una estrategia ampliamente utilizada en cromatografía y espectroscopía de masas como método para cuantificar compuestos de forma precisa. El fundamento consiste en que cualquier factor que afecte a la señal generada por el analito lo hace por igual a la señal del patrón interno, manteniendo constante la relación entre señales (RICHMOND FACULTY STAFF). Un patrón interno es un compuesto (bio)químico que se añade a la muestra a analizar, que no está presente de forma natural su matriz, que presenta características físico-químicas similares y de concentración conocida.

En este estudio se seleccionó como patrón interno una IgE quimérica (qIgE) producida por la fusión de la región Fc de una IgE humana con anticuerpos de conejo específicos para el

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

alérgeno, por sus características similares a las IgE humanas a estudiar. En este caso, la qIgE utilizada reconoce específicamente el antibiótico β -lactámico aztreonam.

En primer lugar, se estudió el efecto de la concentración de la qIgE en la señal analítica y en la reproducibilidad. Para ello, se utilizaron disoluciones de qIgE de concentración conocida (0,26, 0,53; 1,06; 2,1; 4,25 y 8,5 UI/mL) que se añadieron a una muestra de suero, evaluándose la respuesta en el ensayo, imprimiendo en el array un conjugado antigénico de aztreonam. Los resultados se muestran en la Figura 16.

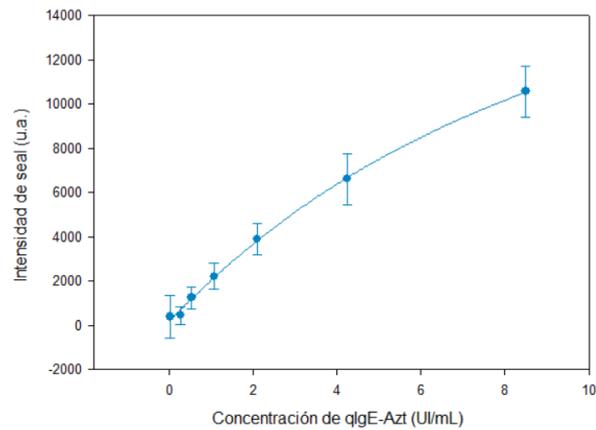


Figura 16. Relación de concentraciones del patrón interno (IgE quimera) diluido en suero libre de IgE (n=7).

En base a la señal analítica (correspondiente a la EC_{50} de la curva de calibrado) y a la reproducibilidad de la señal (18% y 2% interdisco e intradisco, respectivamente), se seleccionó como concentración óptima 4,25 UI/mL de patrón interno qIgE, correspondiente a una señal de 7954 ± 1431 como la adecuada para el estudio de estandarización de señales. Para evaluar la utilidad de esta qIgE como patrón interno, se añadieron 4,25 UI/mL de patrón interno a una muestra positiva de 5,73 UI/mL de IgE específica para amoxicilina. Esta muestra se diluyó a la mitad en suero libre de IgE, y ésta segunda muestra (2,86 UI/mL) también se diluyó a la mitad, creando una tercera muestra de concentración estimada de 1,43 UI/mL. De este modo, se determinó el factor de respuesta obtenido como relación de señal qIgE/antibiótico, siendo de $2,04 \pm 0,2$ y $1,27 \pm 0,12$ para IgE específica a amoxicilina y penicilina, respectivamente (Figura 17).

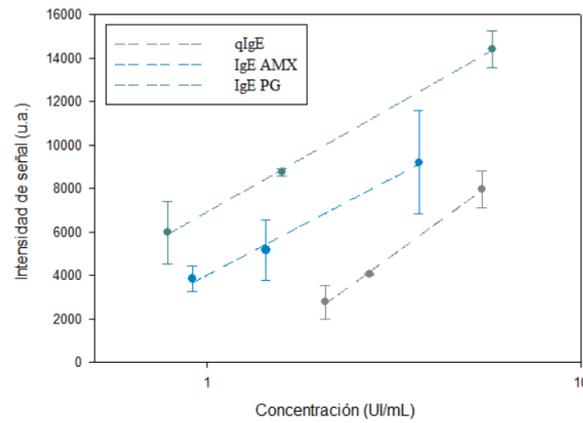


Figura 17. Relación entre las señales obtenidas para IgE específica a amoxicilina y penicilina y el patrón interno qIgE-Azt al realizar dos diluciones seriadas (n=2).

En definitiva, se observó que la disminución de señal del patrón interno era directamente proporcional al descenso de la señal del ensayo de IgE específica para amoxicilina y penicilina G. La efectividad de la estandarización de señales se comprobó, determinando la concentración obtenida tras la corrección de señales. Para la estandarización de señales se utiliza la fórmula: $S_N = S_A + \varphi_A(S_{PI} - S_{PIE})$, siendo S_N la señal normalizada; S_A la señal obtenida del analito, φ_A el factor respuesta entre la señal de la muestra y la del patrón interno, S_{PI} la señal del patrón interno para la concentración añadida y S_{PIE} la señal del patrón interno obtenida.

El estudio consistió en dopar con el patrón interno (4,25 UI/mL) una muestra de un paciente alérgico (10,2 UI/mL para IgE específicas a amoxicilina y 13,6 UI/mL para IgE específicas a penicilina) y realizar diluciones seriadas, simulando una pérdida del 50 y 75% de la muestra. Los resultados se muestran en la Tabla 3. En la estandarización de señales utilizando un patrón interno es necesario que las señales obtenidas con la fórmula de corrección se interpolen en las curvas de calibración homóloga y/o interna. El uso de una curva de calibración de WHO no es compatible con el uso de un patrón interno, ya que este es una IgE que participa en la cuantificación de IgE total, dando resultados mayores de los reales. El resultado se comparó con las concentraciones aportadas por el sistema de referencia ImmunoCAP y con la cuantificación realizada sin la estandarización.

Tabla 3. Resultados comparativos entre los métodos de cuantificación externos e internos (A) para IgE específicas a amoxicilina y penicilina G.

	IgE específicas a AMX	IgE específicas a PG
	10,2 UI/mL	13,6 UI/mL
% Variabilidad en el ensayo	ANALITO ENCONTRADO	
0	5,79 ± 1,23 UI/mL (A) 9,97 ± 1,21 UI/mL	3,71 ± 1,69 UI/mL (A) 5,78 ± 1,15 UI/mL
50	1,60 ± 0,06 UI/mL (A) 10,50 ± 0,85 UI/mL	1,52 ± 0,56 UI/mL (A) 4,30 ± 1,14 UI/mL
75	0,8 ± 0,33 UI/mL (A) 10,03 ± 0,37 UI/mL	1,05 ± 0,19 UI/mL (A) 4,51 ± 0,34 UI/mL

(A) cuantificación después de realizar la corrección de señal

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los resultados de la Tabla 3, podemos considerar que, sin la normalización de las señales, al sufrir una pérdida de la mitad de la señal en el ensayo, se obtienen valores 6 veces menores de su valor real para amoxicilina y 3 veces menores para penicilina. Esta relación aumenta si la señal de la muestra se ve reducida en un 75%, a valores 12 veces menores para amoxicilina y 4 para penicilina. También se puede apreciar que la recuperación de la señal es igual de efectiva para un 50% y un 75% de pérdida de la señal de la muestra. Sin embargo, la recuperación de señales mediante patrón interno funciona mejor para IgE específicas a amoxicilina que para penicilina. Estos resultados, y atendiendo a la clasificación de RAST (ver Tabla 2), demuestran la importancia de disponer de un patrón interno que indique si ha habido algún problema en el ensayo y permita la estandarización de las señales para una correcta clasificación de pacientes en su clase correspondiente.

Aunque es necesario realizar más ensayos, además de comprobar la relación entre patrón interno e IgE específica a diferentes diluciones, se ha demostrado que es posible el uso de una IgE quimera específica al antibiótico β -lactámico aztreonam como patrón interno en la estandarización de señales.

Además de para la corrección de señales, se planteó el uso de un patrón interno para la cuantificación de IgE específicas en formato microarray. Con ese objetivo, se prepararon diluciones seriadas de una muestra de concentración conocida de IgE específica a amoxicilina (5,10; 2,55; 1,28, 0,64, 0,32, 0,16 y 0,00 UI/mL) y a penicilina G (6,80; 3,40; 1,70; 0,85; 0,43; 0,21; 0,00 UI/mL) y se les añadió el volumen necesario para conseguir una concentración de 4,25 UI/mL de qIgE. Se calculó el factor de respuesta entre cada señal de la muestra y la señal constante del patrón interno y se representó junto a la concentración de la muestra (Figura 18).

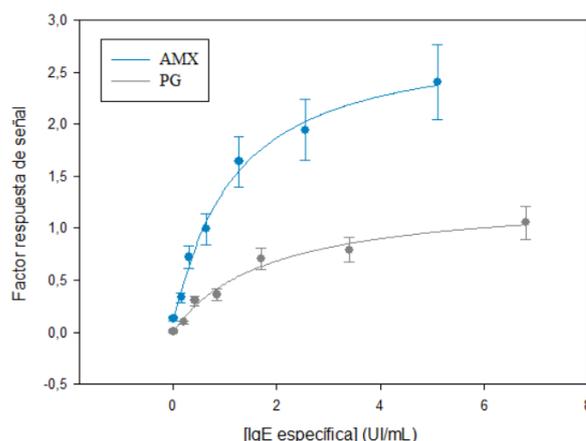


Figura 18. Curva de calibración del patrón interno qIgE para IgE específicas a amoxicilina (n=3).

Los parámetros analíticos de la curva para IgE específicas a amoxicilina son: EC_{50} 1,12 UI/mL, límite de detección 0,06 UI/mL, límite de cuantificación 0,1-5,1 UI/mL, R^2 0,99, con una reproducibilidad de 11%-22% interdisco para IgE específicas a amoxicilina. Los parámetros analíticos de la curva para IgE específicas a penicilina son: EC_{50} 1,77 UI/mL, límite de detección 0,11 UI/mL, intervalo de cuantificación 0,19-6,8 UI/mL, R^2 0,99.

Para comprobar la utilidad de la curva de calibración del patrón interno qIgE para la cuantificación de IgE específicas a amoxicilina y penicilina, se cuantificaron 5 muestras a las

que se les había añadido el volumen necesario de patrón interno para conseguir una concentración de este de 4,25 UI/mL (Tabla 4).

Tabla 4. Cuantificación de IgE específicas a amoxicilina y penicilina G mediante el método del patrón interno (PI).

AMOXICILINA			PENICILINA G		
ImmunoCAP (UI/mL)	Método PI (UI/mL)	Recuperación (%)	ImmunoCAP (UI/mL)	Método PI (UI/mL)	Recuperación (%)
5,10	5,57	109	6,80	7,69	120
0,64	0,58	91	0,85	0,70	82
2,55	2,23	87	3,40	2,74	81
0,32	0,37	115	0,43	0,55	155
1,28	1,43	112	1,70	2,12	125
0,16	0,13	80	0,21	0,12	59
		99 ± 15			103 ± 35

Los resultados obtenidos (Tabla 4) muestran que el método de cuantificación de patrón interno permite la cuantificación precisa de IgE específica, con un valor promedio de 99 y 103% para amoxicilina y penicilina G, respectivamente. Así pues, se ha demostrado que el uso de un patrón interno permite tanto corregir señales como cuantificar de forma precisa IgE específica. Esta nueva estrategia de calibración puede combinarse con otras, como la calibración interna, imprimiendo un conjugado de aztreonam junto al resto de reactivos en el array, permitiendo la cuantificación simultánea de IgE total y específica.

4.5. Análisis de muestras de suero

Atendiendo a los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo, los reactivos que se imprimieron en el disco para la cuantificación de muestras de suero humano fueron los conjugados específicos de amoxicilina, penicilina G, aztreonam, HSA como control negativo, omalizumab y control positivo de la segunda etapa a diferentes concentraciones (Figura 19).

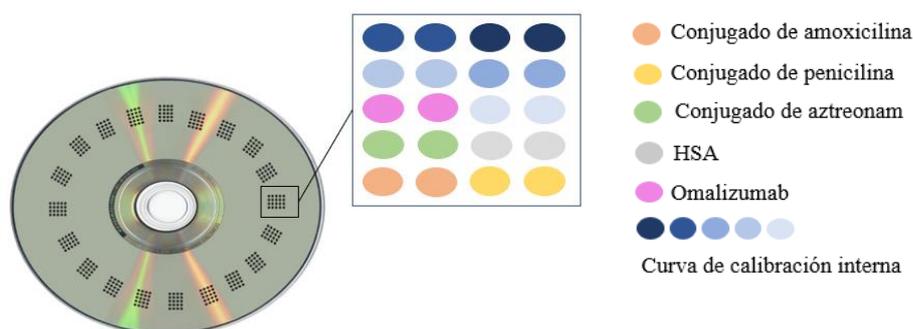


Figura 19. Esquema del microarray utilizado en el análisis de muestras de suero.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para determinar qué curva aportaba los resultados más similares a nuestra curva de calibración de referencia WHO, se cuantificaron 12 muestras de pacientes alérgicos y una muestra control, todas ellas proporcionadas por el servicio de alergia del Hospital Universitari La Fe. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de la cuantificación del análisis de muestras de suero, utilizando las curvas de calibrado WHO, interna y homóloga para IgE específica de amoxicilina (AMX) y penicilina G (PG).

Muestra	IgE específica a AMX (UI/mL)			IgE específica a PG (UI/mL)		
	WHO	Interna	Homóloga	WHO	Interna	Homóloga
1	0,38 ± 0,14	0,41 ± 0,17	0,38 ± 0,12	0,50 ± 0,18	0,50 ± 0,07	0,46 ± 0,2
2	0,17 ± 0,05	0,29 ± 0,12	0,15 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,14 ± 0,02	0,26 ± 0,11
3	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
4	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5
5	1,20 ± 0,20	0,87 ± 0,29	1,27 ± 0,43	0,14 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,33 ± 0,14
6	0,54 ± 0,20	0,53 ± 0,18	0,56 ± 0,08	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,06	0,05 ± 0,02
7	0,25 ± 0,09	0,26 ± 0,11	0,24 ± 0,08	< LD	< LD	< LD
8	1,09 ± 0,19	1,06 ± 0,23	1,16 ± 0,39	0,45 ± 0,16	0,46 ± 0,07	0,61 ± 0,20
9	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5
10	1,33 ± 0,23	0,71 ± 0,23	1,40 ± 0,47	0,31 ± 0,11	0,33 ± 0,16	0,30 ± 0,13
11	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5
12	0,76 ± 0,27	0,92 ± 0,30	0,80 ± 0,12	0,10 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,30 ± 0,13
13	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5	> 4,5

< LD: valor menor al límite de detección.

Como se muestra en la Tabla 5, se puede apreciar que, al aplicar los factores de respuesta de señal que relacionan las curvas alternativas (interna y homóloga) con el estándar WHO, los resultados son similares, indicando que ambas aproximaciones analíticas son buenas alternativas a la calibración mediante el estándar WHO. La curva homóloga presenta el inconveniente de ser una curva externa (no integrable por ahora en el array) y que requiere el uso de patrones específicos de IgE para cada antibiótico.

En la Figura 20 se muestra la correlación entre el método de referencia y el inmunoensayo en disco, utilizando la calibración interna como estrategia para cuantificar.

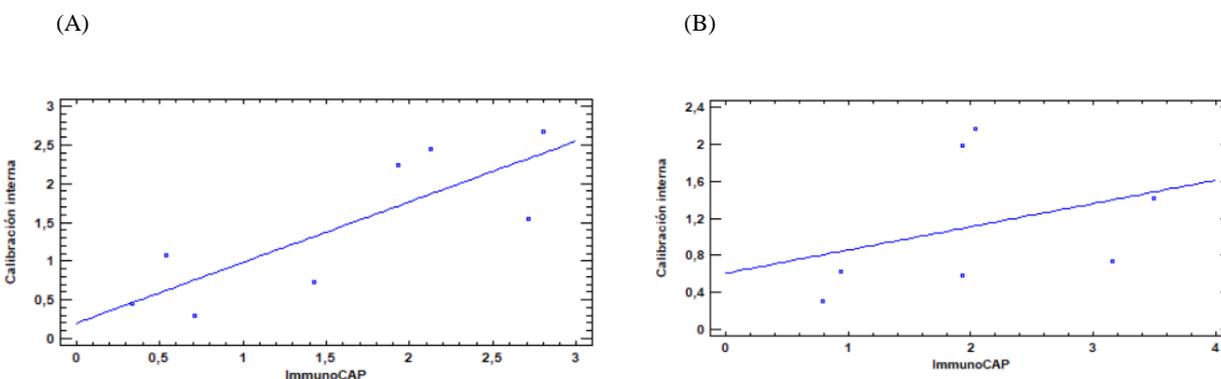


Figura 20. Correlación Pearson de los resultados de ImmunoCAP y los obtenidos mediante la calibración interna para IgE específica a amoxicilina (A) y a penicilina G (B).

La correlación entre los valores proporcionados por ImmunoCAP y los obtenidos mediante el inmunoensayo en disco con calibración interna reveló un coeficiente de 0,81, indicando una correlación moderada entre ambas variables. En cambio, para penicilina G, este coeficiente de relación fue 0,34, valor que indica una relación débil. Con estos resultados se concluye que a nivel cuantitativo los resultados son aceptables para amoxicilina y a nivel semicuantitativo (clasificación RAST) fueron muy prometedores para la clasificación de pacientes para ambos antibióticos.

En resumen, los resultados se obtuvieron del análisis de un número limitado de muestras de suero, haciendo necesario una mayor representatividad para obtener resultados y conclusiones más significativos. No obstante, se ha podido demostrar que es viable el uso de calibraciones alternativas para determinar semi y cuantitativamente IgE específica. Aprovechando el carácter multiplexado del ensayo utilizado, es especialmente interesante el uso de la calibración interna, que permite una cuantificación propia en cada array y que, como se ha demostrado (ver Figura 15), se comporta igual que la curva de calibración homóloga para IgE específica de amoxicilina. Esto hace posible una cuantificación directa de IgE específica para este antibiótico sin necesidad de utilizar calibradores externos.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo fin de grado se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- 1) Se ha demostrado que la aproximación de emplear curvas de calibración internas construidas a partir de una serie de controles positivos, permite la cuantificación de IgE específica de amoxicilina y penicilina G, mostrando resultados similares a los obtenidos mediante la cuantificación mediante la curva de WHO.
- 2) La calibración homóloga, utilizando muestras positivas como calibradores, ha resultado una buena aproximación para la correcta cuantificación de IgE específica, respondiendo de forma significativamente similar a la calibración interna.
- 3) El uso de una IgE quimera permite por un lado estandarizar señales, disminuyendo la variabilidad de la respuesta del ensayo y por otro lado, cuantificar de forma precisa IgE específica a amoxicilina y penicilina con buenas recuperaciones.

Este Trabajo Fin de Grado se ha realizado en el contexto de una beca de Colaboración del Ministerio de Educación. Además, los resultados obtenidos se presentaron en formato poster en el *XIII International Workshop on Sensors and Molecular Recognition*.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ABBAS, A. y LICHTMAN, A., P.S (2008). *Inmunología Celular y Molecular*. 6ª Edición. Sección IV: *Mecanismos Efectores de Las Respuestas Inmunitarias; Citocinas.*, pp. 267–303.
- ARIZA, A., MAYORGA, C., FERNANDEZ, TD., BARBERO, N., MARTÍN-SERRANO, A., PÉREZ-SALA, D., SÁNCHEZ-GÓMEZ, FJ., BLANCA, M., TORRES, MJ. & MONTAÑEZ MI. (2015). Hypersensitivity reactions to β -lactams: Relevance of hapten-protein conjugates. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 25(1), 12–25.
- BALDO, B., ZHAO, Z. & PHAM, N. (2001) Structural determinants of antibiotic allergy. *Current Allergy Reports*, 1(1), 23-31.
- BLANCA, M., MAYORGA, C., TORRES, M.J., RECHE, M., MOYA, C., RODRÍGUEZ, J.L., ROMANO, A. & JUAREZ, C. (2001). Clinical evaluation of Pharmacia CAP System™ RAST FEIA amoxicilloyl and benzylpenicilloyl in patients with penicillin allergy. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 56(9), 862–870.
- BLANCA, M., VEGA, J. M., GARCIA, J., CARMONA, M. J., TERADOS, S., AVILA, M. J., MIRANDA, A. & JUAREZ, C. (1990). Allergy to penicillin with good tolerance to other penicillins; study of the incidence in subjects allergic to betalactams. *Clinical & Experimental Allergy*, 20(5), 475–481.
- BLUMENTHAL, K. G., PETER, J.G., TRUBIANO, J.A. & PHILLIPS, E.J. (2019). Antibiotic allergy. *The Lancet*, 393(10167), 183–198.
- CASTELLS, M., & BONAMICHI- SANTOS, R. (2019). Drug Hypersensitivity. In *Clinical Immunology* (Fifth Edit).
- CHIRIAC, A. M., BANERJI, A., GRUCHALLA, R.S., THONG, B. Y. H., WICKNER, P., MERTERS, P.M., TERREEHORST, I. & BLUMENTHAL, K.G. (2019). Controversies in Drug Allergy: Drug Allergy Pathways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 7(1), 46-60.e4.
- CLARKE, C. H., & FUNG, E.T. (2018). Protein microarray technology. *Molecular Biomethods Handbook: Second Edition*, 128, 451–461.
- CRETICH, M., DAMIN, F., & CHIARI, M. (2014). Protein microarray technology: How far off is routine diagnostics? *Analyst*, 139(3), 528–542.
- DOLEN, W. K. (2003). Allergy Review Series X : Progress in diagnosis of allergy in vitro IgE antibody in the serum – detection and diagnostic significance. *Allergy*, (5), 717–723.
- DOÑA, I., TORRES, M. J., MONTAÑEZ, M. I., & FERNÁNDEZ, T.D. (2017). In vitro diagnostic testing for antibiotic allergy. *Allergy, Asthma and Immunology Research*, 9(4), 288–298.
- EKINS, R. (1998). Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays. *Clinical Chemistry*, 44:9, pp.2015-2030.
- GINER, M.T. (2013). Alergia a medicamentos. Conceptos básicos y actitud a seguir por el pediatra. *Sección de Alergia e Inmunología Clínica Hospital San Juan de Dios Barcelona* 1(1), 1-24.
- GOIKOETXEA, M.J., SANZ, M.L., GARCÍA, B.E., MAYORGA, C., LONGO, N., GAMBOA, P.M., BARBER, D., CABALLERO-MOLINA,T., DE LA CALLE-TORAL, A., ESCRIBANO-MORA, L., GARCÍA-MARTÍNEZ, J.M., LABRADOR, M., LÓPEZ-HOYOS, M., MARTÍNEZ-QUESADA, J. & MONTERSEIRÍN MATEO, J. (2013). Specific IgE Determination Techniques Recommendations for the Use of In Vitro Methods to Detect Specific Immunoglobulin E: Are They Comparable? *J Investig Allergol Clin Immunol*, 23(7), 448–454.

- GUZMÁN M, M.A., SALINAS L, J., TOCHE P, P., y AFANI S, A. (2009). Alergia a beta-lactámicos. *Revista Chilena de Infectología*, 21(4), 285–298.
- HAMILTON, R.G. (2003). Chapter 37 – Laboratory Tests for Allergic and Immunodeficiency Diseases, en *Middleton's Allergy Principles & Practice*. Mosby, Inc., an affiliate of Elsevier. Philadelphia, Pennsylvania. 611-730
- HAMILTON, R. G., & ADKINSON, N. F. (2004) In vitro assays for the diagnosis of IgE-mediated disorders. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(2), 213–225.
- KINDT, T.J. GOLDSBY, R.A, y OSBORNE, B.A. (2007). *Inmunología de Kuby*. 6ª Ed. McGrawHill Interamericana, Mexico. 699 pp.
- LÓPEZ, M. Estandarización de IgE Específica Documento consenso del comité de inmunología clínica de la SEAIC. *Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC)*. Documento consultado el 9 de junio de 2019
- MAYORGA, C., SANZ, M.L., GAMBOA, P.M., GARCÍA, B. E., CABALLERO, M.T., GARCÍA, J.M., LABRADOR, M., LAHOZ, C., LONGO-ARESO, N., LÓPEZ-HOYOS, M., MARTÍNEZ-QUESADA, J.& MONTESEIRÍN, F.J (2010.). In Vitro Diagnosis of Immediate Allergic Reactions to Drugs: An Update. *J. Investig Allergol Clin Immunol*, 20(2), 103-109.
- MAYORGA, C., DOÑA, I., PEREZ-INESTROSA, E., FERNÁNDEZ, T.D., & TORRES, M.J. (2017). The value of in vitro tests to diminish drug challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6).
- MORAIS, S., PUCHADES, R., & MAQUIEIRA, Á. (2016). Disc-based microarrays: principles and analytical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(17), 4523–4534.
- MORAIS, S., TORTAJADA-GENARO, L.A., ARNADIS-CHOVER, T., PUCHADES, R. & MAQUIEIRA, A. (2009). Multiplexed microimmunoassays on a digital versatile disk. *Analytical Chemistry*, 81(14).
- PHADIA 2010. The tool for the future in allergy diagnostics. ImmunoCAP ISAC technology. Documento consultado el 9 de junio de 2019
- QUEZADA, A. (1981). Reacciones de hipersensibilidad. *Revista Chilena de Pediatría*, 52(6), 524–529.
- ROMANO, A., TORRES, M.J., CASTELLS, M., SANZ, M.L., & BLANCA, M. (2011). Diagnosis and management of drug hypersensitivity reactions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127, S67–S73.
- RICHMOND FACULTY STAFF, Chem301 Tutorial: Internal Standards. Página web consultada el 6 de julio de 2019. https://facultystaff.richmond.edu/~cstevens/301/IS_General.html
- SÁNCHEZ- GONZÁLEZ, M.K., BARBARROJA- ESCUDERO, J., ANTOLÍN- AMÉRIGO, D., & RODRÍGUEZ- RODRÍGUEZ, M. (2013). Reacciones alérgicas a fármacos. *Medicine (Spain)*, 11(29), 1808–1818.
- SHEARER, W.T. & FLEISHER, T.A. (2003). Chapter 1- The Immune system: an overview, en *Middleton's Allergy Principles & Practice*. Mosby, Inc., an affiliate of Elsevier. Philadelphia, Pennsylvania. 1-14
- Sociedad Española de Inmunología Clínica, Alergología y Asma Pediátrica (SEICAP) Página web visitada el 9 de junio de 2019 <http://pacientes.seicap.es/es/an%C3%A1lisis-de-sangre-40181#que-alergenos-se-estudian-con-la-ige-especifica>
- SOUSA-PINTO, B., CARDOSO-FERNANDES, A., ARAÚJO, L., FONSECA, J.A.,

- FREITAS, A., & DELGADO, L. (2018). Clinical and economic burden of hospitalizations with registration of penicillin allergy. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 120(2), 190-194.e2.
- SUTANDY, F., QUIAN, J., CHEN, C. & ZHU, H. (2013). Overview of protein microarrays. *Current Protocols in Protein Science*, 1–16.
- ThermoFisher Scientific Inc. (2012). Principio de la prueba ImmunoCAP Specific IgE. Página web visitada el 9 de junio de 2019 <http://www.phadia.com/es/5/Productos/Ensayos/1/Principio-del-test-ImmunoCAP-Specific-IgE/>
- TORNERO, P. Alergia a otros medicamentos. *Libro de las enfermedades alérgicas de la fundación BBVA*. Página web visitada el 9 de junio de 2019 <https://www.fbbva.es/microsite/alergiasfbbva/alergia-a-los-medicamentos/33-alergia-a-otros-medicamentos/index.html>
- TORRES, B. J., & FONTÁN, D. M. (2013). Pruebas diagnósticas en alergología pediátrica. *Alergología Pediátrica*, 185–205.
- TORRES, M.J., MONTAÑEZ, M.I., ARIZA, A., SALAS, M., FERNÁNDEZ, T.D., BARBERO, N., MAYORGA, C. & BLANCA, M. (2016). The role of IgE recognition in allergic reactions to amoxicillin and clavulanic acid. *Clinical and Experimental Allergy*, 46(2), 264–274.
- TORRES, M.J., BLANCA, M., FERNANDEZ, J., ROMANO, A., DE WECK, A., ABERER, W., BROCKOW, K., PICHLER, W.J., DEMOLY, P. & EACI GROUP. (2003). Diagnosis of immediate allergic reactions to beta-lactam antibiotics. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 58(10), 961–972.
- VIDAL, C., & GUDE, F. (2007). Evaluación de la elevación de la IgE. *Tratado de Alergología. Madrid: Ergon*, 81–94.