

Desarrollo y evaluación de una técnica de
quimioluminiscencia para la detección de
antígeno de galactomanano de *Aspergillus* spp.
en muestras biológicas.



Alba Leyva Calero

Directores

María Manuela Jiménez Valera

José Javier Rojas González

Programa de Doctorado Biología Fundamental y de Sistemas

Universidad de Granada

2023

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Alba Leyva Calero
ISBN: 978-84-1195-033-6
URI: <https://hdl.handle.net/10481/84685>

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
ABREVIATURAS	15
RESUMEN.....	19
INTRODUCCIÓN.....	23
1. MICOSIS INVASIVAS.....	23
1.1. TIPOS DE MICOSIS.....	23
1.2. PRINCIPALES AGENTES ETIOLÓGICOS DE LAS IFI.....	26
2. EL GÉNERO <i>ASPERGILLUS</i>	27
2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO <i>ASPERGILLUS</i>	27
2.2. CICLO BIOLÓGICO.....	28
3. CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i>	29
4. MECANISMOS DE ENTRADA Y HERRAMIENTAS DE DEFENSA DEL HOSPEDADOR.....	32
4.1. INMUNIDAD INNATA.....	34
4.2. INMUNIDAD ADQUIRIDA.....	38
5. EL GALACTOMANANO EN LA PARED DE <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i> Y DE OTRAS ESPECIES.....	39
6. FACTORES DE RIESGO.....	42
7. FORMAS CLÍNICAS.....	49
8. TRATAMIENTO Y RESISTENCIA AL MISMO.....	52
9. DIAGNOSTICO.....	59
9.1. BIOMARCADORES USADOS PARA EL DIAGNÓSTICO: β -D-GLUCANO, GALACTOMANANO, ADN ESPECIFICO DE <i>ASPERGILLUS</i> (PCR).....	59
9.2. TÉCNICAS EMPLEADAS EN EL DIAGNÓSTICO.....	62
10. DESARROLLO DE UN INMUNOENSAYO ENZIMATICO BASADO EN QUIMIOLUMINISCENCIA.....	72
10.1. TIPOS DE TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS.....	72
10.2. POSIBLES CAUSAS DE LA OBTENCIÓN DE RESULTADOS FALSOS ASOCIADOS A LA TÉCNICA. 76	
OBJETIVOS.....	81
MATERIAL Y MÉTODOS.....	85
1. CEPAS DE GÉNEROS Y ESPECIES HONGOS.....	85
2. MEDIO DE CULTIVO PARA HONGOS.....	85

3. ANTÍGENOS NATIVOS PURIFICADOS.....	86
4. REACTIVOS.	86
5. SOLUCIONES.....	87
6. REACTIVOS Y MATERIAL EMPLEADO EN INMUNOENSAYOS.	89
7. MATERIAL EMPLEADO EN PURIFICACIÓN Y CROMATOGRAFÍA.....	90
8. MUESTRAS BIOLÓGICAS DE GALACTOMANANO.	91
9. MUESTRAS BIOLÓGICAS DE OTRAS PATOLOGÍAS.....	113
10. FÁRMACOS.....	115
11. SUSTANCIAS ENDÓGENAS.	116
12. KITS DE DIAGNÓSTICO.	116
13. INSTRUMENTOS DE LABORATORIO.	117
14. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN.	117
15. MÉTODO DE CULTIVO Y CRECIMIENTO DE LA FASE MICELIAL DE <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i>	118
16. MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ANTÍGENO.....	119
16.1. OBTENCIÓN DE ANTÍGENO DE GALACTOMANANO DE DIFERENTE PESO MOLECULAR. .	119
16.2. OBTENCIÓN DE ANTÍGENO DE GALACTOMANANO UNIDO A PROTEÍNA PARTIENDO DE SOBRENADANTE DE CULTIVO.	121
17. EVALUACIÓN DEL ANTÍGENO DE GALACTOMANANO PURIFICADO MEDIANTE TÉCNICA ELISA.	122
18. INMUNIZACIÓN DE RATAS Y OBTENCIÓN DE HIBRIDOMAS.	123
19. CARACTERIZACIÓN DE HIBRIDOMAS.	126
19.1. ISOTIPADO.....	126
19.2. REACTIVIDAD de los HIBRIDOMAS FRENTE A ANTÍGENO PURIFICADO DE DISTINTO PESO MOLECULAR.....	126
19.3. INHIBICIÓN DE HIBRIDOMAS FRENTE AL ANTICUERPO MONOCLONAL EB-A2.	128
19.4. ESTUDIO DE AVIDEZ DE HIBRIDOMAS.	129
20. PURIFICACIÓN DE LOS HIBRIDOMAS PARA LA OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.	131
21. OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA INMUNOENZIMÁTICO DE CAPTURA TIPO SANDWICH.	133
21.1. CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PURIFICADOS.....	133
21.2. DISEÑO DEL SISTEMA DE CAPTURA TIPO SANDWICH BASADO EN QUIMIOLUMINISCENCIA.	135

22. ANÁLISIS DEL SISTEMA DE CAPTURA TIPO SANDWICH.	156
23. FORMATO MONOTEST Y AUTOMATIZACIÓN DE LA TÉCNICA.	159
23.1. MONODOSIS.	159
23.2. AUTOMATIZACIÓN.	161
24. VALIDACIÓN DEL KIT DE DIAGNÓSTICO POR LOS DIFERENTES SISTEMAS AUTOMATIZADOS.	163
25. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO Y FUNCIONAMIENTO ANALÍTICO.	165
25.1. RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO.	165
25.2. FUNCIONAMIENTO ANALÍTICO.	170
26. COMPARACIÓN DE DIFERENTES KITS DE DIAGNÓSTICO.	178
27. ESTRATEGIAS PARA LA CONCENTRACIÓN DE MUESTRAS.	179
28. COVID-19: DESARROLLO DE ASPERGILOSIS PULMONAR INVASIVA COMO COMPLICACIÓN SECUNDARIA.	183
29. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.	184
RESULTADOS	187
1. EVALUACIÓN DE ANTÍGENO DE GALACTOMANANO PURIFICADO.	187
2. ANÁLISIS DE LOS HIBRIDOMAS OBTENIDOS.	188
2.1. ISOTIPADO DE HIBRIDOMAS.	188
2.2. REACTIVIDAD de los HIBRIDOMAS FRENTE AL ANTÍGENO PURIFICADO DE GALACTOMANANO DE DISTINTO PESO MOLECULAR.	190
2.3. INHIBICIÓN DE HIBRIDOMAS FRENTE AL MONOCLONAL EB-A2.	194
2.4. ESTUDIO AVIDEZ DE HIBRIDOMAS.	196
3. ANTICUERPOS MONOCLONALES PURIFICADOS.	198
4. OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA INMUNOENZIMÁTICO DE CAPTURA TIPO SANDWICH.	200
4.1. CARACTERIZACIÓN ANTICUERPOS MONOCLONALES PURIFICADOS.	200
4.2. DISEÑO DEL SISTEMA DE CAPTURA BASADO EN QUIMIOLUMINISCENCIA.	205
4.3. MUESTRAS BIOLÓGICAS.	234
5. ANÁLISIS DEL SISTEMA DE CAPTURA TIPO SANDWICH MEDIANTE LA TÉCNICA CLIA.	246
6. VALIDACIÓN DEL KIT POR LOS DIFERENTES SISTEMAS AUTOMATIZADOS.	249
6.1. ANÁLISIS del MÉTODO EN el SISTEMA VIRCLIA®	249
6.2. ANÁLISIS del MÉTODO NORMAL Y del MÉTODO SIN AGITACIÓN EN el SISTEMA VIRCLIA® 250	
6.3. ANÁLISIS del MÉTODO EN el SISTEMA VIRCLIA® PLUS CON RESPECTO AL VIRCLIA®.	257

6.4. ANÁLISIS del MÉTODO EN el SISTEMA VIRCLIA® LOTUS CON RESPECTO AI VIRCLIA®.....	260
6.5. COMPARACIÓN DE LOS TRES SISTEMAS AUTOMATIZADOS EN PARALELO.....	263
7. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO Y FUNCIONAMIENTO ANALÍTICO.	266
7.1. RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO.	266
7.2. FUNCIONAMIENTO ANALÍTICO.	283
8. COMPARACIÓN DE DIFERENTES KITS DE DIAGNÓSTICO.	293
8.1. INMUNOCROMATOGRAFÍA.	293
8.2. INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO.....	296
9. ESTRATEGIAS PARA LA CONCENTRACIÓN DE MUESTRAS.	299
9.1. UNIÓN DE ANTICUERPO MONOCLONAL A RESINAS Y PARTÍCULAS MAGNÉTICAS.	299
9.2. UNIÓN DE ANTÍGENO A LECTINAS.	303
DISCUSIÓN	311
CONCLUSIONES.....	327
BIBLIOGRAFÍA.....	333
ANEXOS	357
ANEXO I. ESTUDIO COMPARATIVO TÉCNICA CLIA – ELISA.....	357
ANEXO II. DATOS BRUTOS ESTUDIO INTERNO GLOBAL.....	359
ANEXO III. ANÁLISIS ROC ESTUDIO INTERNO GLOBAL.....	372
ANEXO IV. RESULTADOS BAL ESTUDIO INTERNO.	379
ANEXO V. RESULTADOS SUERO ESTUDIO INTERNO.	382
ANEXO VI. DATOS BRUTOS ESTUDIO MULTICÉNTRICO EXTERNO.	387
ANEXO VII. ANÁLISIS ROC ESTUDIO MULTICENTRICO EXTERNO.	395
ANEXO VIII. ANÁLISIS ROC BIO-RAD FRENTE A CRITERIO EORTC/MSG.	403
ANEXO IX. ANÁLISIS ROC VIRCLIA FRENTE A CRITERIO EORTC/MSG.....	408
ANEXO X. REPETITIVIDAD Y REPRODUCIBILIDAD.....	413
ANEXO XI. REACTIVIDAD CRUZADA DEBIDO A OTRAS INFECCIONES.	417
ANEXO XII. INTERFERENCIAS ENDÓGENAS.	422

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de la pared celular de <i>Aspergillus fumigatus</i> .	31
Tabla 2. Revisión incidencia aspergilosis pulmonar invasiva asociada a Influenza.	45
Tabla 3. Revisión incidencia CAPA.	47
Tabla 4. Cepas géneros y especies de hongos.	85
Tabla 5. Antígenos nativos purificados.	86
Tabla 6. Reactivos.	86
Tabla 7. Tampones conservantes/bloqueantes de microplacas.	87
Tabla 8. Tampones estabilizantes de anticuerpos conjugados.	88
Tabla 9. Muestras biológicas empleadas en la optimización de la técnica.	91
Tabla 10. Muestras biológicas empleadas en el estudio interno para el análisis del rendimiento diagnóstico.	93
Tabla 11. Muestras biológicas empleadas en el estudio externo para el análisis del rendimiento diagnóstico.	105
Tabla 12. Muestras biológicas empleadas en el estudio de reactividad cruzada.	113
Tabla 13. Interferencias relacionadas con fármacos.	116
Tabla 14. Interferencias relacionadas con sustancias endógenas.	116
Tabla 15. Kits de diagnóstico empleados para la caracterización de muestras biológicas.	116
Tabla 16. Tipo de placas de CLIA.	138
Tabla 17. Soluciones bloqueantes.	139
Tabla 18. Soluciones para la dilución de anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa.	143
Tabla 19. Clasificación para el análisis del coeficiente kappa de Cohen.	158
Tabla 20. Clasificación muestras de estudio externo según su naturaleza y origen.	169
Tabla 21. Muestras para análisis de reacción cruzada no relacionada con AI.	174
Tabla 22. Evaluación antígeno purificado sobre kit de Bio-Rad.	187
Tabla 23. Isotipo de cada uno de los hibridomas.	188
Tabla 24. Reactividad de los hibridomas sobre placa con y sin antígeno.	190
Tabla 25. Porcentaje de inhibición de cada uno de los hibridomas frente a antígeno de glicoproteína.	194
Tabla 26. Índice de avidéz de cada uno de los hibridomas frente a antígeno de glicoproteína.	196
Tabla 27. Ensayo indirecto: titulación de clones purificados frente a antígeno GP.	200
Tabla 28. Ensayo indirecto: titulación de clones purificados frente a antígeno >440kDa o proteína.	200
Tabla 29. Inhibición de cada clon purificado frente a distinto tipo de antígeno con respecto	202
Tabla 30. Valores RLU y valores en % de inhibición de todos los clones purificados.	204
Tabla 31. Valores RLU de ensayo de captura tipo sandwich con clones purificados como elementos de captura y mAB de Bio-Rad como elemento detector.	205
Tabla 32. Valores ratio señal/fondo de ensayo de captura tipo sandwich con clones purificados como elementos de captura y mAB de Bio-Rad como elemento detector.	206

Tabla 33. Valores DO de ensayo de captura tipo sandwich con mAB de Bio-Rad como elemento de captura y clones purificados como elementos detectores.	206
Tabla 34. Valores ratio señal/fondo de ensayo de captura tipo sandwich con mAB de Bio-Rad como elemento de captura y clones purificados como elementos detectores.	207
Tabla 35. Valores RLU de ensayo captura tipo sandwich donde todos los clones purificados actúan como elemento de captura y como elemento detector del sistema.	209
Tabla 36. Valores ratio señal/fondo de ensayo captura tipo sandwich donde todos los clones purificados actúan como elemento de captura y como elemento detector del sistema.	211
Tabla 37. Análisis de diferente tipo de placa en ensayo captura tipo sandwich.	214
Tabla 38. Análisis de diferentes concentraciones de anticuerpo dispuesto sobre distinto tipo de placa.	216
Tabla 39. Evaluación diferentes concentraciones de mAB en placa con muestras reales.	218
Tabla 40. Valores RLU y ratio señal/fondo de la evaluación de diferentes soluciones conservantes/bloqueantes de placa.	221
Tabla 41. Evaluación diferentes conservantes/bloqueantes en ensayo captura con muestras reales.	222
Tabla 42. Estabilidad forzada placa sensibilizada con mAB.	224
Tabla 43. Evaluación mAB conjugado en ensayo directo.	224
Tabla 44. Evaluación mAB conjugado en diferentes diluyentes sobre ensayo directo.	225
Tabla 45. Evaluación diferentes diluyentes de conjugado en ensayo de captura tipo sandwich.	225
Tabla 46. Estabilidad forzada de mAB conjugado.	228
Tabla 47. Estabilidad forzada de calibrador en diferentes diluyentes.	229
Tabla 48. Diferentes periodos de incubación a aplicar en la técnica de CLIA.	231
Tabla 49. Evaluación diferentes periodos de incubación con antígeno de bajo peso molecular.	231
Tabla 50. Evaluación diferentes periodos de incubación con muestras reales.	232
Tabla 51. Estabilidad forzada de muestras tras varios ciclos de congelación-descongelación.	235
Tabla 52. Estabilidad real muestras suero y LBA.	236
Tabla 53. Tratamientos a estudiar sobre las muestras biológicas.	238
Tabla 54. Evaluación diferentes tratamientos de muestra.	239
Tabla 55. Evaluación diferentes soluciones de tratamiento con muestras.	243
Tabla 56. Estabilidad sobrenadante obtenido tras tratamiento de las muestras.	244
Tabla 57. Peso (g) resultante de cada sobrenadante tras el tratamiento.	246
Tabla 58. Ensayo captura tipo sandwich en técnica de CLIA y ELISA.	246
Tabla 59. Distribución de muestras según su clasificación en cada técnica.	249
Tabla 60. Métodos VIRCLIA®.	249
Tabla 61. Evaluación métodos en sistema VIRCLIA®.	250
Tabla 62. Evaluación método AG_GM2 normal y sin agitación.	251
Tabla 63. Evaluación del método AG_GM2 normal y sin agitación con muestras reales.	252
Tabla 64. Evaluación del método AG_GM2 normal (N) y sin agitación (SA) con muestras reales. ...	254
Tabla 65. Evaluación del método AG_GM2 sin agitación VIRCLIA® y del método para VIRCLIA® PLUS con muestras reales.	258

Tabla 66. Evaluación del método AG_GM2 sin agitación VIRCLIA® y del método para VIRCLIA® LOTUS con muestras reales.	260
Tabla 67. Comparación de los tres sistemas automatizados.	263
Tabla 68. Clasificación de muestras según su interpretación.	268
Tabla 69. Resultados obtenidos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y ratios de verosimilitud.	268
Tabla 70. Distribución cualitativa de las muestras por ambas técnicas.	268
Tabla 71. Clasificación de muestras LBA según su interpretación.	272
Tabla 72. Resultados obtenidos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y ratios de verosimilitud para muestras LBA.	272
Tabla 73. Clasificación de muestras suero según su interpretación.	274
Tabla 74. Resultados obtenidos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y ratios de verosimilitud para muestras suero.	274
Tabla 75. Distribución cualitativa de las muestras por ambas técnicas.	276
Tabla 76. Resultados obtenidos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos para estudio retrospectivo.	278
Tabla 77. Análisis de repetitividad y reproducibilidad.	283
Tabla 78. Reactividad frente a diferentes géneros de hongos.	285
Tabla 79. Interferencia de fármacos en el kit de VirClia.	286
Tabla 80. Reacción cruzada debida a otras patologías no relacionadas con AI.	287
Tabla 81. Análisis de la interferencia de anticuerpos HAMA sobre el kit de VirClia.	287
Tabla 82. Interferencia debida a sustancias endógenas.	288
Tabla 83. Interferencia de lidocaína en muestras LBA.	289
Tabla 84. Estudio estabilidad acelerada 3 lotes.	290
Tabla 85. Estudio estabilidad monodosis abierta.	290
Tabla 86. Estudio estabilidad de transporte.	291
Tabla 87. Estudio estabilidad real 3 lotes.	291
Tabla 88. Titulación Ag glicoproteína y bajo peso molecular (<13 kDa) en VirClia.	293
Tabla 89. Muestras reales sobre kit de VirClia.	295
Tabla 90. Panel de muestras reales de suero evaluado por Bio-Rad, Euroimmun y VirClia.	296
Tabla 91. Tabla contingencia Bio-Rad vs. Euroimmun y Bio-Rad vs. VirClia.	297
Tabla 92. Tabla contingencia Euroimmun vs. VirClia.	297
Tabla 93. Índice kappa de Cohen obtenido tras la comparación de Bio-Rad, Euroimmun y VirClia.	297
Tabla 94. Valores RLU y diferencias de señal resultantes del ensayo de captura y ensayo indirecto basado en CLIA tras el proceso de cromatografía basado en la unión de mAB a resina.	300
Tabla 95. Valores RLU y diferencias de señal resultantes del ensayo de captura y ensayo indirecto basado en CLIA tras el proceso de cromatografía basado en la unión de mAB a partículas magnéticas.	302
Tabla 96. Reactividad de lectinas de distinta naturaleza frente a antígeno de bajo peso molecular.	304

Tabla 97. Valores RLU y diferencias de señal resultantes del ensayo de captura basado en CLIA tras el proceso de cromatografía basado en la unión de antígeno a lectinas.	305
Tabla 98. Valores RLU y diferencias de señales resultantes del ensayo de captura tras el proceso de cromatografía basado en el uso de resinas de lectinas.	307

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de IFI.	25
Figura 2. (A) Aspecto de un aspersorio. (B) Aspecto de <i>Aspergillus</i>	27
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Aspergillus</i> spp.	29
Figura 4. Composición pared celular de <i>Aspergillus fumigatus</i>	30
Figura 5. Mecanismos celulares contra la infección fúngica	33
Figura 6. Esquema de las 3 vías del sistema del complemento.	36
Figura 7. Estructura del galactomanano.	40
Figura 8. Formas de presentación del galactomanano.	40
Figura 9. Síntesis de galactomanano en <i>Aspergillus fumigatus</i>	41
Figura 10. Esquema de las distintas enfermedades asociadas a <i>Aspergillus</i> spp. en función de la respuesta inmune del huésped.	50
Figura 11. Dianas y mecanismos de acción de los diferentes agentes antifúngicos.	53
Figura 12. Estructura química de las equinocandinas.	54
Figura 13. Estructura química de Polioxina (A) y Nikomicina (B).	55
Figura 14. Estructura química de voriconazol.	55
Figura 15. Estructura química de isavuconazol.	56
Figura 16. Estructura química Anfotericina B Liposomal.	56
Figura 17. Estructura química F901318.	57
Figura 18. Estructura química Ibrexafungerp.	58
Figura 19. Estructura química Fosmanogepix.	58
Figura 20. Estructura química T-2307.	58
Figura 21. Estructura de un kit de inmunocromatografía.	66
Figura 22. Estructura de ensayo directo.	72
Figura 23. Estructura de ensayo indirecto.	73
Figura 24. Estructura de ensayo de inhibición o competición.	73
Figura 25. Estructura de ensayo de captura o tipo sandwich.	74
Figura 26. Reacción de quimioluminiscencia.	75
Figura 27. Cultivo <i>Aspergillus fumigatus</i>	119
Figura 28. Procedimiento de obtención de antígeno de galactomanano de distinto peso molecular a partir de biomasa de micelio.	121
Figura 29. Procedimiento de obtención de galactomananoproteína y proteína a partir de sobrenadante.	122
Figura 30. Evaluación antígeno purificado de galactomanano por técnica comercial de Bio-Rad.	123
Figura 31. Producción de hibridomas.	124
Figura 32. Inmunización de ratas y obtención de hibridomas.	125
Figura 33. Inmunoensayo enzimático llevado a cabo para el isotipado de hibridomas.	126
Figura 34. Esquema de los pasos a seguir en el ensayo indirecto.	127
Figura 35. Esquema de los pasos seguidos en el ensayo de inhibición.	129
Figura 36. Esquema de los pasos a seguir en el ensayo de avidéz: avidéz baja.	130
Figura 37. Esquema de los pasos a seguir en el ensayo de avidéz: avidéz alta.	131

Figura 38. Esquema de ensayo de captura tipo sandwich.....	135
Figura 39. Composición monodosis VirClia.....	159
Figura 40. Sistema automatizado VIRCLIA®.....	161
Figura 41. Sistema automatizado VIRCLIA® PLUS.....	162
Figura 42. Sistema automatizado VIRCLIA® LOTUS.....	163
Figura 43. Estrategias puestas en práctica para la concentración de muestras.....	179
Figura 44. Pasos generales seguidos en el proceso de cromatografía.....	180
Figura 45. Gráfica de líneas que ilustra la tendencia de los valores índice obtenidos por el kit de Bio-Rad para cada tipo de antígeno.....	188
Figura 46. Gráfica en anillo que muestra la proporción de cada isotipo sobre el total.....	189
Figura 47. Diagrama de caja y bigotes de la reacción inespecífica aportada por los hibridomas.....	192
Figura 48. Gráfica de líneas que muestra la reactividad de cada uno de los hibridomas sobre cada uno de los antígenos.....	193
Figura 49. Gráfica de líneas que muestra el índice de avidéz, el grado de inhibición y la reactividad de cada uno de los hibridomas ensayados.....	198
Figura 50. Reactividad de clones purificados frente a antígeno de distinta naturaleza.....	201
Figura 51. Inhibición de clones purificados frente a distintas fracciones antigénicas con respecto al mAB EB-A2.....	203
Figura 52. Ensayo captura tipo sandwich combinando clones purificados y mAB Bio-Rad.....	207
Figura 53. Representación valores de ratio señal/fondo de cada pareja de anticuerpos en el ensayo de captura tipo sandwich.....	213
Figura 54. Representación valores ratio señal/fondo obtenidos en el ensayo de captura tipo sandwich con cada tipo de plástico.....	215
Figura 55. Correlación de ratios señal/fondo de la placa Thermo Maxisorp y Greiner High Binding.....	216
Figura 56. Representación valores de ratio señal/fondo para analizar el comportamiento del mAB de captura dispuesto a distintas concentraciones sobre placa con distinto tipo de plástico.....	217
Figura 57. Valores ratio Señal/CO de las tres concentraciones evaluadas para mAB dispuesto en placa.....	220
Figura 58. Diagrama de caja y bigotes. Comparación de la distribución de valores ratio Señal/CO de las tres concentraciones evaluadas para mAB dispuesto en placa.....	220
Figura 59. Valores ratio Señal/CO según el CO teórico para cada tipo de solución bloqueante.....	222
Figura 60. Diagrama de caja y bigotes. Comparación de la distribución de valores ratio Señal/CO de los cinco tipos de solución bloqueante.....	223
Figura 61. Valores ratio Señal/CO para cada tipo de diluyente de conjugado.....	227
Figura 62. Diagrama de caja y bigotes. Comparación de la distribución de valores ratio Señal/CO de los tres tipos de diluyentes de conjugado.....	228
Figura 63. Ensayo estabilidad forzada de placa, conjugado y controles.....	230
Figura 64. Evaluación diferentes periodos de incubación en ensayo captura con antígeno de bajo peso molecular.....	232
Figura 65. Valores ratio Señal/CO de la evaluación de diferentes periodos de incubación con muestras reales.....	233

Figura 66. Diagrama de cajas y bigotes. Comparación de la distribución de valores ratio Señal/CO de los distintos periodos de incubación.	234
Figura 67. Estabilidad forzada con ciclos de congelación-descongelación en muestras reales.	235
Figura 68. Estabilidad real en muestras reales.	237
Figura 69. Evaluación diferentes tratamientos de muestra.	240
Figura 70. Diagrama de cajas y bigotes. Comparación de la distribución de valores ratio Señal/CO de los distintos tratamientos de muestras biológicas.	241
Figura 71. Resultado tras protocolo de tratamiento de muestras con las diferentes soluciones. ...	242
Figura 72. Correlación entre ambas soluciones de tratamiento.	243
Figura 73. Estabilidad sobrenadante obtenido tras tratamiento de muestra.	245
Figura 74. Curva ROC de estudio comparativo CLIA vs. ELISA.	248
Figura 75. Diagrama de puntos interactivo del estudio comparativo CLIA vs. ELISA.....	248
Figura 76. Tendencia calibrador por los métodos AG_GM2 normal y sin agitación.....	252
Figura 77. Correlación valores índice de muestras reales evaluadas por método AG_GM2 normal y sin agitación.	253
Figura 78. Tendencia calibrador para ambos métodos en sistema VIRCLIA®.....	256
Figura 79. Correlación valores índice de muestras para ambos métodos en sistema VIRCLIA®.	257
Figura 80. Correlación entre valores índice en el sistema VIRCLIA® y VIRCLIA® PLUS.	259
Figura 81. Tendencia calibrador para método en sistema VIRCLIA® PLUS.	260
Figura 82. Correlación entre valores índice en el sistema VIRCLIA® y VIRCLIA® LOTUS.	262
Figura 83. Tendencia calibrador para método en sistema VIRCLIA® y VIRCLIA® LOTUS.	262
Figura 84. Correlación de los sistemas VIRCLIA® PLUS y VIRCLIA®.	264
Figura 85. Correlación de los sistemas VIRCLIA® LOTUS y VIRCLIA®.	264
Figura 86. Correlación de los sistemas VIRCLIA® PLUS y VIRCLIA® LOTUS.	265
Figura 87. Curva ROC de la técnica CLIA vs. ELISA.	267
Figura 88. Diagrama interactivo de puntos donde se define el punto de corte óptimo para la técnica CLIA.	267
Figura 89. Diagrama de violín. Distribución global de los datos de ambas técnicas en estudio interno.	270
Figura 90. Diagrama de violín. Distribución individualizada de negativos y positivos para la técnica de ELISA (Bio-Rad) en estudio interno.	270
Figura 91. Diagrama de violín. Distribución individualizada de negativos y positivos para la técnica de CLIA (VirClia) en estudio interno.	271
Figura 92. Curva ROC de la técnica CLIA vs. ELISA para muestras LBA.	273
Figura 93. Diagrama interactivo de puntos donde se define el punto de corte óptimo para la técnica CLIA para muestras LBA.	273
Figura 94. Curva ROC de la técnica CLIA vs. ELISA para muestras suero.	275
Figura 95. Diagrama interactivo de puntos donde se define el punto de corte óptimo para la técnica CLIA para muestras suero.	275
Figura 96. Curva ROC de la técnica CLIA vs. ELISA para el estudio externo.	277
Figura 97. Diagrama interactivo de puntos donde se define el punto de corte óptimo para el estudio externo.	277

Figura 98. Curva ROC de la técnica ELISA vs. criterios EORTC/MSG.	279
Figura 99. Curva ROC de la técnica CLIA vs. criterios EORTC/MSG.	279
Figura 100. Diagrama interactivo de puntos donde se define el punto de corte óptimo para la técnica ELISA.	280
Figura 101. Diagrama interactivo de puntos donde se define el punto de corte óptimo para la técnica CLIA.	280
Figura 102. Diagrama de violín. Distribución global de los datos de ambas técnicas en estudio externo.	281
Figura 103. Diagrama de violín. Distribución individualizada de negativos y positivos para la técnica ELISA (Bio-Rad) en estudio externo.	282
Figura 104. Diagrama de violín. Distribución individualizada de negativos y positivos para la técnica CLIA (VirClia) en el estudio externo.	282
Figura 105. Resultados expresados en CV (%) del estudio de repetitividad y reproducibilidad del kit de VirClia.	284
Figura 106. Estudio de estabilidad forzada y real del kit de VirClia.	292
Figura 107. IMMY söna <i>Aspergillus</i>	293
Figura 108. AspLFD OLM.	293
Figura 109. Muestras reales sobre kit de inmunocromatografía IMMY.	294
Figura 110. Muestras reales sobre kit de inmunocromatografía OLM.	295
Figura 111. Correlación Euroimmun vs. VirClia.	298
Figura 112. Correlación Bio-Rad vs. Euroimmun.	298
Figura 113. Correlación VirClia vs. Bio-Rad.	299
Figura 114. Evaluación unión de mAB a resina de Sefarosa.	301
Figura 115. Evaluación unión de mAB a partículas magnéticas.	303
Figura 116. Reactividad lectinas frente a antígeno de bajo peso molecular.	305
Figura 117. Evaluación unión de antígeno a lectinas.	306
Figura 118. Evaluación concentración basada en el uso de lectinas.	308

ABREVIATURAS

ABPA: aspergilosis broncopulmonar alérgica

Ac: anticuerpo

Ag: antígeno

AI: aspergilosis invasiva

AMP: péptidos antimicrobianos

APC: células presentadoras de antígeno

AspICU: algoritmo clínico para el diagnóstico de aspergilosis invasiva en pacientes de UCI sin enfermedades inmunosupresoras de base

AUC: área bajo la curva (area under the curve)

BSA: albúmina de suero bovino (bovine serum albumin)

CAPA: aspergilosis pulmonar asociada a COVID-19

CE: marcado CE (“Conformité Européenne”)

CGD: enfermedad granulomatosa crónica

CLIA: inmunoensayo quimioluminiscente (ChemiLuminescent Immuno Assay)

CLR: lectina tipo C

CPA: aspergilosis pulmonar crónica

Ct: umbral de ciclo (cycle threshold)

CV: coeficiente de variación

DO: densidad óptica

ECMM/ISHAM: Confederación Europea de Micología Médica y Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

EORTC/MSG: Grupo de Enfermedades Infecciosas de la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer y el Grupo de Estudio de Micosis

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

FJD: Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz

FN: falsos negativos

FP: falsos positivos

GAG: galactosaminogalactano

GlcNAC: N-acetil- β -D-glucosamina

GP: antígeno de glicoproteína

GM: galactomanano

HAMA: anticuerpos anti-murinos humanos

HGM: Hospital General Universitario Gregorio Marañón

HLA PAZ: Hospital Universitario La Paz

IAPA: aspergilosis pulmonar asociada a Influenza

IC: intervalo de confianza

IFI: infecciones fúngicas invasivas

IFN: interferón

IFN- γ : interferón-gamma

IGIV: inmunoglobulina intravenosa

IL: interleuquina

IVD: diagnóstico in vitro

LBA: lavado broncoalveolar

LoD: límite de detección

LPS: lipopolisacáridos

-LR: ratio de verosimilitud negativo

+LR: ratio de verosimilitud positivo

mAB: anticuerpo monoclonal (monoclonal antibody)

MAC: complejo de ataque a la membrana

MBP: proteínas de unión a mananos

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

NET: trampas extracelulares

NLR: receptores de reconocimiento de patrones tipo NOD (NOD-like receptor)

NK: células asesinas naturales (natural killer)

NPV: valor predictivo negativo

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEG: polietilenglicol

PMN: polimorfonucleares

PPV: valor predictivo positivo

PRR: receptores de reconocimiento de patrones

qPCR: PCR en tiempo real

RIC: rango intercuartílico

RLU: unidades relativas de luz (relative light units)

ROC: curva de rendimiento diagnóstico (receiver operating characteristic curve)

ROS: especies reactivas de oxígeno

SIDA: síndrome de la inmunodeficiencia adquirida

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

TLR: receptores de reconocimiento de patrones tipo Toll (Toll-like receptor)

TMB: tetrametilbencina

TNF- α : factor necrosis tumoral alfa

UCI: Unidad Cuidados Intensivos

VN: verdaderos negativos

VP: verdaderos positivos

RESUMEN

Las especies de los géneros *Candida* y *Aspergillus* son las causas más frecuentes de micosis invasivas. Este tipo de infección afecta con mayor frecuencia a pacientes inmunodeprimidos, especialmente pacientes oncohematológicos, con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o sometidos a tratamientos inmunosupresores, aunque puede afectar también a enfermos no neutropénicos que han padecido infecciones virales (Influenza, SARS-CoV-2) o sometidos a procesos quirúrgicos.

Aspergillus fumigatus, es la especie más frecuentemente implicada en la aspergilosis invasiva, aunque otras especies del género *Aspergillus* también pueden producirla. Su diagnóstico es extremadamente difícil, siendo necesario emplear todo tipo de técnicas de imagen y microbiológicas. Las técnicas de tinción y cultivo presentan baja sensibilidad y, por otro lado, el tiempo de obtención de los resultados es prolongado. La detección de anticuerpos en personas inmunodeprimidas es de poca utilidad y las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos no han llegado a generalizarse por condicionamientos técnicos.

Posiblemente, la técnica de mayor utilidad en diagnóstico, es la detección de antígeno de galactomanano, por su sensibilidad y aparición precoz en las muestras biológicas. Es un heteropolisacárido compuesto por un núcleo de manano no inmunogénico y cadenas laterales de galactofuranosa inmunorreactivas que se encuentran en la pared celular de *Aspergillus*.

El objetivo de la presente investigación consistió en desarrollar un inmunoensayo enzimático de captura tipo sandwich basado en quimioluminiscencia (CLIA), capaz de detectar el antígeno de galactomanano en muestras biológicas, tanto de origen respiratorio como en suero. Un segundo objetivo fue conseguir simplificar al máximo su ejecución, y que la duración de la prueba fuera lo más reducida posible, en comparación con la técnica de inmunoenzimática (ELISA) convencional, manteniendo los valores de sensibilidad y especificidad.

Para alcanzar estos objetivos se produjeron y purificaron antígenos de *Aspergillus fumigatus* y tras la inmunización de murinos, se obtuvieron anticuerpos monoclonales reactivos frente a antígenos de galactomanano purificados de distintos pesos moleculares, tanto aislados como asociados a proteínas.

Estos anticuerpos monoclonales se caracterizaron mediante ensayos de avidéz, isotipado, reactividad e inhibición, y se seleccionó un clon que se empleó como anticuerpo de captura. Este mismo anticuerpo se conjugó con peroxidasa y se empleó como anticuerpo detector. Se estudiaron las condiciones idóneas para su fijación en la superficie de reacción, los diluyentes más adecuados para el anticuerpo conjugado, junto con el resto de elementos que garantizaran una elevada capacidad de discriminación entre las muestras negativas y positivas.

Para su comercialización, y con el objetivo de ser una herramienta de diagnóstico útil, se diseñó un formato de monodosis automatizable, que permitiera un uso individualizado de la prueba, esencial para poder disponer de una herramienta aplicable a situaciones de urgencia.

El estudio comparativo con la técnica de ELISA convencional, demostró un buen rendimiento diagnóstico en el estudio interno de prestaciones (AUC = 0,944; Error estándar = 0,011 – 95% IC = 0,920-0,962). Se realizó un estudio externo en el que se encontraron valores equivalentes (AUC = 0,97; Error estándar = 0,014 – 95% IC = 0,945-0,985). Finalmente, se definió el punto de corte, que señalaba el mejor límite para discriminar las muestras positivas de las negativas y conseguir optimizar los valores de sensibilidad y especificidad. En el estudio externo, se analizaron un subgrupo de muestras (N=120) con clasificación de aspergilosis invasiva probada/probable según los criterios EORTC/MSG definidos en 2019. En este análisis se obtuvo una especificidad común para la técnica CLIA y ELISA (100%), pero con una sensibilidad mayor para la técnica CLIA que para ELISA (80,9% y 63,2%, respectivamente). El grado de concordancia empleando el coeficiente kappa dio un grado de acuerdo “sustancial” entre ambas técnicas en ambos estudios ($\kappa = 0,726$ y $\kappa = 0,722$, respectivamente).

Además del análisis del rendimiento diagnóstico, se llevó a cabo el estudio del funcionamiento analítico, el cual aportó información acerca de la precisión de la técnica, con valores de coeficiente de variación (CV) < 10% para las muestras ensayadas con distinto grado de positividad; se constató la ausencia de interferencias debidas a sustancias endógenas, capaces potencialmente de alterar los resultados de este tipo de pruebas, a diversos fármacos que pueden provocar la aparición de resultados falsos positivos y a anticuerpos anti-murinos (HAMA). Se estudió la vida útil del kit desarrollado y se definió su estabilidad, conservado a 4°C, en 15 meses. Tanto en la técnica de ELISA convencional, como en el nuevo desarrollo en CLIA, se obtuvo reactividad cruzada frente a otras especies de hongos del género *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus* y *A. terreus*), frente al género *Penicillium* y frente a *Histoplasma capsulatum*.

Alcanzar tasas de sensibilidad y especificidad equivalentes a la técnica comercial ELISA, con una duración de la técnica más reducida, su formato en monodosis y la automatización del proceso hacen del kit de VirClia una herramienta idónea para el diagnóstico de aspergilosis invasiva.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. MICOSIS INVASIVAS.

Las micosis invasivas, también denominadas infecciones fúngicas invasivas (IFI), consisten en infecciones de tipo oportunista ocasionadas por diversos géneros del reino *Fungi* (Whittaker, 1969). Tienen lugar con mayor frecuencia en pacientes inmunodeprimidos y pacientes críticos. Como consecuencia, se presentan elevadas tasas de morbilidad y mortalidad. La detección de la infección en etapa temprana y la aplicación de un tratamiento eficaz sigue siendo el objetivo principal del manejo clínico de estas micosis. La falta de herramientas de diagnóstico estandarizadas a corto plazo, la consecuente aplicación tardía de fármacos antifúngicos y la aparición de especies resistentes a dichos fármacos, hacen de este tipo de infecciones un grave problema de salud para el paciente.

En los últimos años, se ha conseguido mejorar las tasas de morbilidad y mortalidad debido a mejoras en el tratamiento y al uso de profilaxis, pero siguen dándose casos de recaídas, persistencia, reinfecciones, la denominada enfermedad refractaria o las infecciones fúngicas innovadoras.

1.1. TIPOS DE MICOSIS.

La naturaleza que adquirirá la infección dependerá de la patogenicidad del hongo, la respuesta inmune del huésped y el sitio de la infección. En función de la localización se clasifican en: superficiales, cutáneas/mucosas, subcutáneas e invasivas, dándose estas últimas en aquellos casos en los que los hongos invaden los tejidos y órganos y se aprovechan del estado debilitado del sistema inmunitario.

La mayoría de los hongos que causan infecciones en humanos son patógenos oportunistas que aprovechan el grado de inmunodepresión del paciente para implantarse e incluso diseminarse.

El escenario más favorable que se puede dar en este tipo de infección es que la aplicación de un tratamiento consiga reducirla hasta eliminarla (Figura 1.A) aunque se sabe que la sucesión de acontecimientos no siempre es así.

Se conoce como **IFI persistente**¹ (Figura 1.B) a la infección fúngica invasiva que no modifica su estado desde el inicio de tratamiento. Si no se trata puede progresar y también darse cuando no existe respuesta frente al tratamiento. Esto último puede ocurrir en casos donde el deterioro inmunitario del paciente se ha incrementado durante el curso de la infección.

La **IFI refractaria**¹ (Figura 1.C) consiste en la progresión de la enfermedad, empeoramiento y aparición de nuevos signos y síntomas debido a la falta de respuesta frente al tratamiento empleado.

Por otro lado, se conoce como **IFI con recaída**¹ (Figura 1.D) a la infección fúngica invasiva que tiene lugar después de la aplicación del tratamiento y es debida al mismo patógeno y en la misma zona corporal que se dio anteriormente.

Por último, la **IFI innovadora**¹ es aquella que se origina durante la exposición de un paciente a un tratamiento antifúngico ya sea profiláctico, empírico, preventivo o dirigido. La reacción frente al mismo puede darse en el inicio o durante su curso. Se emplea profilaxis o tratamiento empírico (Figura 1.E) en pacientes que no cumplen criterios diagnósticos por lo que el desarrollo de IFI se clasifica como “innovadora”. Por otro lado, se aplica tratamiento dirigido o preventivo (Figura 1.F) a pacientes con IFI probable o probada, por tanto, la mejora inicial de los signos clínicos también nos llevaría a diferenciar este tipo de IFI de la refractaria. Los primeros signos y síntomas de este tipo de IFI suelen aparecer después de la aplicación de un antifúngico. Puede contemplarse justo tras la aplicación de la última dosis u horas o días más tarde dependiendo de la vida media y los intervalos de dosificación empleados de cada fármaco. El día del comienzo de este tipo de infección será el día de la aparición del primer síntoma y no el día de la finalización del tratamiento.

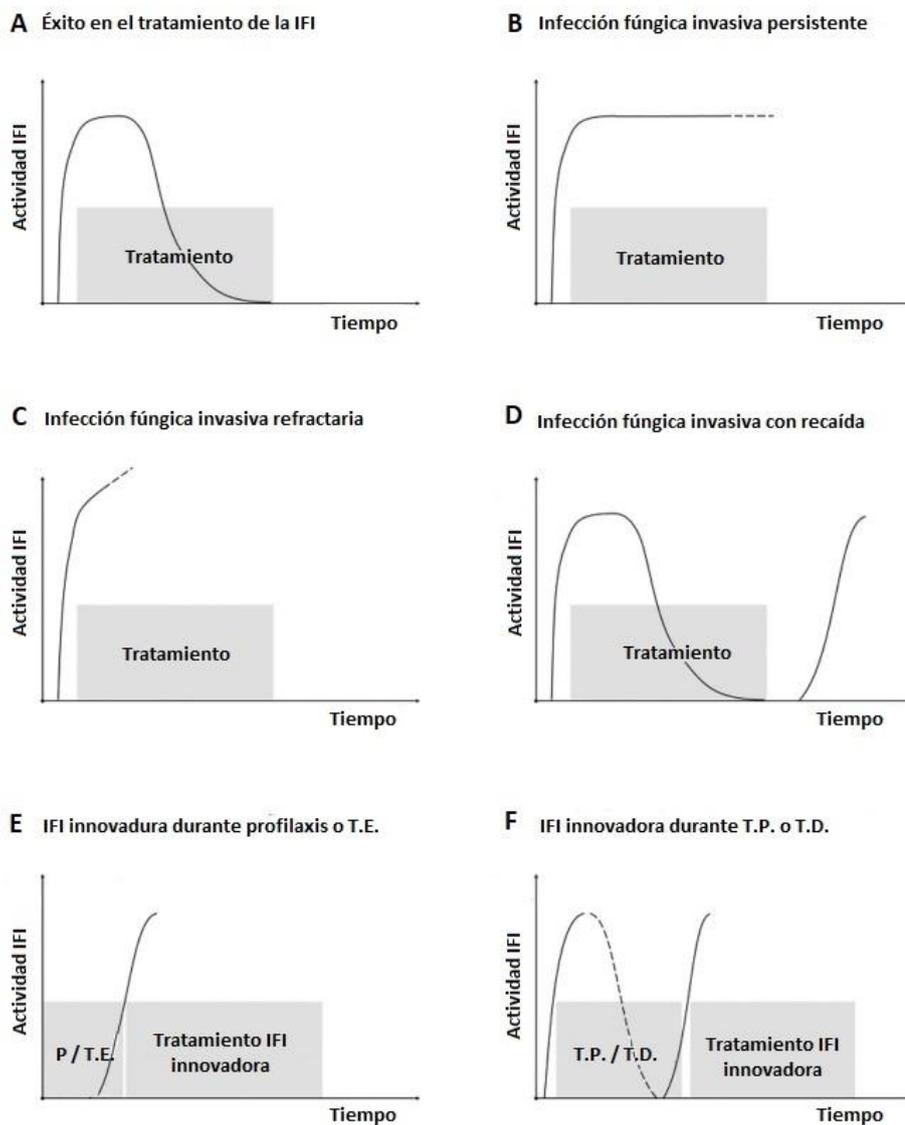


Figura 1. Tipos de IFI.

(P: Profilaxis; T.E.: Tratamiento Empírico; T.P.: Tratamiento Preventivo; T.D.: Tratamiento Dirigido)
(Figura modificada de Cornely y colaboradores¹)

El EORTC/MSG o Grupo de Enfermedades Infecciosas de la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer y el Grupo de Estudio de Micosis, ha establecido una serie de definiciones con el objetivo de ayudar en la investigación de este tipo de infecciones. Anteriormente, dichas definiciones tenían su base en pacientes con cáncer y receptores de órganos sólidos o células madre. Debido al desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico y a la aparición de este tipo de infecciones en otros grupos de pacientes, se ha visto necesario la actualización de las mismas^{2,3}. Estas fomentan la evaluación de pruebas de diagnóstico, estudios epidemiológicos y el análisis de antifúngicos. En las anteriores definiciones no se contaba con el empleo de la técnica de detección del ácido nucleico fúngico debido a la falta de estandarización del método y tampoco se contaban la inmunodeficiencia grave hereditaria y recuentos bajos de linfocitos CD4 como factores

de riesgo. También se han incluido nuevos patrones radiológicos, así como puntos de corte óptimos para cada tipo de muestra en la detección de galactomanano (GM).

Dichas definiciones tienen su fundamento en la patología de base del paciente, características clínicas y radiológicas y aspectos microbiológicos. Se clasifican en tres tipos:

- IFI Probada: detección de presencia de elementos fúngicos en zonas consideradas habitualmente como estériles en pacientes independientemente de su estado inmunológico y enfermedad subyacente. A pacientes con este tipo de infección se les aplicará tratamiento preventivo o dirigido.
- IFI Probable: pacientes con factores de riesgo de base (por ejemplo, neutropenia prolongada) y criterio clínico y microbiológico, ya sea cultivo, citología o microscopía. A pacientes con este tipo de infección se les aplicará tratamiento preventivo o dirigido.
- IFI Posible: pacientes con factores de riesgo base (por ejemplo, neutropenia prolongada) y presencia de criterio clínico, pero no microbiológico.

1.2. PRINCIPALES AGENTES ETIOLÓGICOS DE LAS IFI.

Entre los géneros más comunes causantes de IFI y que generan elevadas tasas de mortalidad se encuentra el género *Candida*, representando el 40% anual en pacientes inmunodeprimidos, el género *Aspergillus*, al cual se le asignan tasas entre 30-95% y, por último, *Cryptococcus* con un rango entre 20-70%⁴.

Los hongos son organismos eucariotas que obtienen nutrientes y energía a través de materia orgánica. Son capaces de adaptarse con facilidad a su entorno, favorecidos en gran medida por la presencia de pared celular. Esta los dota de rigidez, les previene de la entrada de sustancias tóxicas y les evita la lisis osmótica. La pared celular es la principal barrera de defensa y también conforma la vía de interacción del hongo con el huésped. La composición de la misma varía durante el ciclo de vida y es dependiente de las condiciones que acompañan a su crecimiento. Está compuesta por glucanos, glicoproteínas y quitina⁵.

El conjunto de hongos patógenos del hombre y los animales lo conforman las especies del grupo *Eumycota* que está compuesto por tres filos: *Zigomycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota*. Dentro del filo *Ascomycota*, se encuentra el género *Aspergillus*, responsable de elevadas tasas de infección en pacientes inmunodeprimidos y críticos dando lugar a lo que se denomina aspergilosis⁶. Dicho género será objeto de estudio, así como uno de los componentes que forman parte de su pared y que es liberado durante el crecimiento de las hifas, el GM⁷. La detección de este biomarcador se ha convertido en una herramienta fundamental para el diagnóstico de aspergilosis invasiva (AI) ya que solo es producido por ciertos géneros de hongos como *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp.⁸.

2. EL GÉNERO *ASPERGILLUS*.

Los hongos del género *Aspergillus* son filamentosos, saprofiticos y crecen de forma natural sobre materia orgánica en descomposición. Son ascomicetos que pueden crecer a temperaturas que varían entre 15-55°C. Las hifas son septadas e hialinas y los conidióforos producen numerosos conidios que suelen tener 2-3 μm de diámetro⁹. Las hifas se presentan septadas en rama formando un ángulo agudo de aproximadamente 45°⁷. Los humanos inhalan de 100 a 1.000 conidios a diario. Generalmente, la vía de transmisión es mediante la inhalación de esporas por lo que el aparato respiratorio es la primera barrera con la que se encuentra el patógeno. Estas viajan hasta los alveolos pulmonares pudiendo pasar al torrente sanguíneo dando lugar a la colonización de numerosos órganos del cuerpo especialmente en personas inmunodeprimidas¹⁰.

2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO *ASPERGILLUS*.

Taxonómicamente el género *Aspergillus* se encuadra en el:

Dominio: *Eukarya*

Reino: *Fungi*

Filo: *Ascomycota*

Clase: *Eurotiomycetes*

Orden: *Eurotiales*

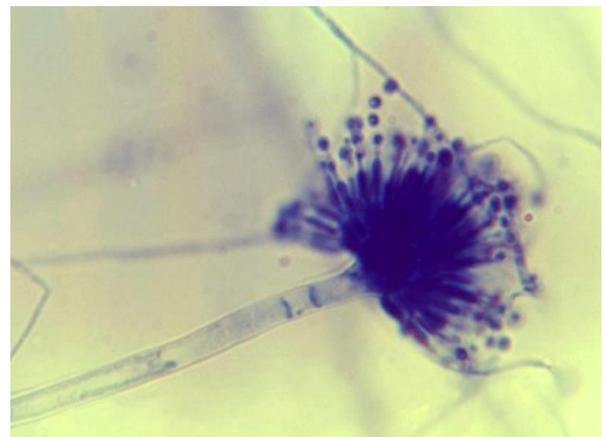
Familia: *Trichocomaceae*

Género: *Aspergillus*

Se describió por primera vez en 1729 por el botánico italiano Pier Antonio Micheli en su obra "*Nova Plantarum Genera*"⁹. Asignó ese nombre por la similitud que le encontró con un aspersorio (Figura 2).



A



B

Figura 2. (A) Aspecto de un aspersorio. (B) Aspecto de *Aspergillus*.
(Imagen CDC/Dr. Lucille K. Georg.)

La especie *Aspergillus fumigatus* es un hongo saprófito con gran capacidad adaptativa y es el principal responsable de causar AI, aunque la incidencia debida a otras especies se está viendo en aumento. Las encontradas con mayor frecuencia son *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus* y *Aspergillus niger*^{4,11}.

2.2. CICLO BIOLÓGICO.

El ciclo de vida del género *Aspergillus* presenta reproducción sexual y asexual (Figura 3). La forma de reproducción más frecuente es a través de esporas asexuales denominadas conidiósporos que crecen en los extremos de las fiálides. Estas son células especializadas que se disponen sobre una estructura denominada vesícula. Presentan un núcleo que se divide en dos, la parte más externa es la que se rodeará de protoplasma y esto a su vez de una membrana, dando lugar al conidiósporo o conidio. El núcleo que queda hacia el interior, volverá a dividirse para dar lugar a nuevos conidiósporos. Las fiálides pueden aparecer representadas en una o dos filas. Cuando existen fiálides secundarias, estas se sostienen sobre las primarias y a partir de las mismas aparecen los conidiósporos; en el caso de existir exclusivamente primarias, estas serán la base de los mismos. El elemento base de esta estructura lo conforma el conidióforo el cual presenta una célula pie claramente diferenciada. Los conidiósporos nacen en cadenas, son estructuras esféricas pigmentadas y equinuladas de 2,5 µm de diámetro. Una vez desprendidas, cuando las condiciones son favorables, ocurre el proceso de germinación dando lugar al micelio vegetativo que será el que cierre el ciclo asexual.

La reproducción sexual es rara en este género, aunque también ocurre; mayoritariamente son homotálicos, es decir, producen gametos masculinos y femeninos en un mismo micelio. El órgano femenino está formado por un tallo, a continuación, se encuentra un segmento denominado ascogonio y, por último, la tricogina. Esta última será la parte receptiva de su homólogo masculino. El órgano masculino, polinodio, presenta en la parte terminal el anteridio. Una vez ocurre la fusión entre la punta del anteridio y la tricogina, tiene lugar la plasmogamia, dando como producto un elemento esférico que se conoce como cleistotecio o ascocarpo. Aquí es donde se forman los ascos que contienen las ascosporas. Rodeando este elemento se localiza el peridio, una capa protectora de la masa de ascosporas. Cuando las ascosporas alcancen el grado de maduración determinado, serán liberadas. Una vez liberadas al exterior darán lugar al micelio vegetativo mediante el proceso de germinación, cerrando así el ciclo. Tras diversos estudios se ha sugerido la existencia de heterotalismo en la especie *Aspergillus fumigatus*, es decir, el requerimiento de la fusión de un

micelio productor de gametos femeninos y un micelio productor de gametos masculinos para la generación del cleistotecio o ascocarpo¹².

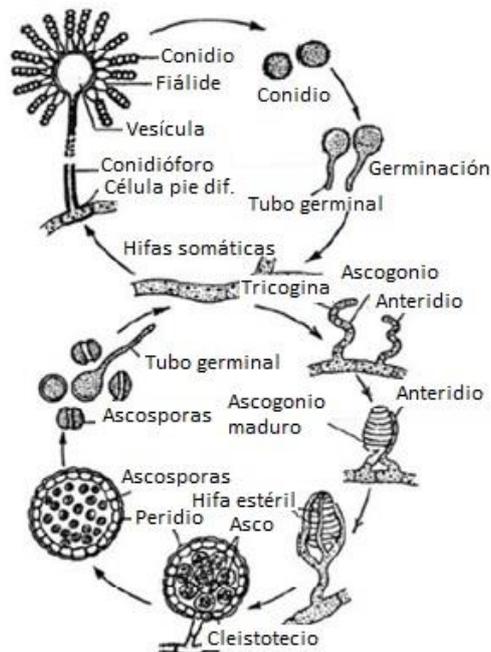


Figura 3. Ciclo de vida de *Aspergillus* spp.
(Célula pie dif.: célula del pie diferenciada) (Figura modificada de Akar y colaboradores¹³)

3. CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE *ASPERGILLUS FUMIGATUS*.

Aspergillus fumigatus es un hongo filamentoso hialino ubicuo, caracterizado por su naturaleza saprofítica, es capaz de crecer en cualquier superficie. Por lo general se ramifica en dicotomía, generalmente formando un ángulo agudo. Su crecimiento y desarrollo está favorecido por la humedad y altas temperaturas. Presenta termotolerancia, resistencia al estrés oxidativo y capacidad de autofagia. Esta última es una característica que ayuda a los organismos a sobrevivir en periodos de estrés por falta de nutrientes ya que son capaces de acceder a una fuente de nutrientes intracelulares reciclados para cubrir las necesidades celulares esenciales. Aun presentando esta ventaja, *Aspergillus fumigatus* es capaz de secretar hidrolasas permitiendo obtener nutrientes de los tejidos de los mamíferos y así no tener que activar el mecanismo de autofagia¹⁴.

Una red tridimensional de polisacáridos dará lugar a la pared celular del hongo. La composición de la misma depende del tipo morfológico que presente según esté en modo conidio o hifa¹⁵, siendo notable la proporción de hidrofobinas y melanina en los primeros y galactosaminogalactano (GAG) en las segundas (Figura 4).

La pared celular de conidios está compuesta por proteínas de naturaleza hidrofóbica denominadas hidrofobinas que se disponen organizadas de manera estrecha. RodA es la proteína más conocida, cuenta con la ventaja de no ser reconocida por la inmunidad innata del huésped y hace que los conidios en reposo pasen desapercibidos ya que enmascaran los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Tal y como se verá a continuación, esta proteína se elimina cuando el conidio germina y madura. Esto hace que se expongan los PAMP y entren en contacto con los mecanismos encargados de la inmunidad. En la pared celular de los conidios se diferencian dos capas. Una parte interna que contiene β -1,3-glucanos, GM y quitina. Esta estructura proporciona rigidez y estabilidad favoreciendo que estas formas fúngicas sean resistentes a cambios bruscos ambientales. La parte externa contiene la misma composición a excepción de la presencia en este caso de α -1,3-glucanos. Esta conformación los dota de mayor flexibilidad.

La pared celular de hifas, al igual que la pared de conidios, presenta dos partes diferenciadas. La parte interna contiene un β -1,3-glucanos, quitina, GM, GAG y β -1,4,-glucanos. La parte externa presenta α -1,3-glucanos, GAG y GM.

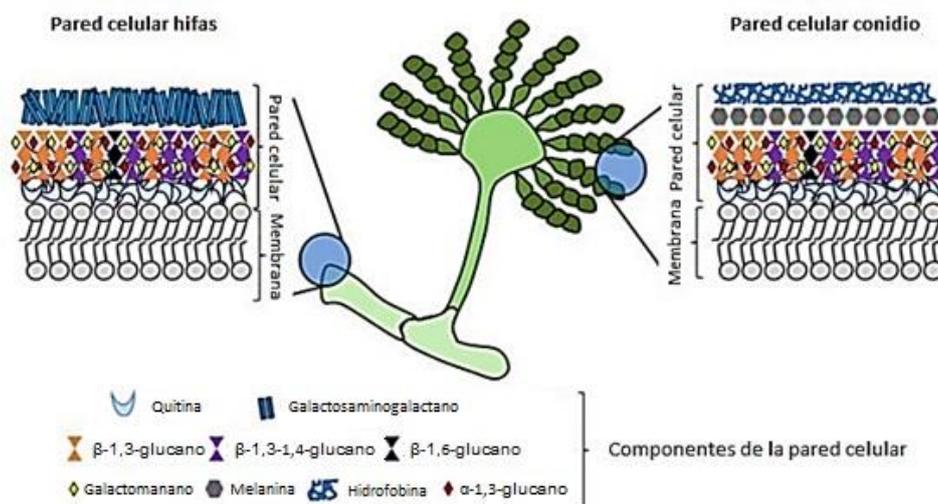


Figura 4. Composición pared celular de *Aspergillus fumigatus*.
(Figura modificada de García-Rubio y colaboradores¹⁶)

Los glucanos y polisacáridos presentes en la pared celular de *Aspergillus fumigatus* son los elementos responsables de la interacción del hongo con la célula del huésped (Tabla 1). Cada forma de expresión muestra patrones diferenciados que hacen que se promueva su entrada en la célula.

Tabla 1. Componentes de la pared celular de *Aspergillus fumigatus*.

Componente	Composición	Propiedad	Localización	Interacción con el huésped	Síntesis
β -1,3-glucano ¹⁵	Unidades de glucosa unidas mediante enlace β -1,3	Rigidez y permeabilidad	Superficie de conidios maduros	Dectina-1 y M-Ficolina	Complejo glucano sintasa: Fks1, glicosiltransferasa y proteína Rho
α -glucano ¹⁵	Unidades de glucosa unidas mediante enlace α -1,3	Estabilidad pared celular	Pared celular interna de hifas	No identificado	Complejo glucano sintasa Ags1, Ags2 y Ags3
GM ¹⁷⁻¹⁹	Unidades de β -D-manopiranosas unidas mediante enlace 1,4 con ramificaciones laterales de galactofuranosa unidas por enlace 1,6	Permeabilidad y resistencia frente a agentes nocivos	Pared celular de conidios e hifas	DC-SIGN y Dectina-2	UDP-galactosa mutasa, β -galactofuranosiltransferasas y α -1,2-manosiltransferasas
Quitina ¹⁵	Unidades de N-acetilglucosamina unidas mediante enlaces β -1,4	Integridad celular	Pared celular interna	M-Ficolina y receptor Toll 2	Enzimas quitina sintasas (CHS)
GAG ^{15,20}	Unidades de galactosa unidas mediante enlace α -1,4, N-acetilgalactosamina y galactosamina	Adhesina e inhibición de apoptosis	Pared celular y matriz extracelular de hifas	Neutrófilos, macrófagos y plaquetas	Enzima glucosa-4 epimerasa Uge3
Glicoproteínas ¹⁶	Proteínas asociadas a carbohidratos por enlaces O u N	Protección frente a sustancias nocivas, absorción de moléculas, adhesión al huésped y organización de la pared celular	Pared celular de conidios e hifas	PRR	Glicosiltransferasas
Melanina ^{16,18,19}	Pigmento de alto peso molecular con carga negativa, hidrofóbico e insoluble	Protección frente a daños ambientales e inhibición de apoptosis	Pared celular de conidios	Macrófagos	Dos vías: a partir de 1,8-dihidroxinaftaleno (DHN) y a partir de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa)

4. MECANISMOS DE ENTRADA Y HERRAMIENTAS DE DEFENSA DEL HOSPEDADOR.

La forma más común de infección es a través de la inhalación de conidios. Habitualmente todo ser humano está expuesto a este tipo de hongo en su vida diaria. Se estima que cada individuo puede inhalar varios cientos de conidios al día debido a la inhalación de 10.000-15.000 litros de aire¹⁴. La mayoría de los individuos pueden hacer frente a ellos sin problema gracias a la actividad pulsátil de los cilios de las células epiteliales de la mucosa. Las células epiteliales respiratorias y las secreciones de la mucosa constituyen la barrera anatómica. Normalmente gracias a estas estructuras y secreciones y a la correcta funcionalidad de los macrófagos alveolares, se consiguen eliminar estas formas impidiendo que maduren, se hinchen, y pasen a elongarse formando hifas. Esto no ocurre en personas inmunocomprometidas, personas con neutropenia severa, aquellas con tratamiento prolongado de corticoides o inmunosupresores y trasplantados. Con menor frecuencia, también sufren la enfermedad invasiva pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y con enfermedad granulomatosa crónica.

Como ya se ha comentado, normalmente los conidios se recubren de unas proteínas denominadas hidrofina, siendo la más conocida RodA. Esta puede pasar desapercibida para el sistema inmune innato manteniendo ocultos los PAMPs¹⁵. En los casos en los conidios prosperan, maduran y se hinchan, y liberan esas proteínas de superficie que servirán de reconocimiento para el huésped.

Debido al pequeño tamaño de los conidios (2-3 μm) muchos pueden evadir el mecanismo de defensa ciliar de las vías respiratorias y penetrar en el espacio broncoalveolar. En este caso, una vez que los conidios entran en contacto con los macrófagos alveolares, estos desencadenan una respuesta proinflamatoria y son responsables del reclutamiento de neutrófilos a la zona donde se localiza la infección. La interacción del patógeno con el hospedador se lleva a cabo entre los PAMPs y los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Los PAMP consisten en α y β -glucanos, mananos, lipopolisacáridos, proteínas asociadas a peptidoglucanos y fosfolipomano; en cuanto a PRR destacan los receptores tipo Toll (TLR), lectina tipo C (CLR) y tipo NOD (NLR)²¹. Estos receptores que se encuentran principalmente en macrófagos, células dendríticas y neutrófilos serán los responsables de iniciar y desencadenar la respuesta innata del huésped.

Entre los receptores tipo Toll o TLR se encuentra TLR 2, localizado en macrófagos y células dendríticas, que es capaz de unirse a la quitina que forma parte de la pared celular del hongo. Por otro lado, TLR4 parece que tiene un papel importante por su unión a GM. Estos hacen que se active la molécula MyD88. Esta desencadena la producción de citoquinas inflamatorias como interferón de tipo I (IFN), IL-12, factor necrosante de tumores alfa (TNF- α), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) e IL-10, dando lugar a la activación de las células Th1 y T reguladoras^{22(p88)}. TLR-9 es otro receptor presente en células dendríticas mieloides y plasmacitoides y se encarga de reconocer el ADN fúngico. Cuando esto ocurre tiene lugar la producción de IFN de tipo I e IL-12. Destacar que el TNF- α aumenta la actividad fagocítica de los macrófagos alveolares y la capacidad de los neutrófilos para hacer frente a las hifas generadas.

Entre los receptores de lectina tipo C o CLR se encuentran dectina 1 y dectina 2. Dectina 1 se expresa en macrófagos y neutrófilos y reconoce fracciones de β -glucano de conidios que se encuentran en proceso de maduración. También es capaz de activar el receptor NLR3 dando lugar a especies reactivas de oxígeno (ROS) e IL-1 β logrando así la diferenciación de las células Th17. La expresión de dectina 2 tiene lugar en macrófagos y células dendríticas y permite la unión de estos a α -mananos. Los receptores CLR inducen la activación de NF- κ B a través de la cascada de señalización compuesta por CARD9-BCL1-MALT1²² produciendo la citoquina inflamatoria IL-12. Esta citoquina fomentará la diferenciación de células Th1 y, por otro lado, la producción de IL-6, IL-1 β e IL-23 que atraen a las células Th17.

Los macrófagos alveolares, neutrófilos y el sistema del complemento son los principales y primeros eslabones de la inmunidad innata que harán frente al patógeno fúngico.

Cuando las esporas entran en contacto con los receptores TLR se desencadena la producción de citoquinas. Esto hace que se activen macrófagos y neutrófilos. Los monocitos fomentan la fagocitosis y la producción de citoquinas y quimioquinas facilitando también el reclutamiento de neutrófilos. Los neutrófilos liberan productos como son las trampas extracelulares (NET) y ROS que actúan directamente en la eliminación del elemento fúngico. Las células dendríticas ingieren y eliminan conidios y, tras madurar, se dirigen a los ganglios linfáticos. Allí es donde presentan los péptidos fúngicos a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y, mediante las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, a las células T. Las células CD4 promueven la diferenciación celular de las células Th17 las cuales tienen un papel muy importante actuando también en la activación de neutrófilos (Figura 5).

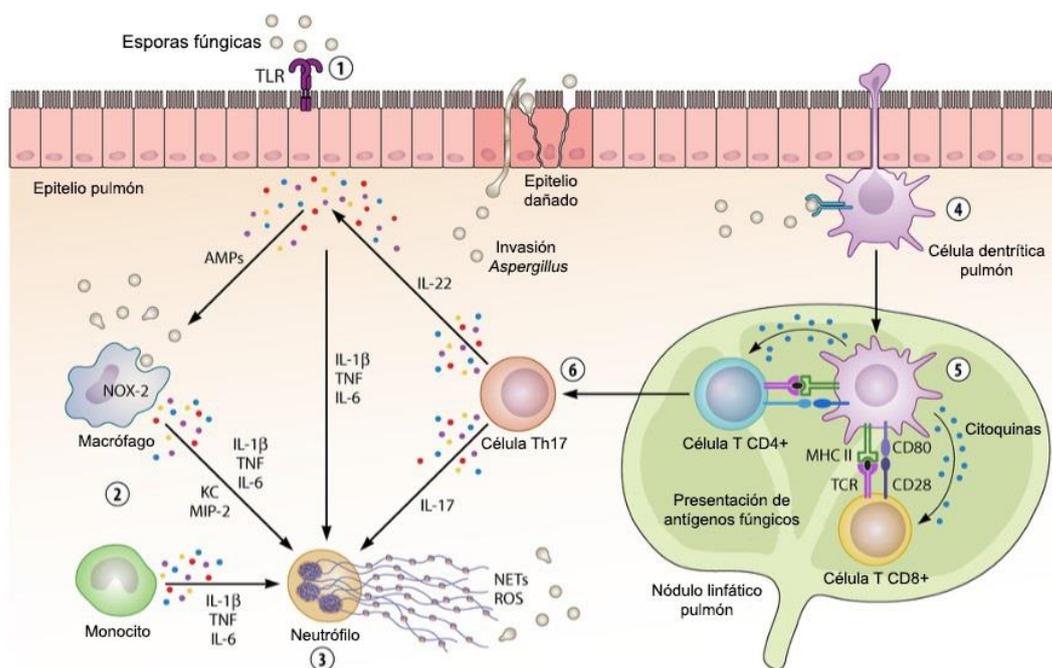


Figura 5. Mecanismos celulares contra la infección fúngica (Figura modificada de Salazar y colaboradores²³)

4.1. INMUNIDAD INNATA.

Los **macrófagos alveolares** son células del sistema inmunitario que se localizan en los alveolos pulmonares y que proceden de monocitos. Se denominan células presentadoras de antígeno (APC). Una vez que entran en contacto con los conidios, se generan ROS, como O_2^- y H_2O_2 , e impulsan la generación de citoquinas y quimioquinas. Estos productos harán que otras células del sistema inmunitario acudan al sitio de infección. Los conidios pasarán a estar dentro de un fagosoma que madura como consecuencia de su fusión con lisosomas, dando lugar al fagosoma secundario o fagolisosoma. A continuación, tendrá lugar la acidificación del fagolisosoma y un conjunto de enzimas hidrolíticas comenzaran a degradar la pared celular. Los macrófagos se pueden diferenciar en M1 y M2, clásicos y alternativos, respectivamente. Los primeros intervienen en la respuesta inflamatoria y se originan gracias a la actuación del interferón-gamma ($IFN-\gamma$), del $TNF-\alpha$ o de algún elemento microbiano como lipopolisacáridos (LPS). Se encargan de producir citoquinas y componentes proinflamatorios. Los segundos, se encargan de los procesos de reparación de tejidos y dan lugar a citoquinas como la IL-10 y el $TGF-\beta$. Toda esta compleja respuesta generada por los macrófagos alveolares dará como resultado un reclutamiento de neutrófilos al sitio de la infección.

Los **neutrófilos o polimorfonucleares** (PMNs) son leucocitos que presentan un núcleo lobular y gránulos en su citoplasma. Los gránulos contienen péptidos y enzimas proteolíticas y antimicrobianas que serán las que se encarguen de hacer frente a bacterias y hongos. Las herramientas empleadas por parte de los neutrófilos son la fagocitosis, la presencia de NADPH oxidasa y la liberación de lactoferrina y proteasas antimicrobianas. Otro recurso de este tipo celular es la formación de NET, consiste en una especie de red compuesta por cromatina nuclear y proteínas antimicrobianas. Estas formaciones son especialmente útiles para aquellas estructuras que no son capaces de ser fagocitadas por su gran tamaño como pueden ser las hifas de *Aspergillus fumigatus*. Uno de los elementos secretados por el hongo a la matriz extracelular es el heteropolisacárido GAG. A este se le asocian fenómenos de apoptosis de neutrófilos²⁰. Los péptidos antimicrobianos liberados serán capaces de acabar con conidios e hifas y las quimioquinas darán lugar al fenómeno de quimiotaxis.

El trastorno conocido como neutropenia es un conocido factor de riesgo para el desarrollo de candidiasis y AI. En estos pacientes con bajo recuento de neutrófilos entran en escena las **células asesinas naturales** (NK). Las células NK pertenecen al grupo de los linfocitos, proceden de la médula ósea y se encuentran en sangre y tejidos linfáticos, se encargan de la producción de citoquinas y presentan actividad citotóxica. Se ha demostrado experimentalmente que son capaces de dañar las hifas de *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*. Estas vuelven a actuar sobre conidios en germinación y no sobre los que están en reposo. Sus herramientas de ataque destacadas son la liberación de perforinas e $IFN-\gamma$ haciendo que los conidios no pasen a hifas^{24,25}.

Otro tipo celular que forma parte de la inmunidad innata son las **células dendríticas**²⁶. Son capaces de fagocitar patógenos, aunque su principal función consiste en servir de enlace entre la inmunidad innata y la adquirida ya que son APC. A través del MHC presentan los determinantes antigénicos a las células T, promoviendo su activación por la interacción entre las proteínas de membrana CD80 y

CD86 y la molécula linfocitaria CD28. Derivan de la médula ósea y pueden encontrarse en regiones superficiales y también en mucosas interiores. Su estructura es muy característica, presentan prolongaciones citoplasmáticas que garantizan disponer de una mayor superficie de contacto. También son capaces de secretar citoquinas proinflamatorias como TNF- α , en respuesta a conidios e hifas, e IL-12 e IL-4/IL-10 en presencia de conidios. El complejo DC-SIGN se encuentra presente en células T además de en macrófagos y se caracteriza por reconocer fracciones de manosa. Esto lleva a la activación de la vía NF-KB produciendo IL-6 e IL-10. También constituye un elemento de adhesión que se une específicamente con los GM presentes en la pared celular de *A. fumigatus*¹⁶.

Por otro lado, perteneciente a la inmunidad innata, está el **sistema del complemento**. *Aspergillus fumigatus* es capaz de producir la activación de las 3 vías del sistema del complemento (Figura 6). La iniciación dependerá de la forma morfológica del hongo. Cuando los conidios se encuentran en reposo, tiene lugar la activación de la vía alternativa y también la quimiotaxis de neutrófilos a la zona de infección. La vía alternativa es la que ocurre en primer lugar, ya que no requiere de la presencia de formación de inmunocomplejos. El componente C3 sufre hidrólisis dando lugar a C3i. El componente resultante de la unión de C3i y el factor B es una convertasa de C3, que se escinde en C3a y C3b. Una vez que C3b queda libre se le une el factor B que, junto con la actividad del factor D, dan lugar al complejo activo denominado C3bBb. El complejo C3bBb junto con otro elemento C3b dará lugar al complejo C5-convertasa o C3bBb3b.

Una vez que las esporas maduran y tiene lugar la formación de inmunocomplejos, se inicia la activación de la vía clásica²⁷. El elemento C1, se une al complejo Ag-Ac, este elemento se compone de una unidad denominada C1q, dos denominadas C1r y otras dos, C1s. C1q se une al fragmento Fc de los anticuerpos cuando estos se encuentran unidos a los antígenos. C1q también puede interactuar con PTX3, esta es una opsonina cuya actividad depende de C3. C1s presenta actividad serín-esterasa, y provoca la catálisis de C4 dando lugar a C4a y C4b. Este último intermediario es inestable. Algunas moléculas forman iC4b y otras mediante enlaces covalentes, se unirán a la superficie del organismo patógeno. A esta región de unión se acoplará C2 formando el complejo C4bC2. Este complejo es una C3-convertasa, que mediante catálisis convierte C3 en C3a y C3b. C3b es el que se unirá a la membrana del organismo. La unión covalente de C3b al complejo activo C4bC2 dará lugar a la C5-convertasa o C4b2a3b.

Los complejos C5-convertasas, derivados de la vía alternativa y clásica, producen la catálisis de C5 produciendo C5a y C5b. C5a tiene un efecto quimioatrayente de neutrófilos y C5b se une a la membrana del patógeno favoreciendo también la unión de C6 y C7. Esto da lugar al complejo C5b67. Una vez que C7 penetra en la membrana, se acoplan C8 y C9. El elemento C9 está compuesto por un canal de 14 unidades que atravesará la membrana. Todo ello formará el denominado complejo de ataque a la membrana o MAC produciendo la lisis del patógeno.

La vía de las lectinas se activa gracias a proteínas de unión a mananos (MBP) como son las CLR y M-ficolina. Estas son calcio dependientes y se unen a los carbohidratos localizados en la pared del hongo. Esta proteína, que es la homóloga de la proteína C1 de la vía clásica, se puede unir con 2 unidades de C1r y 2 de C1s pero lleva incorporada su propia serín-proteasa denominada MASP²⁸. Cuando es activada actúa directamente sobre C2 y C4 dando lugar a la C3-convertasa de la vía clásica.

A partir de ese momento, la vía seguirá los pasos que han sido descritos anteriormente en la vía clásica cuyo objetivo final será la formación de C5-convertasa la cual promueve el acoplamiento del MAC.

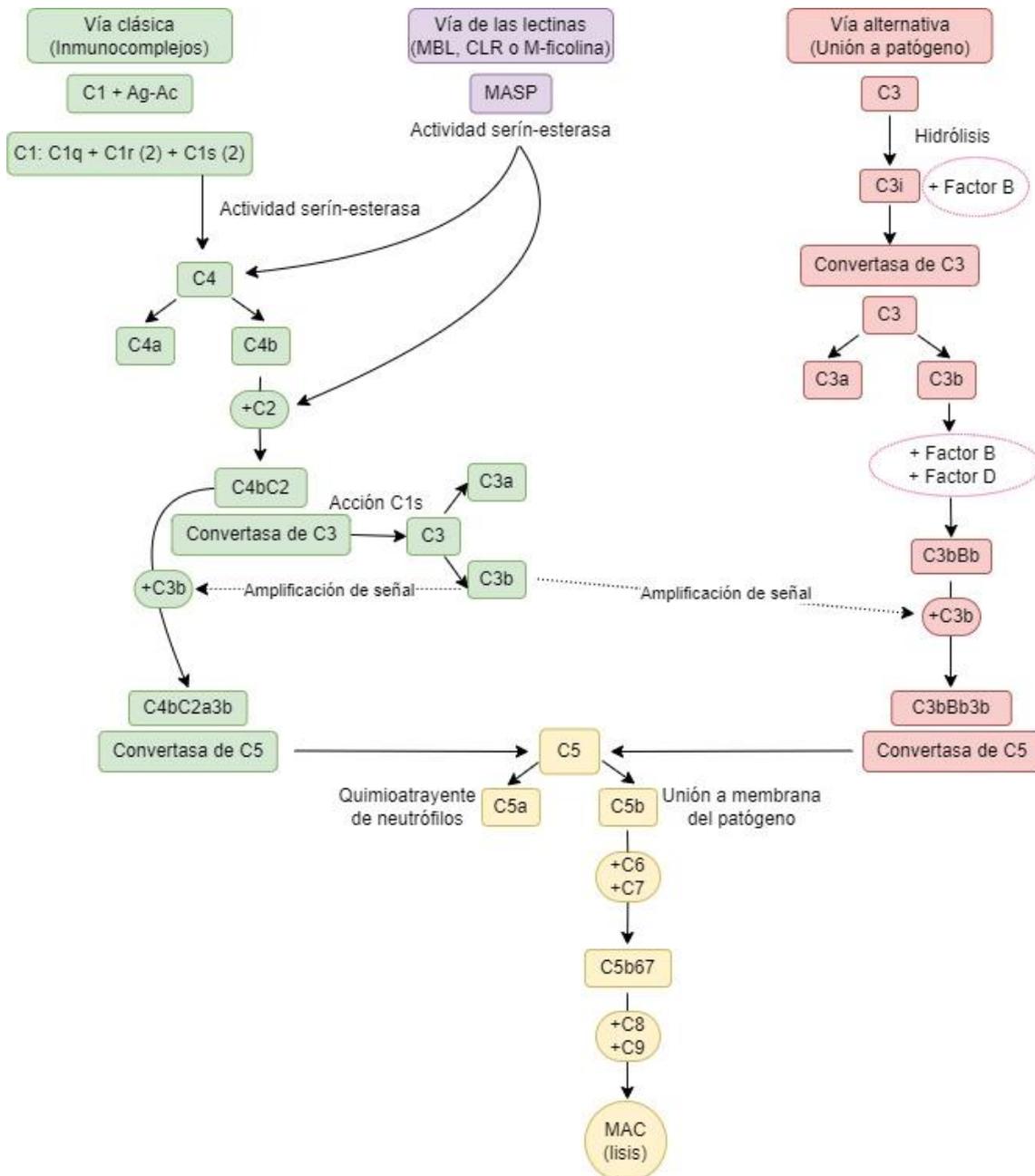


Figura 6. Esquema de las 3 vías del sistema del complemento.

Se conocen varias estrategias diseñadas por *Aspergillus fumigatus* para evadir la acción del sistema del complemento. Una proteína alcalina secretada por el hongo, Alp1p, es capaz de degradar los principales componentes del sistema como son C3, C4 y C5. Esta proteína es secretada cuando el hongo presenta forma de hifa. En cuanto a las formas conidiales, la proteasa denominada metaloproteasa o Mep1p pone en marcha un mecanismo proteolítico contra las proteínas C3, C4 y C5 y sobre las moléculas de reconocimiento de patrones²⁹. El pigmento fúngico 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN) melanina impide la unión de C3b a la superficie del hongo lo que lo aleja del ataque del complemento. Otro regulador que inhibe la opsonización y fagocitosis por parte del sistema inmune es el conocido como enolasa (AfEnol) o Asp22³⁰.

Las **plaquetas** presentan un papel importante en la inmunidad innata, actuando sobre las formas conidiales en germinación, impidiendo su maduración y frenando la elongación de las hifas. La activación de plaquetas es dependiente de contacto, aunque también son capaces de ejercer su función gracias a la estimulación a distancia mediada por GAG liberadas²⁰. Además de tener actividad fagocítica, modulan la respuesta inmune adaptativa liberando citoquinas proinflamatorias como IL-1 y reclutan otros tipos celulares como macrófagos y neutrófilos.

Otros elementos implicados en la inmunidad innata son los **péptidos antimicrobianos** (AMP), las **alarminas** y las **proteínas surfactantes** del fluido alveolar. Estos harán frente al organismo patógeno provocando la lisis de conidios e impidiendo la proliferación y maduración de las hifas. Entre los péptidos antimicrobianos más conocidos están las defensinas, LL-37, SLPI y lactoferrina. Las defensinas actúan sobre la membrana fúngica produciendo lisis. Existen α -defensinas que se sintetizan en el interior de los gránulos de neutrófilos y β -defensinas que están relacionadas con células epiteliales. Cuando *Aspergillus fumigatus* entra en contacto con las vías respiratorias se induce la producción de las β -defensinas. LL-37 es una catelicidina, se expresa en neutrófilos y en células epiteliales y tienen su diana en la pared celular del hongo causando liberación del material intracelular. Su papel predominante se da en la etapa temprana de proliferación. Otra proteína de gran relevancia es la SLPI, producida por macrófagos y neutrófilos, con actividad antifúngica contra *Aspergillus fumigatus*. Por último, la lactoferrina, producida por neutrófilos, captura el hierro circulante y produce la inhibición de la proliferación, induciendo la muerte de los conidios³¹. Las alarminas son proteínas que se liberan de las células de los tejidos dañados del huésped y que sirven como señal para que se desencadene la respuesta inflamatoria. En el fluido alveolar, las proteínas surfactantes A y D (SP-A y SP-D respectivamente) fomentan el proceso de quimiotaxis, fagocitosis y lisis de naturaleza oxidativa³².

Los patógenos presentan una serie de mecanismos con los que intentan evadir la protección del sistema inmune. Entre ellos destaca la capacidad de enmascarar los PAMP, la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma, la producción de antioxidantes y metabolitos secundarios y la fabricación de melanina. En el caso de *Aspergillus fumigatus*, la gliotoxina y la fumagillina son dos toxinas que actúan inhibiendo la actividad desarrollada por los neutrófilos ya que bloquean el complejo NADPH oxidasa³².

4.2. INMUNIDAD ADQUIRIDA.

En cuanto a la inmunidad adquirida, existen dos tipos de respuesta, la inmunidad celular a través de células T e inmunidad humoral a través de las células B. La interacción entre huésped y hongo consiste en la unión de péptidos fúngicos y el MHC. Una vez ocurrido este fenómeno y una vez que las células dendríticas lo expresen en su superficie, estas serán las encargadas de presentar el antígeno a las células T. Las células T se clasifican en CD4 o colaboradoras y en CD8 o citotóxicas. Las CD4 son capaces de reconocer péptidos fúngicos asociados a MHC-II y las CD8 son capaces de reconocerlos asociados a moléculas MHC-I.

Las **células colaboradoras** se denominan también CD4 porque presentan esa molécula en su superficie. Esta es una glucoproteína monomérica. Una vez que tiene lugar la interacción con los péptidos antigénicos, tiene lugar la secreción de citoquinas y la diferenciación celular como Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 y T reguladoras.

A continuación, se pasa a describir brevemente el papel de cada tipo celular:

Th1: secreta citoquinas como IFN- γ , IL-2, IL-12 y TNF- α . IFN- γ posee un papel importante en la activación de macrófagos; IL-2 induce el crecimiento de subpoblaciones de linfocitos y activa la propagación de linfocitos B; IL-12 fomenta la citotoxicidad de las células CD8 y NK; TNF- α interviene en el proceso de inflamación y de necrosis y apoptosis.

Th2: secretan citoquinas antiinflamatorias como IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β y IL-13. IL-4 promueve la diferenciación de linfocitos Th2, la diferenciación de linfocitos B e inhibe la apoptosis; IL-5 fomenta el crecimiento de linfocitos B y la secreción de inmunoglobulinas; IL-10 inhibe la síntesis de citoquinas proinflamatorias por parte de las células T y los macrófagos; TGF- β interviene en el crecimiento, proliferación y diferenciación celular y en el proceso de apoptosis; IL-13 estimula y regula el funcionamiento de los monocitos y las células B.

Th17: secreta IL-17 e IL-22. La primera se encarga de reclutar los neutrófilos al lugar de infección y la segunda tiene efecto en la supervivencia y proliferación celular y secreción de agentes antimicrobianos.

T reguladoras (Tregs): se encargan de regular las funciones de las células Th y tienen un importante papel en la prevención de enfermedades autoinmunes. Se pueden distinguir células nTreg que son aquellas que se han originado por una circunstancia natural o iTreg que se inducen por la presencia de una infección^{23,33}.

Th9: tienen lugar gracias a IL-10 y TGF- β . Se encargan de la producción de IL-9 e inducen a las células Th2. Están relacionadas con la protección frente a patógenos fúngicos⁴.

Th22: producen IL-22 la cual juega un papel importante en las infecciones fúngicas mucocutáneas⁴.

Las **células citotóxicas**, denominadas también CD8, se encargan de la liberación de moléculas citotóxicas que darán lugar a la lisis de células propias infectadas y al ataque directo de los elementos patógenos. Estas células presentan tres vías para hacer frente a los componentes nocivos. La primera

consiste en la secreción de citoquinas; la segunda, se basa en la producción y liberación de gránulos citotóxicos que actúan de forma similar al complejo de ataque a la membrana del complemento; y, por último, dan lugar al fenómeno de apoptosis mediante la interacción del receptor FasL presente en estas células con el receptor Fas que se expresa en la superficie de las células diana³⁴. Son capaces de diferenciarse en Tc1, Tc2 y Tc3 gracias a la actuación de IL-12, IL-4 e IL-23, respectivamente. Las primeras secretan IFN- γ , las segundas IL-4 e IL-10 y las terceras, IL-17. Estudios recientes muestran que el subtipo Tc3 podría diferenciarse en células Tc17 y que estas tendrían la capacidad de aportar memoria antifúngica.

Por otro lado, se encuentra la denominada inmunidad humoral, esta se basa en la activación de las **células B** con la colaboración de los linfocitos T provocando la expansión y diferenciación celular. Las células B se diferencian a células plasmáticas que darán lugar a la liberación de anticuerpos. Los anticuerpos son moléculas encargadas de hacer frente a los componentes antigénicos extracelulares. Otras de ellas se diferenciarán en células memoria que estarán involucradas en infecciones secundarias. Los anticuerpos neutralizarán dichos componentes e impedirán que puedan pasar al interior celular. Son capaces de desencadenar el proceso de opsonización, activar el complemento y favorecer el fenómeno de la fagocitosis. Además inhiben el crecimiento fúngico, la formación de biopelículas y previenen daños en tejidos afectados por la infección^{35,36}. El análisis de este tipo de inmunidad es reducido en cuanto a diagnóstico de micosis invasivas ya que el éxito de estas está relacionado con el desorden ocasionado sobre la inmunidad celular y no en el déficit de inmunidad humoral. Las personas inmunocompetentes pueden desarrollar diversas patologías aspergiliares como pueden ser la aspergilosis pulmonar crónica (CPA), aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) y alveolitis alérgica extrínseca. Las cavidades en el parénquima pulmonar ocasionadas por enfermedades previas pueden servir como soporte para la colonización por parte de los hongos. El examen radiológico, importante en la detección del aspergiloma como manifestación no alérgica, no proporciona imágenes específicas por lo que se recurre al estudio serológico donde se detectan, con mayor frecuencia, anticuerpos de las clases IgG e IgE específicos contra *Aspergillus*. La prueba de las precipitinas proporciona resultados positivos cuando se ha estado en contacto con el hongo, pero no son indicadores de infección activa. En estos casos se recomienda el uso de inmunoensayos enzimáticos para la detección de anticuerpos³⁷⁻³⁹.

5. EL GALACTOMANANO EN LA PARED DE *ASPERGILLUS FUMIGATUS* Y DE OTRAS ESPECIES.

El GM fue identificado en 1970 como una molécula libre circulante que se encontraba en fluidos biológicos de pacientes inmunodeprimidos que padecían infección por *Aspergillus*. En 1994, Latgé y colaboradores aislaron GM soluble en un cultivo de *Aspergillus fumigatus* con un peso molecular de 20 kDa⁴⁰.

El GM está compuesto por un esqueleto de unidades de β -D-manopiranosas unidas por enlace 1-4 con ramificaciones laterales de galactofuranosa unidas por enlace 1-6 (Figura 7). El tamaño de la

molécula depende del contenido de galactofuranosa y el tamaño de las cadenas de la misma depende a su vez de las condiciones de crecimiento del hongo. La cadena lateral de galactofuranosa es la que lo dota de un carácter inmunogénico⁴¹.

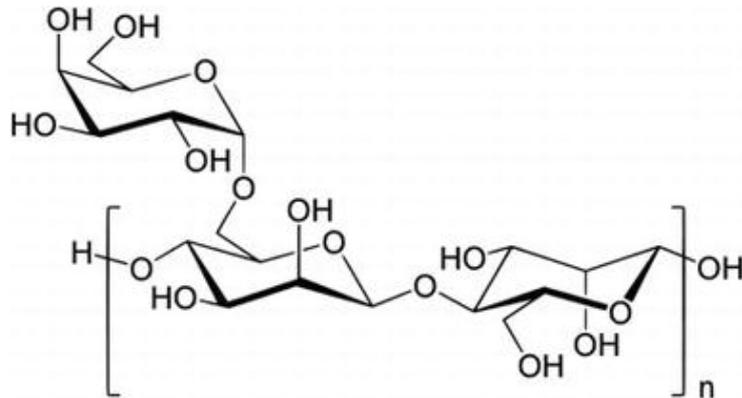


Figura 7. Estructura del galactomanano⁴².

Sus funciones principales se basan en el control de la permeabilidad y proporcionan resistencia a la pared frente a agentes nocivos.

El GM se puede encontrar en tres formas, unido covalentemente a β -1,3-glucano; unido a la membrana plasmática celular a través de un glicosilfosfatidilinositol (GPI) dando lugar a la estructura denominada lipo-GM; o liberado en el medio como un polímero libre⁴¹ (Figura 8).

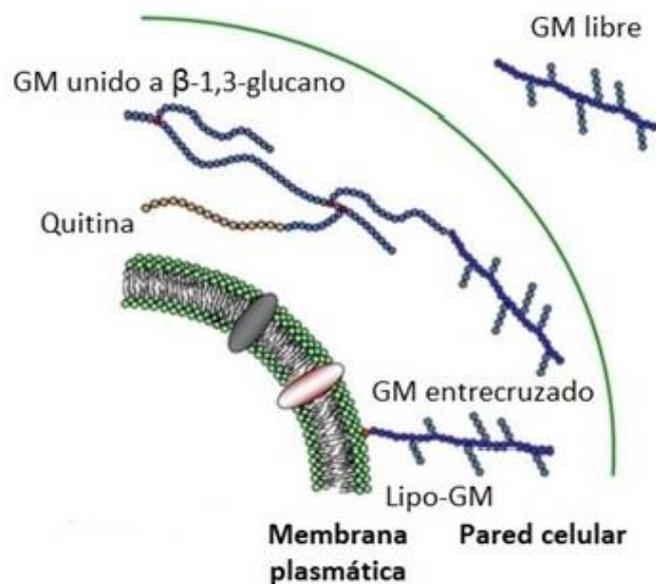


Figura 8. Formas de presentación del galactomanano.
(Figura modificada de Fontaine y Latgé⁴¹)

Los otros 2 grandes representantes en la pared celular de *A. fumigatus*, el β -1,3-glucano y la quitina, estos son sintetizados en la membrana plasmática. El GM, en cambio, se sintetiza intracelularmente por lo que se requiere de la ayuda del aparato de Golgi y de transportadores que harán que este pase a la membrana plasmática y pared celular. En el citosol celular se lleva a cabo la transformación de UDP-Galp (UDP-galactopiranososa) a UDP-Galf (UDP-galactofuranosa) gracias a la acción de Ugm1 (UDP-galactosa mutasa). Una vez realizada la síntesis en el citosol de UDP-Galp y GDP-Man, tiene lugar su transporte al lumen del aparato de Golgi mediante los transportadores GfIB y GmtA, respectivamente. Una vez ahí, se lleva a cabo la polimerización del esqueleto de manano y adición de la cadena lateral de galactofuranosa gracias al trabajo de GfsA, GfsB y GfsC (β -galactofuranosiltransferasas) y Ktr4 y Ktr7 (α -1,2-manosiltransferasas). Creado el esqueleto se produce el transporte y la fijación en la membrana plasmática de la estructura denominada lipo-GM. Para dar lugar a la segunda modalidad citada anteriormente, tiene lugar la unión de la misma a β -1,3-glucanos en la pared celular. La proteína Dfg (“defective in filamentous growth”) desempeña un papel importante en la unión de forma covalente de ambas estructuras⁴³. Para que el heteropolímero se encuentre libre en el medio se requiere de la actividad enzimática de fosfolipasas o glicohidrolasas que eliminarán el enlace haciendo que sea liberado (Figura 9).

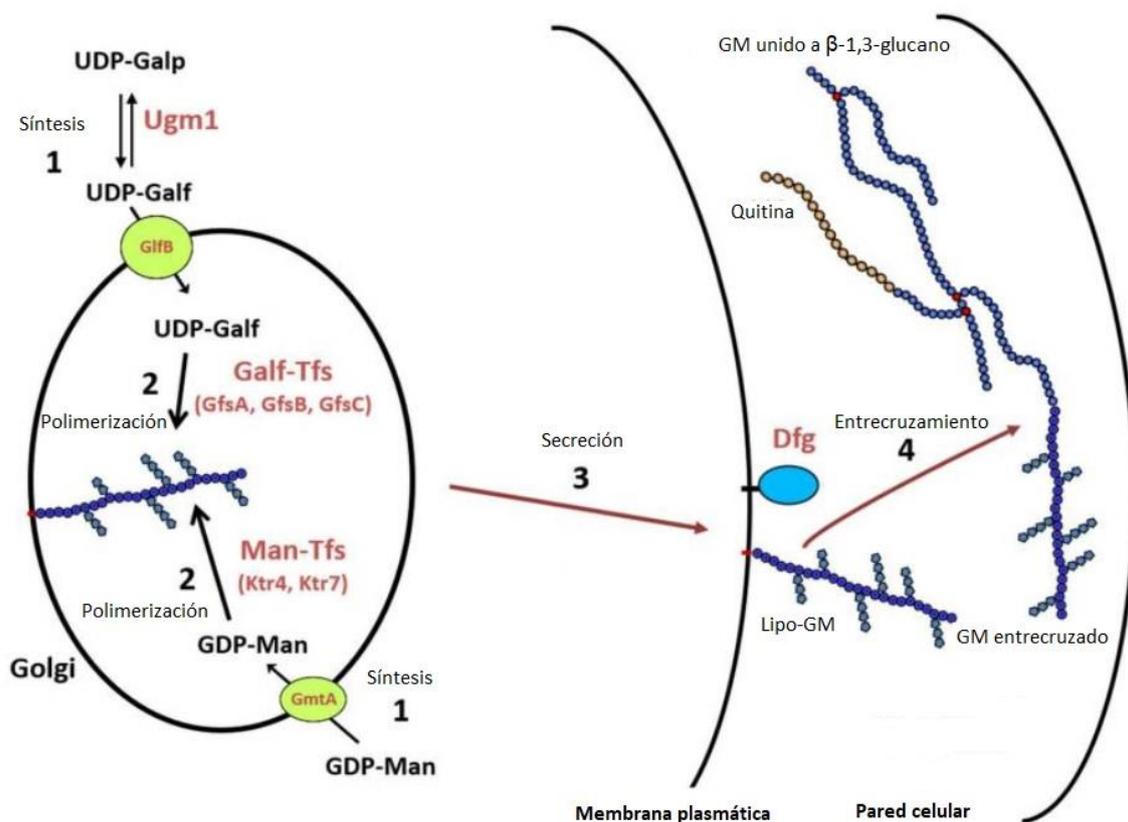


Figura 9. Síntesis de galactomanano en *Aspergillus fumigatus*.
(Figura modificada de Fontaine y Latgé⁴¹)

La galactofuranosa, elemento inmunoreactivo del esqueleto, está compuesta por un anillo pentagonal galactosa y está presente en muchos patógenos. En *Mycobacterium*, un organismo procariota, constituye un componente principal de su pared celular; otros géneros de hongos también presentan GM en su pared como es el caso de especies del género *Penicillium*, *Histoplasma* y *Cryptococcus*⁴⁴. El género *Fusarium* presenta residuos de galactofuranósido enlazados 1-2 o 1-6 con algunas ramificaciones en C-2 o C-6 y también es capaz de producir galactofuranosa aunque en menor medida que *Aspergillus*.

Latgé y colaboradores, en un trabajo publicado en 1992⁴⁵, detallan la obtención de anticuerpos monoclonales (mABs) producidos en rata con reactividad frente a antígeno de galactomanano de la especie *Aspergillus fumigatus*. Con uno de ellos, el denominado EB-A2, observan reactividad frente a elementos extracelulares e intracelulares y a componentes de la pared celular. Las cadenas de galactofuranosa son la diana de dichos anticuerpos. Mediante un ensayo de inhibición a través de la técnica ELISA, fueron capaces de detectar antígeno circulante presente en muestras de suero en pacientes con aspergilosis invasiva. El mAB EB-A2 será el empleado, años más tarde, en el kit de ELISA de Bio-Rad.

6. FACTORES DE RIESGO.

El hongo *Aspergillus* se encuentra en la naturaleza y la inhalación de sus esporas es algo que ocurre con frecuencia. Esto, que pasa desapercibido en personas sanas, puede ocasionar tasas de mortalidad superiores al 50% en pacientes neutropénicos o con estado inmunodeprimido de base. En los últimos años se está viendo en aumento la AI en otro tipo de pacientes con menor grado de inmunodepresión.

A continuación, se pasan a detallar las patologías de los grupos de población considerados como factores de riesgo:

- Neutropenia prolongada.

Consiste en una enfermedad hematológica caracterizada por la disminución de leucocitos polimorfonucleares por debajo de los niveles normales establecidos (neutrófilos $<100/m^3$) durante más de 14 días. No disponer de una cantidad óptima de neutrófilos hace que estos pacientes sean un importante grupo de riesgo en el desarrollo de AI. Como causantes de neutropenia se encuentran factores relacionados con el cáncer y con el tratamiento del mismo. Se ha destacado el aumento de sensibilidad en detección de GM en muestra de suero en estos pacientes con respecto a pacientes no neutropénicos ya que estas células son capaces de unirse al GM a través de sus receptores de manosa eliminándolo o neutralizándolo en cierto modo del torrente sanguíneo⁴⁶⁻⁴⁸.

- Tratamiento prolongado con corticosteroides.

La aplicación de corticosteroides se basa en la supresión de la inflamación y afectan negativamente a la inmunidad innata y adaptativa deprimiendo la función de neutrófilos y macrófagos e inhibiendo la producción de ROS que son los que hacen frente a la destrucción de hifas^{32,49}. Se considera uso prolongado una dosis >0,3 mg/kg/día durante más de tres semanas⁵⁰.

- Enfermedad granulomatosa crónica (CGD).

Es una inmunodeficiencia primaria rara que se caracteriza por una alteración en la producción de intermediarios oxidativos por los fagocitos haciendo que patógenos como *Aspergillus fumigatus* produzcan elevadas tasas de infección invasiva. La afección es provocada por la deficiencia en los genes responsables de las unidades que forman parte del complejo NADPH⁵¹.

- Fibrosis quística.

Enfermedad hereditaria caracterizada por la producción excesiva de moco espeso en pulmones y tracto digestivo. Esta presenta alto riesgo de colonización por parte de *Aspergillus* dando lugar a distintas formas de presentación como AI, CPA y ABPA⁵².

- Infecciones víricas: Influenza y SARS-CoV-2.

Las infecciones víricas provocadas por el virus de la influenza y recientemente por SARS-CoV-2 están asociadas con el desarrollo de aspergilosis pulmonar invasiva como complicación secundaria.

El daño estructural y funcional que sufre el aparato respiratorio, el desequilibrio ocasionado en la respuesta inmunitaria, las enfermedades o estado de base del paciente y el tratamiento aplicado para combatir la infección vírica son algunos de los factores principales que pueden traer consigo el aumento de la susceptibilidad de infección por *Aspergillus*.

El método de diagnóstico “gold standard” sigue siendo el análisis histopatológico, aunque en pacientes críticos rara vez se realiza. Esto hace necesaria la inclusión de otros métodos como el cultivo de muestras LBA y esputo, y la detección de GM en muestras de suero y LBA.

La enfermedad infecciosa causada por influenza virus A o influenza virus B aumenta el riesgo de padecer AI en pacientes ingresados en UCI. El virus tiene como diana el revestimiento epitelial del tracto respiratorio facilitando así la entrada y colonización por parte de *Aspergillus*⁴⁹. La incidencia es mayor para grupos de pacientes inmunodeprimidos que no inmunodeprimidos. Los pacientes ingresados en UCI con infección por Influenza presentaron AI en el 19% de los casos⁵³. El tratamiento con inhibidores de neuraminidasa aumenta la probabilidad de aparición de una coinfección. Al desarrollo de aspergilosis pulmonar asociada a Influenza se la denomina IAPA.

Desde la aparición del síndrome respiratorio agudo severo provocado por la infección viral de SARS-CoV-2, se han encontrado cada vez con mayor frecuencia casos de pacientes ingresados en UCI sin ningún cuadro de inmunodepresión que desarrollan AI como complicación secundaria⁵⁴. Esto puede explicarse por la anulación de la defensa innata del huésped debido a la infección viral y por el tratamiento que se aplica como son corticoesteroides, antibióticos de amplio espectro y agentes

inmunomoduladores. El tratamiento combinado de corticoesteroides y Tocilizumab en pacientes con ventilación artificial hace que estos sean más susceptibles. Tocilizumab hace que se disminuya la capacidad de hacer frente a infecciones causadas por hongos, virus y bacterias. Este es un mAb que bloquea el proceso inflamatorio desencadenado por la IL-6, la cual presenta un papel muy importante en el reclutamiento de neutrófilos⁵⁵. Al desarrollo de aspergilosis pulmonar asociada a COVID-19 se la denomina CAPA⁵⁶.

Se conoce como inmunidad heteróloga aquella respuesta inmunitaria que se presenta frente a un patógeno y que puede afectar a la respuesta frente a un patógeno secundario distinto. Tras una de estas infecciones víricas, el epitelio respiratorio y el citoesqueleto se encuentran dañados. Esto hace que las células epiteliales del tracto presenten unos receptores específicos que facilitan la adhesión fúngica. Los casos graves se asocian con una sobreproducción de IFN. Esto se asocia a un mayor daño tisular y aumento en la susceptibilidad de infecciones secundarias²³. Además, hace que se reduzca la proliferación y diferenciación celular, así como el reclutamiento de células destinadas a la inmunidad.

No existen actualmente criterios establecidos para la definición de IAPA y CAPA en pacientes sin comorbilidades inmunosupresoras, aunque numerosos autores han desarrollado un algoritmo denominado AspICU. Este incluye como criterio la obtención de una muestra respiratoria positiva por cultivo. Posteriormente, debido a la obtención de cultivos negativos en la mayoría de los casos, se actualiza dicha definición, denominado AspICU modificado, donde se sustituye el cultivo por la prueba de detección de GM en suero o LBA^{57,58}. En este caso, se incluyen pacientes con EPOC e infecciones víricas como la gripe. Para el caso de CAPA, se cuenta además con los requisitos establecidos en 2020 por la Confederación Europea de Micología Médica y Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal (ECMM/ISHAM) donde un paciente COVID-19 positivo requiere de al menos una lesión reportada mediante radiología, una característica clínica y un criterio micológico, siendo este último al que se le da mayor importancia ya que los signos y síntomas obtenidos con el resto son poco específicos y comunes en pacientes que solo presenten COVID-19. El criterio micológico se basa en pruebas de cultivo, PCR, detección de GM en suero y LBA y β -D-glucano⁵⁹.

Existe controversia acerca del tratamiento a aplicar en este tipo de coinfección y si es oportuno la profilaxis en aquellas poblaciones con mayor número de factores de riesgo. Recomiendan precaución en el tratamiento con antifúngicos, ya que pueden experimentarse efectos secundarios y tener lugar interacción con los fármacos aplicados para las infecciones respiratorias de base⁶⁰⁻⁶³.

a) Influenza

El virus de la Influenza es el responsable de la infección respiratoria aguda de 3 a 5 millones de personas en todo el mundo. En el 5-10% de los casos es necesario el ingreso en UCI y pueden darse entre 50.000 a 100.000 muertes anuales⁶⁰.

Desde hace años, se conocen coinfecciones bacterianas asociadas como complicación secundaria de este virus, causadas principalmente por *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. Últimamente se están reportando casos de AI, la cual puede estar relacionada con la administración de corticosteroides y de inhibidores de neuraminidasa. Por otro lado, en el sentido estructural, este virus provoca un gran daño en el epitelio y mucosa del tracto respiratorio e inhibe el aclaramiento

mucociliar. Y, por último, se produce un aumento en el reclutamiento de neutrófilos mediante la ruta STAT1, la disfunción de macrófagos alveolares, la sobreexpresión de IL-10 y la desregulación de células Th. Todo ello, aumentando la susceptibilidad de la infección por *Aspergillus*^{58,64}.

La incidencia de IAPA está en torno al 16-23% en Europa^{65,66} siendo del 14% en pacientes inmunocompetentes y del 31% en pacientes inmunocomprometidos^{57,67}. Esta puede ser variable según las zonas geográficas y centros, y está relacionada con los servicios de salud de los que se disponga. Diversos estudios la han asociado también con más frecuencia en pacientes con Influenza A (Tabla 2), subtipo H1N1^{58,67,68}, esto puede estar relacionado con el mayor número de ingresos en UCI con este subtipo debido a su gravedad. Además de la incidencia, la tasa de mortalidad asociada a esta coinfección es preocupante y está en torno al 40-50% en pacientes ingresados en UCI^{53,69}.

Estudios realizados sobre IAPA, con distinta distribución geográfica, distinto tamaño muestral y en distinto periodo de tiempo han sido recopilados en la revisión de Changchen Shi y colaboradores⁵⁸.

Tabla 2. Revisión incidencia aspergilosis pulmonar invasiva asociada a Influenza.

(R: estudio retrospectivo; P: estudio prospectivo; MO: estudio monocéntrico; MU: estudio multicéntrico; N: tamaño muestral; Flu A (%): porcentaje casos debidos a Influenza A; NR: no reportado)

(Tabla modificada de Changchen y colaboradores⁵⁸)

Estudio	Diseño	Periodo	País	N	Ingreso UCI (%)	Flu A (%)	Incidencia IAPA (%)	Mortalidad (%)
Bellelli, 2020	R, MO	2019	Italia	77	22,1	62,3	6,49	100
Chen, 2020	R, MU	2018	China	693	25,4	100	3,03	42,9
Coste, 2021	R, MU	2009–2018	Francia	524	100	78,4	1,91	30,0
Duan, 2021	R, MO	2018–2019	China	156	47,4	97,4	NR	52,8
Huang, 2020	R, MO	2017–2019	China	132	100	84,8	31,1	58,5
Ku, 2017	R, MO	2015–2016	Taiwán	124	100	70,2	16,9	66,7
Lin, 2021	R, MO	2017–2019	China	157	100	83,4	11,5	55,6
Martin-Loeches, 2017	P, MU	2009–2015	España	2901	100	100	1,21	NR
Nyga, 2020	R, MU	2010–2019	Francia	213	100	84,5	16,4	57,1
Schauwvlieghe, 2018	R, MU	2009–2016	Bélgica y Países Bajos	432	100	82,2	19,2	50,6
Schwartz, 2020	R, MO	2014–2019	Canadá	111	100	82,9	7,21	50
Vanderbeke, 2021	P, MU	2017–2020	Bélgica, Países Bajos y Francia	88	100	83,0	23,9	61,9
Waldeck, 2020	R, MU	2017–2018	Suiza	81	100	45,7	11,1	33,3
Zou, 2020	R, MU	2013–2018	China	335	67,2	100	5,37	22,2

La técnica de histología no se aplica debido al riesgo que conlleva en pacientes críticos. El cultivo es un método barato y fácil de realizar, aunque la sensibilidad puede estar en torno al 50%. La detección de IAPA mediante GM sérico o en LBA, aporta mejores resultados de sensibilidad y especificidad, siendo la primera mayor para muestras LBA⁷⁰. Se recomienda también el uso combinado mediante el análisis de suero y LBA del mismo paciente para mejorar así el rendimiento diagnóstico del test. La técnica de detección en LBA es útil, aunque en ese caso no se podrá detectar si existe colonización o invasión^{69,71}.

b) SARS-CoV-2

Desde el inicio de la pandemia en diciembre de 2019, han sido confirmados por la OMS un total de 762.790.388 casos globales (datos de abril de 2023), los cuales han ocasionado 6.897.012 muertes.

Es frecuente en la infección por SARS-CoV-2 el fenómeno de tormenta de citoquinas entre las que encontramos IL-10 e IL-6. La primera actúa en la regulación a la baja de macrófagos y la segunda aumenta la permeabilidad de los vasos y ocasiona el síndrome de dificultad respiratoria aguda. El tratamiento con Tocilizumab es común en pacientes graves de COVID-19 ya que reduce la respuesta inmunitaria mediada por la IL-6 haciendo que aumente la susceptibilidad a la infección por el hongo⁶¹. Relacionado también con el tratamiento de la infección vírica, se notifica predisposición a la infección fúngica tras la aplicación prolongada de corticoesteroides⁷², uso de antibióticos de amplio espectro y agentes inmunomoduladores⁵⁶.

La aspergilosis pulmonar invasiva asociada a SARS-CoV-2 no se rige por los factores de riesgo asociados comúnmente; en este caso, además de pacientes neutropénicos, uso de corticoesteroides y trasplante de órganos sólidos hay que sumar la edad, enfermedades respiratorias previas, el nivel de gravedad ocasionado por COVID-19 y el uso del inhibidor de IL-6, Tocilizumab⁶².

Debido a los nuevos factores de riesgo asociados se ha notificado la importancia del aumento de incidencia en pacientes que no presentan enfermedad inmunosupresora de base⁵⁴. En un estudio realizado a nivel nacional, se halló un aumento notable de casos CAPA en pacientes no hematológicos comparando el mes de abril de 2019 con el de 2020. Hubo un incremento de 1,7 puntos en pacientes no hematológicos frente a 0,3 puntos en pacientes hematológicos⁵⁶.

El diagnóstico de CAPA suele presentarse entre los 8-16 días tras el inicio de los síntomas de COVID-19. Mediante cultivo, la especie más común encontrada fue *Aspergillus fumigatus*⁵⁷. Los aspectos clínicos y radiológicos son inespecíficos pudiendo ser los mismos en pacientes con COVID-19 sin CAPA. Se recomienda también el empleo de la detección de GM en muestra de suero y LBA. Es posible que se obtenga resultado negativo en muestra de suero en pacientes no neutropénicos y en aquellos donde la infección esté localizada en las vías respiratorias.

Los episodios de CAPA, según la revisión de estudios detallados en la siguiente tabla, presentan un promedio de incidencia y mortalidad en 15,8% y 56%, respectivamente, y se notifica una asociación de coinfección en pacientes donde se ha empleado ventilación mecánica (Tabla 3).

Tabla 3.Revisión incidencia CAPA.

(R: estudio retrospectivo; P: estudio prospectivo; MO: estudio monocéntrico; MU: estudio multicéntrico; N: tamaño muestral; VM (%): ventilación mecánica, casos expresados en porcentaje)
(Tabla modificada de Salazar y colaboradores²³ y Chong y colaboradores⁵⁷)

Estudio	Diseño	Periodo	País	N	Incidencia CAPA (%)	Mortalidad (%)	VM (%)
Alanio, 2020	P, MO	Junio 2020	Italia	27	33,3	44,4	100
Bartoletti, 2020	P, MU	Julio 2020	Italia	108	27,7	44	100
Chauvet, 2020	R, MO	Noviembre 2020	Francia	46	13,0	66,7	100
Delliere, 2020	R, MU	Diciembre 2020	Francia	108	19,4	71,4	100
Dupont, 2021	P, MU	Agosto 2020	Francia	106	17,9	35,3	100
Fekkar, 2020	R, MO	Marzo-Abril 2020	Francia	145	5	57	100
Fu, 2020	R, MO	Diciembre 2019- Febrero 2020	China	101	1	NR	100
Gangneux, 2020	P, MO	Julio 2020	Francia	45	15,6	28,6	100
García-Vidal, 2021	R, MO	Febrero-Abril 2020	España	989	0,7	43	100
Helleberg, 2021	R, MO	Agosto 2020	Dinamarca	25	8,0	100	100
Koehler, 2020	R, MO	Junio 2020	Alemania	19	26,3	60,0	100
Lahmer, 2021	P, MU	Marzo 2021	Alemania	32	34,4	36,4	100
Lamoth, 2020	R, MO	Diciembre 2020	Suiza	118	3,8	33,3	100
Machado, 2021	P, MO	Noviembre 2020	España	239	2,5	100	100
Meijer, 2021	R, MO	Febrero 2021	Países Bajos	66	19,7	46,2	100
Nasir, 2020	R, MO	Agosto 2020	Pakistán	147	3,4	60	40
Roman-Montes, 2021	R, MO	Noviembre 2020	México	144	9,7	57,1	100
Rutsaert, 2020	R, MO	Junio 2020	Bélgica	20	35	57,1	100
Segrelles-Calvo, 2021	P, MO	Febrero-Abril 2020	España	215	3	71	85,7
Van Arkel, 2020	R, MO	Mayo 2020	Países Bajos	31	19,4	66,7	100
Van Biesen, 2020	R, MO	Julio 2020	Países Bajos	42	21,4	22,2	100
Velez Pintado, 2021	R, MO	Marzo 2021	México	83	19,3	31,3	100
Versyck, 2021	R, MO	Febrero 2021	Francia	56	3,6	100	100
White, 2020	P, MU	NR	Gales	135	14	58	100
Yang, 2020	R, MO	Diciembre 2019- Enero 2020	China	52	4	NR	71

- Casos en pediatría.

La AI está asociada a inmunodeficiencias primarias como CGD e inmunodeficiencias secundarias asociadas con la aplicación de quimioterapia, enfermedades en las vías respiratorias, prematuridad en neonatos, tratamientos con inmunosupresores, trasplante de órganos sólidos y células madre hematopoyéticas y neoplasias hematológicas^{73,74}. La AI fue la infección fúngica invasiva más frecuente en niños (75%)⁷⁵. No existen muchos estudios que se basen en la detección de biomarcadores en este tipo de población.

- Trasplante alogénico de médula ósea.

Consiste en el procedimiento mediante el cual se trasplantan células sanguíneas procedentes de la médula ósea de un donante que presenta gran similitud con el receptor en cuanto a las proteínas que forman parte del complejo principal de histocompatibilidad. Este complejo genera un conjunto de proteínas conocidas como complejo del antígeno leucocitario humano (HLA) que actúan como moléculas presentadoras de determinantes antigénicos a las células T⁵⁰.

- Trasplante de órganos sólidos.

Los receptores de órganos sólidos constituyen otro grupo de riesgo. El rendimiento de las pruebas diagnósticas se ve reducido en esta población, pudiendo obtener resultados falsos negativos debido a una menor angioinvasión, y resultados falsos positivos debido a tratamiento con antibióticos, transfusiones o alguna infección bacteriana⁷⁶.

- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

Es otro factor de riesgo declarado que se caracteriza principalmente por la obstrucción del flujo de aire⁵². La capacidad pulmonar mediada por la elasticidad de bronquios, bronquiolos y alveolos se ve mermada debido a la pérdida de elasticidad de estos elementos. Esto hace que el pulmón se expanda demasiado y evita que salga todo el aire en la exhalación. Sus dos formas de presentación son la bronquitis crónica, que consiste en tos con moco, y el enfisema, el cual provoca un daño a los pulmones. El responsable principal es el tabaquismo, aunque también puede darse en personas con deficiencia en la proteína alfa-1 antitripsina, la cual se encarga de proteger de daño al hígado y pulmones.

- Síndrome de Hiper-IgE o síndrome de Job.

Es una enfermedad hereditaria poco frecuente que tiene relación con afecciones en la piel, senos paranasales y pulmones. Se asocia a una mutación en el gen STAT3 en el cromosoma 17. Estos enfermos presentan niveles de inmunoglobulina E superiores a la normalidad. Estos niveles suelen estar elevados en pacientes que sufren alergia y alguna afección por parásitos. La IgE se encuentra en la superficie de las células del sistema inmunitario denominadas "células cebadas" (mastocitos y polimorfonucleares basófilos) y su unión al antígeno desencadena la liberación de citoquinas y moléculas proinflamatorias como histamina, leucotrienos y prostaglandinas. Estos pacientes pueden desarrollar aspergilosis en la tercera o cuarta década de vida^{36,52}.

- Síndrome de MonoMAC.

La AI puede presentarse en el 17% de los pacientes de esta afección. Esta tiene como diana el sistema hematopoyético debido a una mutación en el gen GATA2. Este gen interfiere en la producción de células del sistema inmunitario como son los monocitos, los linfocitos B, las células NK y las células dendríticas⁵².

- Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida.

El síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es una afección provocada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Este virus es capaz de debilitar el sistema inmunitario del huésped acabando con los linfocitos T CD4, responsables de alertar al sistema de la presencia de patógenos. Bajos niveles de este tipo celular ponen en riesgo a este grupo de pacientes y hace que aumente la probabilidad de desarrollar infecciones oportunistas como es el caso de la aspergilosis^{47,77}.

- Tratamiento con Ibrutinib.

Es un medicamento que se emplea con el objetivo de reducir la propagación de las células del cáncer. Perteneció al grupo de fármacos conocidos como inhibidores de la quinasa, enzima destinada a la proliferación celular⁵⁵.

- Terapia CAR-T.

Se basa en recolectar células T mediante un proceso de leucoféresis. Tras su reprogramación, se dirigen hacia antígenos tumorales específicos. Se emplea para tratamiento de diferentes tipos de cáncer de tal modo que cada "CAR" está diseñado de manera específica. La terapia con este tipo celular hace que se liberen grandes cantidades de citoquinas, poniendo en funcionamiento al sistema inmunitario. Tras esto, el organismo se encuentra con el sistema inmunitario debilitado, aumentando el riesgo de infecciones oportunistas⁷⁸.

7. FORMAS CLÍNICAS.

El género *Aspergillus* puede causar una variedad de infecciones de naturaleza invasiva y no invasiva. Entre las especies implicadas se encuentra con mayor frecuencia *Aspergillus fumigatus*, seguido de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* y *Aspergillus niger*. La respuesta inmune del huésped, relacionada con la presencia o no de enfermedades subyacentes, es la que determinará qué tipo de infección tendrá lugar, así como su grado de invasión (Figura 10). A continuación, pasan a describirse los tipos de manifestaciones que se pueden encontrar dependiendo de la gravedad, la localización de la infección y el tipo de pacientes a los que afecta.

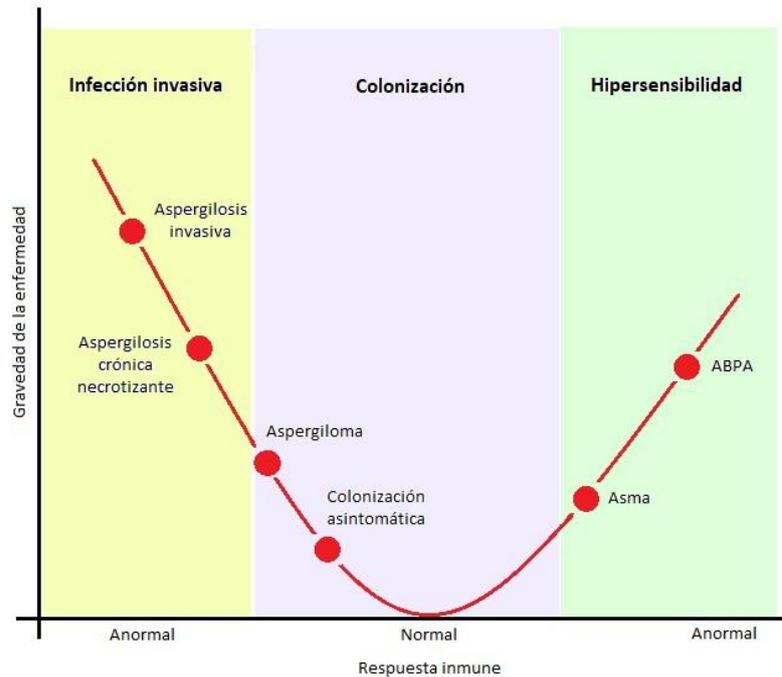


Figura 10. Esquema de las distintas enfermedades asociadas a *Aspergillus* spp. en función de la respuesta inmune del huésped.
(Figura modificada de Park y colaboradores⁷⁹)

- Aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA).

En este cuadro clínico ocurre una inflamación de las vías respiratorias, las cuales son colonizadas por conidios e hifas⁸⁰. Consiste en una reacción de hipersensibilidad ocasionada por células Th-2 que dan lugar a la liberación de citoquinas inflamatorias. Este patrón suele darse con mayor frecuencia en pacientes con fibrosis quística o asma. El diagnóstico se basa en el asma bronquial, una respuesta cutánea positiva al antígeno de *A. fumigatus*, inmunoglobulinas IgE e IgG séricas contra antígenos de *A. fumigatus* y un elevado recuento de eosinófilos. El tratamiento empleado más común es el uso de glucocorticoides y antifúngicos³¹.

- Aspergilosis pulmonar crónica (CPA).

Puede presentarse como aspergiloma, aspergilosis crónica cavitada, aspergilosis crónica fibrosante y aspergilosis crónica necrotizante. Suele afectar a pacientes inmunocompetentes o con un estado de inmunosupresión débil^{81,82}.

La detección de GM en estos pacientes fue mayor que la obtenida en pacientes con ABPA. Esta manifestación se relaciona con un daño pulmonar y hacen al tejido pulmonar susceptible de colonización por *Aspergillus* spp.⁸⁰.

A continuación, se pasan a describir brevemente las diferentes formas de esta manifestación:

- a) Aspergiloma: consiste en una pelota fúngica que coloniza una cavidad pulmonar. Esta masa de hifas, que se presenta como una bola localizada en una cavidad preexistente, generalmente se da en el tejido pulmonar, aunque también puede verse en otras localizaciones como el riñón o el cerebro. La forma más común de diagnóstico es a través de radiografía. El espacio de aire entre la masa hifal y la cavidad donde se encuentra se denomina como “signo de media luna”.
- b) Aspergilosis crónica cavitada: desarrollo de una o más cavidades. Se manifiesta en pacientes con tuberculosis, con ABPA, pacientes con cáncer de pulmón y con EPOC.
- c) Aspergilosis crónica fibrosante: consiste en la progresión de la manifestación crónica cavitada.
- d) Aspergilosis crónica necrotizante: también denominada aspergilosis pulmonar subaguda, se da en pacientes con cierto grado de inmunosupresión como en enfermos de SIDA, y en personas con corticoterapia, alcoholismo y diabetes.

- Aspergilosis invasiva (AI).

La AI es una infección grave que afecta a pacientes con grado de inmunosupresión y/o patologías hematológicas. Deriva en una neumonía con afectación en primera instancia a nivel pulmonar y senos paranasales, aunque puede diseminarse a otras regiones del cuerpo. Sus diferentes formas de manifestación son:

- a) Aspergilosis pulmonar invasiva: el tejido bronquial es invadido por el hongo. Los conidios son inhalados y viajan hasta los alveolos, de ahí pueden pasar al torrente sanguíneo. Aquí es donde comienzan a actuar los macrófagos y neutrófilos en personas inmunocompetentes haciendo que los conidios no maduren y proliferen a etapas más avanzadas. En personas inmunodeprimidas, con tasas de neutropenia, sometidos a trasplantes o que presentan uso prolongado de corticosteroides, aumenta el riesgo de que el hongo madure y germine dando lugar a la elongación de las hifas. Esto trae consigo la invasión del tejido pulmonar ocasionando aspergilosis pulmonar invasiva. Como prueba diagnóstica útil se encuentra la angiografía pulmonar por tomografía computarizada y la detección de GM en muestra de suero. El tratamiento se basa en voriconazol y anfotericina B liposomal³¹.
- b) Traqueobronquitis: se han descrito diferentes formas de presentación. La aspergilosis bronquial obstructiva está relacionada con la formación de tapones mucosos en la vía aérea; en la traqueobronquitis ulcerativa se invade la mucosa traqueobronquial y/o cartílago; y por último, la traqueobronquitis pseudomembranosa provoca inflamación e invasión del árbol traqueobronquial⁵⁰. Este tipo de aspergilosis guarda relación con los pacientes trasplantados de pulmón y los pacientes con tratamiento prolongado de corticoesteroides⁸³.

- c) Localización en la región rino-orbitaria que se da sobre todo en pacientes con neutropenias prolongadas. Además de cuadros de fiebre y congestión nasal, da lugar a problemas oculares como visión borrosa, proptosis, equimosis, parálisis oculomotora o ceguera por trombosis de la arteria central de la retina⁵⁰.
- d) Sistema nervioso central: la infección en la región rino-orbitaria puede extenderse al seno cavernoso extendiéndose al sistema nervioso central. Se manifiesta mediante deterioro cognitivo y déficit focal y puede provocar la muerte en tasas superiores al 80%⁴⁶.
- e) Endocarditis: suele estar relacionada con trasplantes de válvulas o en catéteres y también con el tratamiento de antibióticos de amplio espectro^{52,84}.
- f) Cutánea: conocida también por sus siglas en inglés CIA (Cutaneous Invasive Aspergillosis). Se presenta en dos formas: lesiones primarias, las cuales se producen de manera directa a través de la inoculación del hongo en el sitio concreto de la lesión; y lesiones secundarias que son debidas a diseminación sanguínea⁸⁵.
- g) Gastrointestinal: invasión local que ocurre cuando la barrera mucosa está dañada, dando lugar a inflamación del ciego, úlceras, dolor abdominal y sangrado⁸⁶.

8. TRATAMIENTO Y RESISTENCIA AL MISMO.

La concentración mínima inhibitoria o CMI es la prueba mediante la cual se mide la sensibilidad que presenta un determinado microorganismo a un antibiótico o agente antifúngico. Es la cantidad mínima necesaria que se debe aplicar del agente en cuestión para inhibir el crecimiento del microorganismo en condiciones normalizadas. Con respecto al tipo de microorganismos que nos ocupa, existen especies de *Aspergillus* que presentan resistencia a polienos y azoles o pueden desarrollar resistencia después de su exposición a los mismos. Relacionado con la resistencia a azoles se encuentra la mutación TR34/L98H en el gen CYP51A⁸⁷⁻⁸⁹. Se recomienda realizar pruebas de susceptibilidad consistentes en analizar la resistencia en aislados.

Los mecanismos de acción de los antifúngicos tienen como diana diferentes componentes del hongo. Su objetivo es desestabilizar e impedir el desencadenamiento de determinadas rutas que ayudan a la interacción del hongo con la célula huésped (Figura 11).

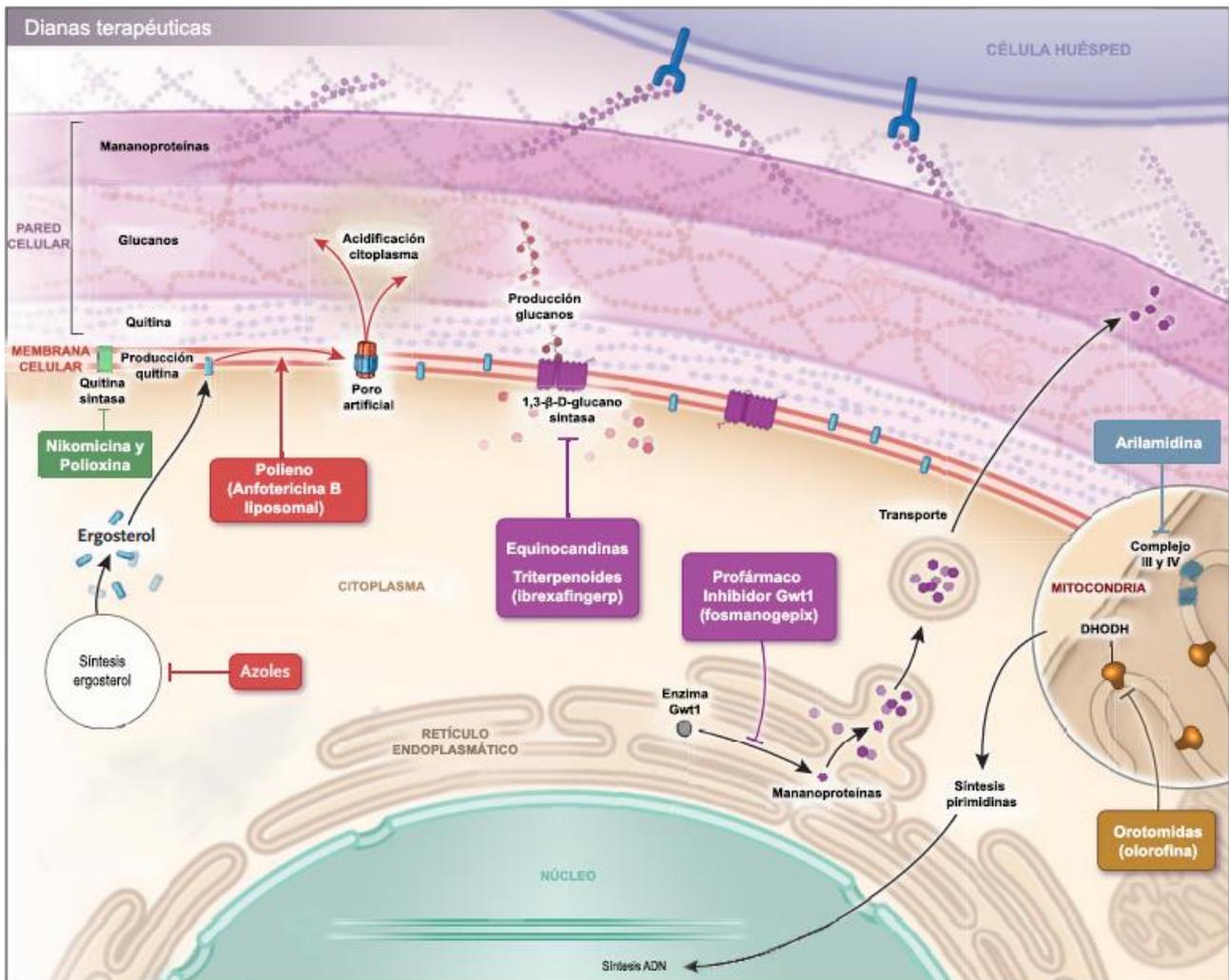


Figura 11. Dianas y mecanismos de acción de los diferentes agentes antifúngicos. (Figura modificada de Thompson y colaboradores⁷⁸)

Hay que tener también presente la interacción que pueden presentar los antifúngicos con otros medicamentos y realizar un seguimiento con el objetivo de analizar si se produce toxicidad.

La duración del tratamiento será variable en función del trascurso de la infección en cada paciente, pero habitualmente este se mantiene hasta pasado un corto periodo de tiempo después de que desaparezcan los signos radiológicos⁵⁰.

A continuación, pasan a describirse los antifúngicos empleados para el tratamiento y profilaxis de AI:

- Equinocandina.

Los tres tipos de equinocandinas presentan una estructura química central común basada en dihidroiornitina-4, dihidroxiprolina, dihidroxihomotiroxina y 3-hidroxi-4-metilprolina. Un ácido graso dimetil-oxo-tetradecilo caracteriza a la caspofungina; un sulfoxi y difenil-isoxazol a la micafungina; y un alcoxi-trifenilo, a la anidulafungina (Figura 12)⁹⁰.

Este antifúngico bloquea la síntesis de β -1,3-glucano en la pared celular del hongo alterando la actividad β -1,3-glucano sintasa (Figura 11) mediante su unión a la proteína Fks1. Un mecanismo de defensa por parte del hongo se basa en aumentar la síntesis de quitina. Para *Aspergillus fumigatus*, se estudió que la caspofungina induce a una modificación en los esfingolípidos de la membrana haciendo que la enzima β -1,3-glucano sintasa sea resistente al fármaco. Este antifúngico se recomienda en terapia de rescate o combinada con voriconazol, por ejemplo, y no para tratamiento de primera línea⁸⁴.

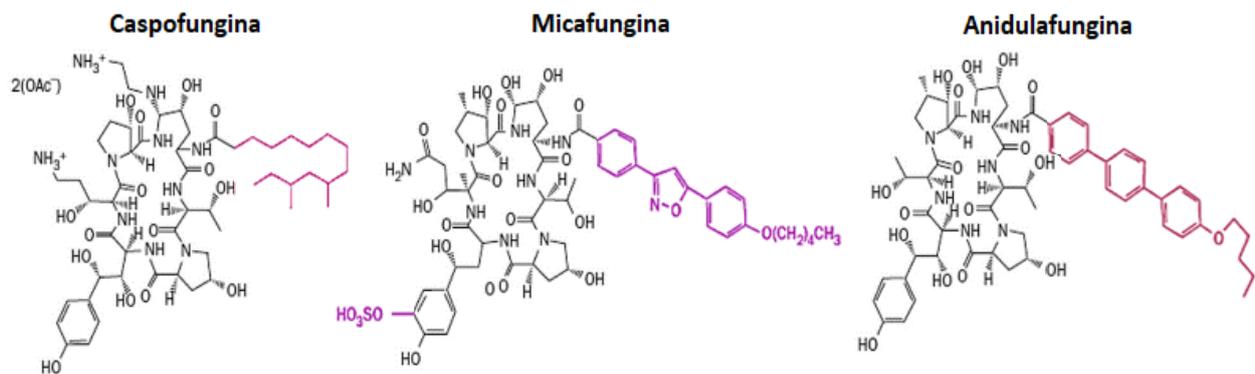


Figura 12. Estructura química de las equinocandinas⁹¹.

Si se presenta resistencia a los azoles en un porcentaje superior al 10%, se recomienda usar como fármacos de primera línea la combinación de voriconazol y equinocandina⁴⁷.

Las equinocandinas son cada vez más usadas en aquellos pacientes donde la infección es causada por especies de *Aspergillus* resistentes a los azoles y presenta la peculiaridad de tener que administrarse una vez al día. Desde hace poco tiempo está en desarrollo e investigación un tipo de equinocandina, denominada rezafungina, conocida también como CD101. Esta equinocandina tiene la ventaja de presentar una vida media más alta y permite una aplicación menos frecuente. También se han reportado efectos secundarios leves⁹².

- Nikomicina y Polioxina.

Son péptidos nucleósidos que contienen restos de UDP-N-acetil-glucosamina (Figura 13), actuando como inhibidores competitivos de la quitina sintasa (Figura 11). Se requiere su uso combinado con micafungina⁹³.

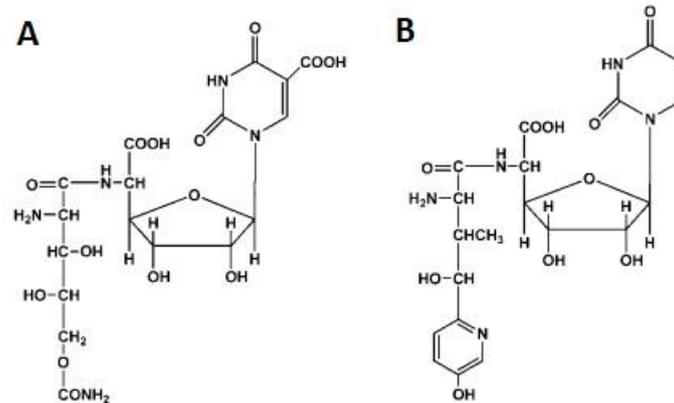


Figura 13. Estructura química de Polioxina (A) y Nikomicina (B)⁹⁴.

- Voriconazol.

Perteneciente al grupo de los triazoles (Figura 14), se emplea como tratamiento para AI confirmada o bajo sospecha debido a su eficacia y reducida toxicidad para el paciente⁹⁵. Consiste en el tratamiento de primera línea para la mayoría de las manifestaciones clínicas de la infección. Inhiben la síntesis de ergosterol (Figura 11). Este es uno de los componentes de la membrana celular y mediante el ataque al mismo hacen que la membrana pierda resistencia y permeabilidad⁸⁴.

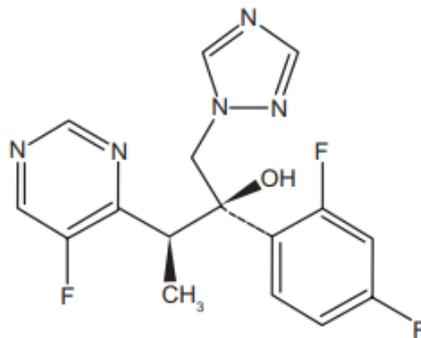


Figura 14. Estructura química de voriconazol⁹⁶.

En estudios comparativos con voriconazol y anfotericina B, se demostró la respuesta favorable del primero aplicándose como tratamiento inicial o como secundario tras previo fracasado. Además de obtener una respuesta favorable, redujo las tasas de mortalidad⁹⁷.

Existe toxicidad relacionada con la aplicación de este fármaco, que se manifiesta en la función hepática y da lugar a confusiones y alucinaciones, fotsia y fotosensibilidad⁹⁸.

Este fármaco es recomendado para tratar pacientes pediátricos con edades superiores a los 2 años⁷³.

- Isavuconazol.

El sulfato de isavuconazonio, agente antifúngico triazolico (Figura 15), fue aprobado por FDA en 2015 para el tratamiento de aspergilosis y mucormicosis. Conocido también como BAL4815, actúa también en la inhibición de la síntesis del ergosterol (Figura 11) y se recomienda su uso como tratamiento de primera línea⁹⁹. Es considerado como alternativa al voriconazol y reporta mejor tolerancia en cuanto a lesiones hepato-biliares, visuales y cutáneas¹⁰⁰.

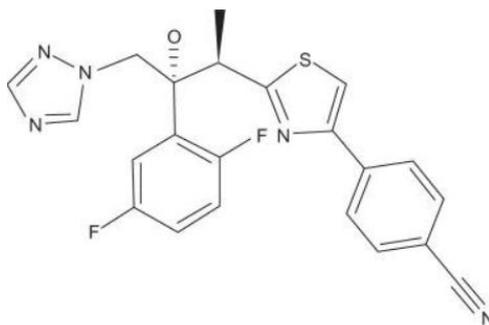


Figura 15. Estructura química de isavuconazol¹⁰¹.

- Anfotericina B liposomal.

La anfotericina B fue el primer fármaco antifúngico de uso sistémico introducido en 1958. Presenta un anillo monocíclico polieno-lactona unido a una micosamina¹⁰² (Figura 16). Se aisló de *Streptomyces nodosus*. En su forma liposomal, la anfotericina B está incorporada a liposomas de 45-80 nm de diámetro. Esta estructura hace que presente estabilidad una vez que está en el organismo y se comienza a liberar una vez que está en contacto con el ergosterol. Esto da lugar a la generación de poros en la membrana fúngica, haciendo que se acidifique el citoplasma provocando la muerte celular^{102,103} (Figura 11). Está indicado para pacientes con daño hepático ya que en ese caso el voriconazol puede ser más agresivo. También se recomienda para pacientes con mucormicosis^{47,95}. Este fármaco ha sido el elegido a lo largo de su historia para su administración tanto por vía intravenosa como en forma de aerosol y se usa como tratamiento preventivo para pacientes inmunodeprimidos, incluyendo pacientes con trasplante de pulmón. Su forma liposomal ha visto reducida su toxicidad⁹⁷.

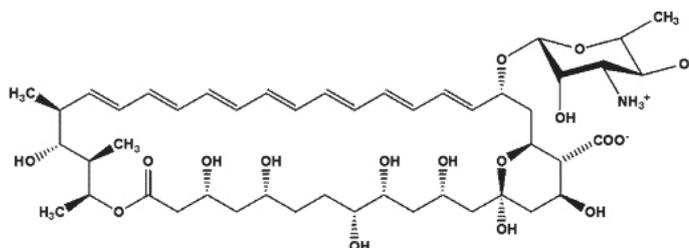


Figura 16. Estructura química Anfotericina B Liposomal¹⁰⁴.

Numerosos estudios muestran la capacidad de este fármaco para frenar la propagación de la infección por *Aspergillus*¹⁰⁵.

Este fármaco, en combinación con voriconazol, se recomienda como agente de primera línea cuando la tasa de resistencia supera el 10%. La anfotericina B liposomal constituye la primera opción para el tratamiento de recién nacidos y para aquellos que presenten *A. fumigatus* resistentes a azoles⁴⁷.

- Oloforima o F901318.

Pertenece a la familia de las orotomidas (Figura 17), también conocida como oloforima. Su función reside en la inhibición de la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH), impidiendo la producción de pirimidina (Figura 11). Este elemento es fundamental para las células fúngicas por su implicación en la síntesis de ADN/ARN, síntesis de proteínas, síntesis de pared celular y síntesis de fosfolípidos¹⁰⁶. Esta enzima también se encuentra en mamíferos, aunque este fármaco no afecta al ser humano. Puede presentar una concentración mínima inhibitoria <0,1 µg/ml para todas las especies patógenas de *Aspergillus*. Su efecto es muy dependiente del tiempo de exposición y del estadio del desarrollo del hongo. Un estudio parece demostrar el efecto fungistático sobre conidios y fungicida sobre germinaciones e hifas¹⁰⁷.

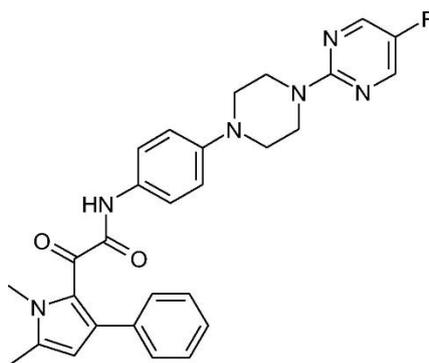


Figura 17. Estructura química F901318¹⁰⁶.

- Ibrexafungerp o SCY-078.

Con el objetivo de poder proporcionar un fármaco de administración oral y cubrir todo el espectro de resistencia frente a azoles y equinocandinas, se han realizado estudios destinados a la prevención y tratamiento de infecciones fúngicas. Uno de ellos es la enfumafungina, un nuevo fármaco denominado también “fungers”. Se trata de un triterpenoide de primera clase (Figura 18) cuya diana se encuentra en la β -(1,3)-D-glucano sintasa (Figura 11). Esto hace que el hongo pierda resistencia en su pared celular.

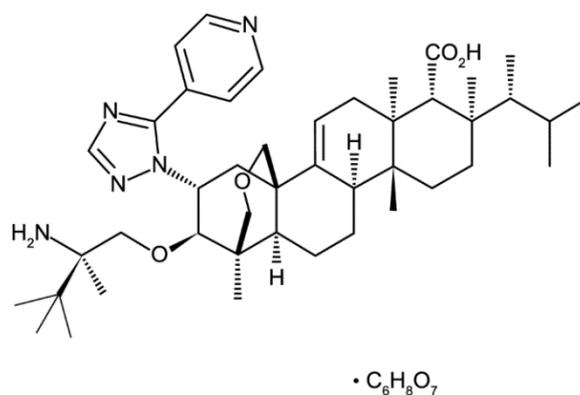


Figura 18. Estructura química Ibrexafungerp¹⁰⁸.

Tiene efecto fungicida sobre el género *Candida* y fungistático sobre el género *Aspergillus*, al igual que las equinocandinas. Aunque ambos tipos de fármacos actúen sobre la misma enzima, el sitio de unión es distinto¹⁰⁸. Además de las características citadas, presenta una serie de ventajas con respecto al resto, como son su baja toxicidad, tolerancia en la combinación farmacológica y elevada penetración tisular.

- Fosmanogepix (APX001).

Agente antifúngico nuevo de amplio espectro cuya administración es por vía oral. Consiste en un profármaco de N-fosfonooximetilo (Figura 19) que se dirige a la enzima fúngica Gwt1 (Figura 11). Esta enzima es responsable de la síntesis de glicosilfosfatidilinositol, el cual interviene a nivel de la pared celular facilitando su adhesión a las células del huésped y desencadenando la respuesta inmunitaria¹⁰⁹.

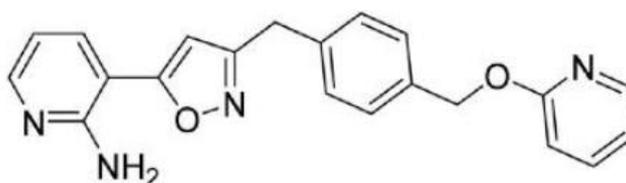


Figura 19. Estructura química Fosmanogepix¹¹⁰.

- T 2307.

La arilamidina T 2307 (Figura 20) es un nuevo antifúngico dirigido a la inhibición de las funciones mitocondriales, afectando a los complejos III y IV de la cadena respiratoria (Figura 11) y agotando los niveles de ATP¹¹¹.

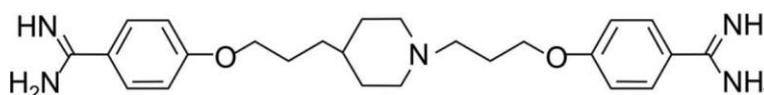


Figura 20. Estructura química T-2307¹¹².

9. DIAGNOSTICO.

El diagnóstico de infecciones provocadas por hongos se ha convertido en una ardua tarea debido a la necesidad de implicación de varias especialidades médicas con el objetivo de obtener un resultado fiable en el menor tiempo posible. En muchos centros puede que los recursos empleados para este campo sean limitados y los facultativos o técnicos no presenten una formación profunda en micología médica. El principal objetivo se basa en disponer de un mayor número de herramientas para obtener un diagnóstico rápido.

En cuanto al diagnóstico de AI, los biomarcadores más usados son GM y β -D-glucano. Los métodos de diagnóstico convencionales presentan deficiencias que imposibilitan tener un diagnóstico precoz. Las técnicas de cultivo para *Aspergillus* presentan baja sensibilidad y es un método lento. Se recomienda el crecimiento a 50°C para la identificación de *Aspergillus fumigatus sensu stricto* y para la identificación a nivel de especie suele usarse MALDI-TOF MS⁵⁵. Los métodos radiológicos aportan imágenes de lesiones que no son específicas de esta infección. Respecto a la técnica histológica, la obtención de muestra es complicada y, además, suele dar resultados negativos en etapa temprana de la infección. La detección de ADN de *Aspergillus* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ofrece un resultado más rápido con mayor sensibilidad que los métodos anteriores, aunque la complejidad en el procedimiento y su elevado coste imposibilita que exista una amplia implantación de este tipo de kit de diagnóstico. La detección de antígeno de GM en muestras de suero y/o LBA mediante inmunoensayos enzimáticos garantiza la obtención de un resultado rápido con alta sensibilidad y especificidad presentando una complejidad técnica y costes inferiores que la técnica de PCR. Es importante tener en cuenta que no se debe realizar análisis de detección de GM en muestras de sangre en pacientes que están sometidos a tratamiento antimicótico o profilaxis, pero sí a muestras obtenidas por broncoscopia⁴⁶.

9.1. BIOMARCADORES USADOS PARA EL DIAGNÓSTICO: B-D-GLUCANO, GALACTOMANANO, ADN ESPECIFICO DE *ASPERGILLUS* (PCR).

a) Galactomanano.

El GM es el antígeno elegido para el diagnóstico de la aspergilosis pulmonar invasiva y fue descubierto en 1970. La característica principal de su éxito es la inmunogenicidad de las cadenas laterales de galactofuranosa. Dichas cadenas y un núcleo de manano no inmunogénico conforman este heteropolisacárido que se localiza en la pared celular de *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.* Destaca es su naturaleza soluble y termoestable durante el crecimiento de las hifas, es un exoantígeno liberado durante el proceso de invasión que puede activar al sistema inmunitario innato¹⁴. Cada molécula de GM puede presentar hasta diez epítomos¹¹³. Tal y como se ha citado anteriormente, las especies del género *Penicillium* tienen moléculas de GM inmunológicamente similares a *Aspergillus* por lo que es frecuente aportar resultados de reactividad cruzada con

*Penicillium digitatum*⁴⁵. *Penicillium* es un hongo saprófito perteneciente al filo *Ascomycota*. Entre las especies donde se ha encontrado reactividad cruzada se encuentran *Penicillium marneffeii* y *Penicillium digitatum*¹¹³⁻¹¹⁵. *Talaromyces (Penicillium) marneffeii* causa micosis sistémica en el sudeste asiático, siendo frecuente en pacientes con VIH, aunque también se asocia con menor frecuencia a individuos que han sido sometidos a trasplante de órganos sólidos y células madre hematopoyéticas¹¹⁴. El otro caso citado es *Penicillium digitatum*, esta especie se considera patógeno vegetal y rara vez se puede encontrar provocando micosis sistémica en el humano aunque en 2013 se publicó un estudio donde aislaron repetidamente esta especie en muestras de esputo¹¹⁵.

Se ha publicado también reactividad cruzada con la especie *Cryptococcus neoformans*. Es una levadura presente en el medio ambiente, asociada a cierta vegetación y a excrementos de aves. Es el agente etiológico de la criptococosis, micosis sistémica diseminada que causa meningoencefalitis y que afecta con mayor frecuencia a pacientes con VIH. La mayor parte de la composición de la cápsula consiste en glucoronoxilomanano. En un estudio se obtuvo resultado positivo en la técnica de inmunoensayo enzimático de Platelia para un paciente que no presentaba signos de aspergilosis y que dio un cultivo positivo de *Cryptococcus*. Se piensa que el componente antigénico glucoronoxilomanano puede presentar epítomos que reaccionen con el monoclonal EB-A2 empleado en la técnica de ELISA comercializada (acrónimo del término en inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, “ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas”)¹¹⁶. Además, en otro estudio donde se evaluaron 29 muestras, se halló reactividad del anticuerpo monoclonal EB-A2 frente a *C. neoformans* en el 55,2% de los casos¹¹⁷.

Histoplasma es un hongo común en el este y centro de Estados Unidos, aunque también es frecuente en América Central y del Sur, África, Asia y Australia. Crece en tierra y material en descomposición y se asocia a excrementos de aves. Causa Histoplasmosis, una enfermedad pulmonar diseminada con tasas de mortalidad del 5% en niños y 8% en adultos¹¹⁸. En este también se encuentran cadenas de galactofuranosa como elementos que conforman la pared celular del hongo⁴⁴. Entre las técnicas de diagnóstico de esta patología se encuentra la radiografía, tomografía computarizada y el cultivo. También se puede coger una muestra de líquido o biopsia de tejido del órgano afectado, aunque este es un método invasivo. En estos casos la duración del proceso de diagnóstico puede ir desde varios días hasta más de una semana. Existe un método basado en un inmunoensayo enzimático cuantitativo válido para muestras de suero, plasma, lavado broncoalveolar (LBA), orina y otros fluidos corporales el cual está diseñado para capturar antígeno de galactomanano de *Histoplasma* mediante anticuerpos policlonales. Su nombre es Histoplasma quantitative EIA Test (MiraVista Diagnostics, Indianapolis, IN). Tal y como declara el fabricante, puede presentar reacción cruzada con otras especies de hongos, pero citan que es raro su interferencia con *Aspergillus*. En un estudio realizado con este kit y con Platelia, se obtuvo reacción cruzada de *Histoplasma capsulatum* sobre el kit de detección de GM de Platelia (50,85% en 59 muestras evaluadas). Es importante conocer si el resultado es positivo para *Histoplasma*, ya que el tratamiento empleado para enfermos de aspergilosis no es útil para esta infección. Un dato a tener en cuenta en el diagnóstico es que la histoplasmosis puede verse en pacientes con ningún grado de reducción en el recuento de neutrófilos. Los principales factores de riesgo de histoplasmosis son los estados de inmunosupresión como los de pacientes con SIDA, pacientes que han recibido un trasplante de órgano sólido y en

general aquellos que están tratados con corticoesteroides o inhibidores del factor de necrosis tumoral¹¹⁹.

Otro género que puede presentar interferencia debido a la reacción entre el mAB EB-A2 y antígenos del hongo es *Fusarium*. Este es un patógeno que causa infección tanto en individuos inmunodeprimidos como inmunocompetentes. Produce β -D-glucano (1,3) pero la detección de este antígeno carece de especificidad ya que es producido por muchos patógenos fúngicos. Se identificaron enlaces 1,6 o 1,2,6 en *Fusarium* mientras que en *Aspergillus* eran 1,5¹²⁰. Se han declarado reacciones cruzadas de *Fusarium* en el kit de Platelia^{121,122}. El tratamiento con antifúngicos empleados para esta infección es el voriconazol, triazol de segunda generación que también es empleado para AI¹⁰⁴.

Por otro lado, y a pesar de formar parte de nuestra microbiota, el género *Candida*, puede causar infecciones de gran importancia como es el caso de candidiasis invasiva provocada por la especie *Candida albicans*. Es una especie oportunista con gran número de factores de virulencia que tiene mayor influencia en pacientes hospitalizados con grado de inmunodepresión¹⁶. Se ha estudiado reacción cruzada del monoclonal EB-A2 empleado en el kit de Platelia frente a *Candida* spp.¹²³. En un estudio realizado en muestras LBA de pacientes no hematológicos se notificó reactividad cruzada en el kit de detección de GM en el 29% de los casos los cuales se identificaron mediante cultivo como *Candida* spp. En el caso de candidiasis invasiva, el tratamiento de elección es el mismo al empleado para aspergilosis, un triazol denominado posaconazol¹⁰⁴.

La detección de GM en fluidos es más sensible que la técnica de cultivo. Se recomienda una evaluación seriada en pacientes con neutropenia prolongada y en pacientes con trasplante alogénico de células madre durante la fase temprana de injerto. Por el contrario, no se recomienda en aquellos pacientes que reciban profilaxis contra el hongo⁵⁵. La sensibilidad de la técnica se ha declarado mayor en pacientes neutropénicos que no neutropénicos⁴⁷. En pacientes receptores de órganos sólidos, la sensibilidad aportada por la técnica para muestras LBA fue muy superior a la de las muestras séricas, 90% frente a 40%⁷⁵. Se recomienda un punto de corte más elevado para muestras LBA, mejorando así la especificidad de la prueba comprometiendo solo un poco la sensibilidad⁵⁵. Este tipo de técnica puede aplicarse a la población adulta y pediátrica. Numerosos estudios han aportado resultados similares en cuanto a sensibilidad y especificidad para los dos tipos de muestra en ambos tipos de población^{47,76}. La cinética de este biomarcador se relaciona con la supervivencia del paciente.

b) β -D-Glucano.

El β -D-glucano es un polisacárido que forma parte de la pared de varias especies de hongos a excepción de *Zygomycetos* y *Cryptococcus* spp. Se libera en fluidos corporales y está asociado a la infección por hongos. Su papel para el diagnóstico de AI es limitado, por ello, se recomienda usar biomarcadores y/o técnicas complementarias. El ensayo que mide dicho polisacárido se basa en una modificación de la ruta del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) consistente en la activación del factor G. El ensayo más conocido es Fungitell (Cape Cod, East Falmouth, Massachusetts) y está aprobado por la FDA para su uso en suero. Un resultado ≥ 80 pg/ml se considera positivo en población adulta. Aunque es una herramienta que ayuda al diagnóstico,

presenta una serie de inconvenientes que deben tenerse en cuenta, como es su falsa positividad (por ejemplo, IGIV, membranas de hemodiálisis, bacteriemia), presencia de interferencias (por ejemplo, niveles altos de triglicéridos y bilirrubina), y el riesgo de contaminación ambiental durante el proceso del ensayo⁷⁵. También se conocen el ensayo de Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokio, Japón) y Fungitec-G (Seikagaku, Tokio, Japón). En los últimos criterios actualizados de la EORTC/MSG, ya no se incluye esta técnica para la clasificación de infección invasiva probable³.

c) ADN específico de *Aspergillus*.

La amplificación de ADN a través de la técnica PCR se recomienda en pacientes neutropénicos que no reciben profilaxis antifúngica ya que el rendimiento de la técnica se ve comprometido afectando negativamente la especificidad y precisión de la técnica. La sensibilidad aportada para muestras LBA es superior a la obtenida para muestras de suero^{84,124,125}. En caso de usarla, se recomienda en combinación con la técnica de detección de GM^{126,127}.

9.2. TÉCNICAS EMPLEADAS EN EL DIAGNÓSTICO.

a) Microscopía:

El examen microscópico puede dar resultados en menos de una hora. Se requiere de KOH al 30% y tinción con fluorocromo para la tinción de las hifas. Este último elemento es limitado en países con bajos recursos⁵². A este inconveniente se le suma que la sensibilidad aportada por esta técnica está en torno al 50% en el mejor de los casos⁴⁶.

b) Histología:

Se caracteriza por bajas tasas de sensibilidad³ y se recomienda su confirmación mediante la técnica de cultivo ya que el aspecto presenta similitudes con el género *Fusarium*. En muchos casos existe elevada dificultad para obtener las muestras debido al estado crítico de los pacientes⁴⁷.

c) Cultivo:

El procesamiento rápido de muestras respiratorias para el desarrollo de esta técnica es importante para evitar el crecimiento excesivo de otros organismos. El medio de cultivo más empleado es Sabouraud y se recomienda aplicar cloranfenicol para evitar contaminaciones⁵². Esta técnica se caracteriza por requerir varios días para la obtención de resultados y por aportar bajas tasas de sensibilidad. Esta parece estar en torno al 30-50%¹¹³.

Por lo citado anteriormente, esta técnica no es buena candidata para un diagnóstico rápido que es el único objetivo que se presenta en estos casos.

d) Radiología:

Los signos radiológicos no son específicos de la infección que da lugar a AI y se requieren pruebas adicionales¹²³. Además de no ser específico, el examen carece de sensibilidad y especificidad sobre todo en etapas tempranas de la infección¹²⁸.

Entre los patrones más típicos que aporta la infección destaca la presencia de un nódulo rodeado por un halo, este se detecta en etapa temprana y va desapareciendo con el tiempo. Por otro lado, también pueden aparecer signos de media luna, una cavidad que contiene aire. Esta va aumentando con el transcurso de la infección. Este signo puede confundirse con la mucormicosis⁵².

En pacientes no neutropénicos el signo común se denomina “opacidad en vidrio esmerilado” y consiste en la aparición de áreas grises y difusas. En pacientes con EPOC lo más común son los infiltrados alveolares y en casos de aspergilosis broncopulmonar, se observa un engrosamiento de la pared bronquial con nódulos centrolobulillares (“árbol en yema”)¹²⁷.

Se considera apropiado el estudio de los patrones radiológicos que presente cada paciente y que estos se analicen en conjunto con otras técnicas de diagnóstico.

e) Tomografía computarizada:

Esta forma de diagnóstico consiste en obtener imágenes transversales derivadas de la aplicación de rayos X. En el caso de AI se pueden ver nódulos de más de 1 cm rodeados con halo, zonas en forma de cuña o media luna de aire y derrame pleural. También puede apreciarse engrosamiento bronquial y nódulos con apariencia de “árbol en yema”. Esta herramienta puede ayudar al diagnóstico, pero ninguna aporta altas tasas de sensibilidad y especificidad⁴⁷.

f) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

La técnica PCR se emplea en este caso con el objetivo de detectar ácido nucleico de *Aspergillus*. Se caracteriza por altas tasas de sensibilidad y especificidad y rapidez en la obtención de resultados. Como inconvenientes principales se encuentra una alta complejidad técnica y coste elevado.

A pesar de aportar buenas tasas de sensibilidad y especificidad, en un estudio realizado con muestras de esputo, se obtuvieron resultados negativos en la mayoría de los pacientes siendo estos positivos en la técnica empleada como referencia⁸⁰.

En otros estudios recientes se encontró una mayor sensibilidad en muestras LBA que en muestras de suero. Se recomienda la combinación de PCR y la detección de GM para mejorar el diagnóstico y hacer que este sea más ágil¹²⁹.

Existen una serie de kits comerciales basados en esta técnica, se muestran a continuación:

- *Aspergillus fumigatus* MycoGENIE® (AdemTech, Pessac, Francia)

Es un ensayo disponible comercialmente (CE-IVD) basado en qPCR dirigido al análisis de muestras LBA con el objetivo de detectar ADN de *Aspergillus fumigatus*. El límite de detección (LoD) para secuencias monocopia fue de 6 copias y para multicopia, menor de 1 copia. El punto de corte se definió en Ct ≤ 35. Está destinado a muestras de suero, respiratorias y biopsias y tiene capacidad para 48 muestras. Además de detectar *Aspergillus fumigatus* tiene la capacidad de identificar especies resistentes a azoles.

En un estudio retrospectivo realizado con pacientes hematológicos que presentaban leucemia mieloide aguda principalmente, se analizaron muestras LBA que habían sido previamente clasificadas

según los criterios de EORTC/MSG 2008. La sensibilidad reportada fue del 33% y la especificidad de 69%. Los autores recomiendan su uso combinado con la detección de GM para conseguir una mejora en la sensibilidad¹²⁶.

Otros estudios más recientes, en cambio, muestran alta sensibilidad y especificidad en muestras de suero y LBA, siendo superior en estas últimas. Esto se observó tanto en pacientes hematológicos como no hematológicos sin verse comprometida la sensibilidad en pacientes que presentaban terapia antimicótica. La sensibilidad rondó el rango 71-100% y la especificidad se situó entre 84,6-100%¹³⁰⁻¹³².

- MycAssay *Aspergillus*® (Myconostica Ltd., Cambridge, Reino Unido)

Es una PCR a tiempo real que detecta diferentes especies de *Aspergillus*. El límite de detección se encuentra en menos de 50 copias. Su uso está dirigido a muestras de suero y LBA. La duración de la técnica está en torno a 4 horas.

Se declara una mayor sensibilidad en muestras LBA que en muestras de suero y se demuestra un mejor rendimiento diagnóstico en pacientes hematológicos. Comparan, en varios estudios, este procedimiento con la técnica de detección de GM de ELISA y señalan una mayor sensibilidad en esta para muestras de suero¹³³.

En otro estudio realizado también con muestras de suero procedentes de pacientes hematológicos, se obtuvo una sensibilidad y especificidad menores que en la técnica de detección de GM¹³⁴. Estudios recientes declaran una sensibilidad entre el 80-100% y una especificidad entre 82,4-98,6%^{133,135-137}.

- AsperGenius® (PathoNostics, Maastricht, Países Bajos)

Es un ensayo PCR a tiempo real cuya ventaja más importante es la capacidad de detección de mutaciones en especies resistentes a azoles. Está dirigido a muestras LBA, suero, plasma, biopsia y líquido cefalorraquídeo. La duración de la técnica está en torno a 3 horas.

En un estudio, donde se estudiaban muestras LBA, se obtuvo una sensibilidad que rondaba el 65% para casos probables según los criterios EORTC/MSG. La sensibilidad fue del 96% cuando se combinó esta técnica con la prueba de detección de GM, por lo que se recomienda su uso junto con la misma para obtener un diagnóstico con mayor precisión¹³⁸. Estudios recientes muestran una tasa de sensibilidad entre 66,5-88,9% y una especificidad que ronda el 77,8-93,3%^{135,136,139-141}.

- SeptiFast® (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania)

Es la primera PCR a tiempo real cuyo uso está destinado a sangre total. Las dianas de detección son patógenos fúngicos y bacterianos y presenta una duración entre 6 y 7 horas.

En un estudio, siguiendo los criterios EORTC/MSG, se declara una sensibilidad del 66% y una especificidad del 98%. Dos de los inconvenientes notificados fue el complicado flujo de trabajo y su elevado coste¹³³.

En otro estudio, en este caso analizando población neonata, se obtuvo un valor para la sensibilidad del 90% y una especificidad reducida, 73%. Es necesario tener en cuenta la contaminación que puede existir y los requerimientos técnicos que se necesitan¹⁴².

En resumen, los estudios reportaron una sensibilidad en 60-86% y una especificidad en 96-100%^{143,144}.

- Magicplex Sepsis Real (Seegene Inc., Seoul, Korea)

Esta PCR está destinada a sangre total y presenta una duración de 6 horas aproximadamente. Es capaz de detectar más de 90 géneros, 27 a nivel de especie y 3 genes que son indicativos de resistencia a fármacos¹⁴⁵. La tasa de sensibilidad y especificidad, obtenida en estudios recientes, estaría en 29 y 95%, respectivamente^{145,146}.

- *A. fumigatus* Bio-Evolution (Bio-Evolution, Bussy-Saint-Martin, Francia)

El tipo de muestra recomendada es LBA y la duración de la técnica estaría en unos 80 minutos sin contar con el periodo de extracción de ADN. Cuenta con 25 test por kit y presenta marcado CE. La sensibilidad y especificidad reportadas estarían en 80 y 100%, respectivamente¹³⁶.

- Fungiplex® *Aspergillus* y Fungiplex® *Aspergillus* azole-R (Bruker Daltonics, Massachusetts, Estados Unidos)

Destinada para muestras de sangre total, muestras de suero, plasma y LBA. La duración de la técnica es de aproximadamente 2 horas sin contar con el periodo de extracción de ADN. Este kit aporta una sensibilidad que ronda el 60% y una especificidad en torno al 91%¹³⁰.

- *Aspergillus* spp. ELITe MGB® kit (ELITechGroup, Bussy-Saint-Martin, Francia)

Detecta y cuantifica el ADN del género *Aspergillus* en muestras de LBA, aspirados bronquiales y plasma recogido en EDTA. Estudios recientes muestran que la sensibilidad está en el rango 90-100% y la especificidad entre 97-97,8%¹⁴⁷.

- AspID (OLM Diagnostics, Newcastle, Reino Unido)

Con capacidad para 50 reacciones, es capaz de detectar especies de *Aspergillus* y diferencia a *Aspergillus terreus*. Aporta resultados en 90 minutos y la muestra recomendada es LBA. Estudios realizados durante los últimos años comunicaron una sensibilidad en torno al 94% y una especificidad del 76,5%^{131,132,148}.

g) Inmunoensayos:
1. Inmunocromatografía.

Las técnicas de flujo lateral se caracterizan principalmente por la rapidez a la hora de obtener los resultados, son los que se conocen como test rápidos. El ensayo de flujo lateral inmunocromatográfico se basa en el uso de membranas de nitrocelulosa donde se desarrollan las reacciones inmunológicas ayudándose del fenómeno de capilaridad (Figura 21). A continuación, se detallan los kits comerciales que se conocen para la detección de *Aspergillus*.

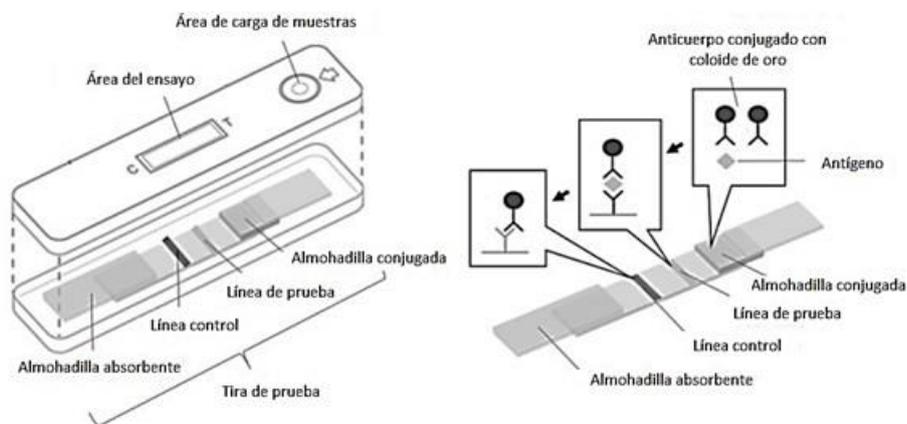


Figura 21. Estructura de un kit de inmunocromatografía.
(Imagen modificada de Okada y colaboradores¹⁴⁹)

- *Aspergillus* Lateral-Flow Device (LFD) AspLFD (OLM Diagnostics, Newcastle, Reino Unido)

Su fundamento es la detección cualitativa de *Aspergillus* en muestras de suero y LBA. Este kit se presentó en primer lugar como prototipo y posteriormente salió al mercado con marcado CE. En esa transición se cambió de subclase de mAB y el tipo de conjugado. Actualmente, se trata de un sistema de captura basado en un mAB con isotipo IgG1 que sirve como elemento de captura y como detector cuando está conjugado a partículas magnéticas de nitrocelulosa (NCB). El mAB, denominado JF5, será capaz de detectar mananoproteínas antigénicas que se expresan durante el crecimiento del hongo.

Según las instrucciones de uso del fabricante, se recomienda pretratar la muestra antes de su evaluación si presenta aspecto viscoso o tiene aspecto hemolizado, ya sea suero o LBA. El tratamiento consiste en añadir 300 μ l de solución "Sample buffer" a 150 μ l de muestra, llevar a 100°C durante 3 minutos y centrifugar a 14000 x g durante 5 minutos. Una vez hecho esto, se añaden 70 μ l del sobrenadante resultante en el casete. Las muestras LBA que presenten un aspecto limpio, serán depositadas directamente en el casete. Una vez ahí se someterán a un periodo de incubación de 15 minutos a temperatura ambiente. La lectura del casete podrá ser modo visual o mediante un lector. La presencia de una doble banda coloreada es indicativa de un resultado positivo, la presencia de la

banda superior es indicativo de resultado negativo y si se da la circunstancia de observar la banda inferior de forma aislada, se deberá repetir el ensayo ya que la banda control no ha sido revelada.

Tal y como declara el fabricante, se obtiene una especificidad similar para muestras de suero y LBA (en torno al 90%). En cambio, la sensibilidad es mayor para muestras LBA que para suero (71% y 56%, respectivamente).

Una vez descritos los aspectos técnicos, se pasa a comentar los estudios publicados realizados con este kit de diagnóstico. Un estudio retrospectivo de un único centro se basó en el análisis de muestras de LBA que fueron conservadas a -20°C. Los pacientes estudiados no presentaban enfermedades hematológicas, pero sí otras condiciones subyacentes como trasplantes, enfermedades reumatoides, autoinmunes o cuadro de choque séptico en pacientes de UCI. Las muestras fueron clasificadas según los criterios de EORTC. Se obtuvo una sensibilidad del 46% y una especificidad del 66%¹⁵⁰. En otro estudio, también basado en muestras LBA, se halló una sensibilidad del 25% y una especificidad del 100%¹⁵¹.

En un estudio multicéntrico se obtuvo una sensibilidad del 86% y una especificidad del 87%. En este caso volvieron a testarse muestras LBA que habían sido recolectadas con anterioridad y se habían conservado a $\leq -20^\circ\text{C}$. Las muestras fueron de pacientes hematológicos y fueron caracterizadas según el criterio EORTC con AI probada o probable¹⁵².

- *Aspergillus galactomannan LFA* (IMMY, Oklahoma, Estados Unidos)

Ensayo de flujo lateral basado en la detección cualitativa de GM en muestras de suero y LBA. El sistema sandwich usado en esta técnica está compuesto por dos mAB distintos, uno de captura y otro detector. Esto podría traducirse en un aumento en la sensibilidad de la técnica, pero también en un empeoramiento de la especificidad ya que la detección de epítomos diversos podría conducir a mayor reactividad cruzada con otros géneros de hongos.

El procedimiento de la técnica se basa en una primera etapa de pretratamiento de la muestra. Sobre esta se aplica un tampón en proporción 1:4, posteriormente, tras agitación, se somete a 120°C durante 6-8 minutos y un último paso de centrifugación a 10000-14000 x g durante 5 minutos. Una vez realizado esto, se pipetea 80µl de sobrenadante en un tubo limpio y se añaden al mismo 40µl de "running buffer". Por último, la tira se inserta en dicho tubo. A modo de guía, aparecen dibujadas unas flechas que indican la orientación a la que debe introducirse. Tras una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente se procede a realizar la lectura.

El kit presenta dos controles, uno negativo y otro positivo. Estos no requieren tratamiento previo como en el caso de las muestras y el fabricante recomienda que sean incluidos una vez cada mes.

Uno de los puntos críticos de este ensayo es la lectura de los resultados. Esta puede realizarse de forma visual, detectando presencia o ausencia de línea. La presencia de línea solo en la parte superior de la tira indica que el resultado es negativo, esa línea es el control e indica que la técnica se ha desarrollado correctamente. Cuando la línea control aparece coloreada y más abajo se aprecia otra línea, el resultado es positivo. La mínima presencia de línea en la parte inferior es indicativa de

positividad según las instrucciones de uso del fabricante. En el caso de que ninguna línea aparezca o solo aparezca la inferior, el ensayo se considera inválido y es necesario la repetición del mismo.

Para eliminar la subjetividad del operador en la interpretación de los resultados, se recomienda el uso del lector denominado "Cube Reader". Este traduce la intensidad de color de la línea en valores numéricos, proporcionando un valor de índice y una interpretación según lo fijado por el fabricante. Se clasifica como muestra positiva la que presente índice $\geq 0,5$ y como muestra negativa la que presente índice $< 0,5$. En caso que no sea posible la lectura de la línea control aparecerá el mensaje "resultado inválido" y como valor numérico "N/A", reflejando la necesidad de repetir la prueba.

En cuanto al rendimiento del kit, en un estudio realizado por el Sistema de Salud de la Universidad de Michigan, se encontró una sensibilidad del 40% y una especificidad del 80%. El estudio fue retrospectivo y se usaron con exclusividad muestras de LBA que fueron tratadas y evaluadas según las instrucciones de uso. Los pacientes estaban clasificados según el criterio EORTC/MSG con AI probada o probable. Este estudio se vio limitado por el reducido tamaño muestral, uso exclusivo de muestras LBA y pertenecer a un solo centro¹⁵³.

En un estudio multicéntrico se analizaron muestras LBA que habían sido recolectadas con anterioridad y conservadas a $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Los participantes fueron dos centros de Bélgica y dos de Países Bajos. Las muestras fueron de pacientes hematológicos y caracterizadas según el criterio EORTC/MSG con AI probada o probable. En este caso la sensibilidad obtenida fue de un 83% y la especificidad de un 88%. Al igual que en el estudio anterior, el tamaño muestral era pequeño y solo fueron ensayadas muestras de LBA de pacientes hematológicos¹⁵².

En otro estudio, se evaluó un mayor número de muestras ($N=32$), correspondientes a pacientes que presentaban AI probada o probable. Para la especificidad se usaron un centenar de muestras ausentes de enfermedad. Se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 96,9% y 98%, respectivamente. Al igual que los anteriores, este estudio fue retrospectivo, aunque en este caso la matriz de muestra ensayada fue suero. Los datos demográficos indican dos limitaciones del ensayo: una media de edad en los pacientes pasados los 50 años y enfermedad hematológica de base¹⁵⁴.

Por último, un estudio retrospectivo analizó muestras de LBA que habían sido conservadas a -20°C . En este caso no existían anomalías hematológicas de base, sino que presentaban otras condiciones subyacentes como trasplantes, enfermedades reumatoides, autoinmunes o cuadro de choque séptico en pacientes de UCI. Las muestras fueron caracterizadas según los criterios de EORTC y se obtuvo una sensibilidad del 69% y una especificidad del 62%¹⁵⁰.

2. Inmunoenzimáticos.

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas se basa en la interacción antígeno-anticuerpo mediante la técnica de captura tipo sandwich. Está caracterizado por ser un método de diagnóstico sensible, específico y rápido. Generalmente está dirigido a la detección de GM o galactomananoproteína.

A continuación, se realiza una revisión de los kits basados en esta técnica:

- VIDASGM® BioMérieux (Marcy l'Étoile, Francia)

Hasta el momento se ha presentado como un prototipo. Trata de un sistema automatizado basado en un test cualitativo y la técnica usada se denomina ELFA (ensayo de fluorescencia ligado a enzimas). Las muestras requieren de pretratamiento con un agente quelante, al igual que se emplea en el resto de técnicas de detección de GM. Como fase sólida presenta un mAB obtenido en ratón y para la detección usa un mAB obtenido en rata. Este último se presenta conjugado con biotina. Como sustrato de la reacción se usa 4-Metil-umbeliferil fosfato. El sustrato, en presencia de un anticuerpo anti-biotina, da lugar a un producto fluorescente. El prototipo presenta un control denominado estándar (S1) y un control positivo. El control estándar es requerido por el sistema automatizado cada 15 días tras el inicio de la rutina y el valor relativo de fluorescencia (RFV) del mismo es empleado para el cálculo de un valor índice (I) que se obtiene como I: RFV muestra / RFV S1.

En un estudio retrospectivo y prospectivo realizado en un único hospital de Francia, se usaron más de un centenar de muestras de suero de 30 pacientes. El 65,1% de las muestras fueron conservadas a -80°C antes de su evaluación. La clasificación de las muestras tuvo lugar siguiendo los criterios EORTC/MSG³. La misma colección de muestras fue ensayada en el kit prototipo VIDASGM® y en el kit de ELISA Platelia™ *Aspergillus* Ag. Los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos fueron 84,3% y 74,7%, respectivamente para el primer kit y 76,5% y 81,3%, respectivamente para el segundo kit¹⁵⁵.

- *Aspergillus* antigen Euroimmun (Lübeck, Alemania)

Inmunoensayo enzimático cuyo objetivo es la detección de galactomananoproteína mediante un mAB denominado JF5. Las muestras de suero y LBA requieren de un pretratamiento como también ocurre en los test rápidos y en Platelia. El kit proporciona resultados cuantitativos expresados en pg/ml a través de la elaboración de una curva patrón con 6 puntos de calibración. Por otro lado, los resultados también pueden expresarse como semicuantitativos en valores de índice, los cuales se obtienen con el valor obtenido para la muestra y el promedio de los valores obtenidos para el control cut off. El procedimiento del ensayo se basa en una incubación de una hora para la muestra; a continuación, una incubación de una hora con el mAB que se presenta conjugado con biotina; una tercera incubación de 30 minutos con el conjugado enzimático; y, por último, se aplica el sustrato, el cual requiere de una incubación de 15 minutos. La duración aproximada del ensayo es de 2 horas y 45 minutos. El fabricante define un punto de corte en índice >0,4 y declaran una sensibilidad de 96% y una especificidad del 97%. Un estudio independiente refleja similitud entre el kit de Euroimmun y

Platelia¹²³ y otro, muestra especificidades similares pero una tasa de sensibilidad más baja para el kit de ELISA de Euroimmun frente a Platelia (74% vs. 90%)¹⁵⁶.

- PLATELIA *Aspergillus* Ag Bio-Rad Laboratories, Inc. (California, Estados Unidos)

Inmunoensayo enzimático basado en un sistema de captura tipo sandwich compuesto por un mismo mAB que será el que aparezca como elemento de captura y como anticuerpo detector. El monoclonal se denomina EB-A2 y es obtenido en rata. Es un test cualitativo y es posible su empleo en muestras de suero y LBA. Las muestras requieren un pretratamiento previo con EDTA, calor y centrifugación y el sobrenadante obtenido, será el que se emplee en la técnica. El sobrenadante se dispone junto con el mAB conjugado con peroxidasa, la reacción tiene lugar en un único paso y requiere una incubación de 90 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, y tras un proceso de lavado donde se retiran todos los elementos sobrantes no reactivos, se aplica sustrato de tetrametilbencidina (TMB) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La duración aproximada de la técnica, sin contar con el pretratamiento de las muestras, es de 2 horas y su realización puede ser manual o automática. Este kit, comercializado desde 2003, está ampliamente distribuido en todo el mundo y ha sido considerado durante muchos años el kit de referencia basado en la detección del biomarcador GM. Datos aportados por este han servido como complemento a otras técnicas de diagnóstico, aportando así mayor rapidez en la obtención de resultados. Además, la detección de GM mediante esta técnica, se encuentra incluida como criterio microbiológico en las definiciones de la IFI por la EORTC/MSG³.

Aunque la duración de la técnica no es elevada, uno de los principales inconvenientes de la misma es su presentación en formato ELISA con tiras indivisibles. Esta presentación y su elevado coste hacen que la frecuencia de uso en los hospitales no sea diaria, sino que se tiende al acúmulo de muestras que se montan exclusivamente una o dos veces por semana⁶⁰.

Otro de los inconvenientes que han sido descritos es la falta de reproducibilidad; en un estudio se analizó la variabilidad interlote, interlaboratorio, haciendo que un solo operador por centro fuera el que realizara la prueba para evitar al máximo posible las fluctuaciones aportadas por varios operadores. Para este se obtuvo una buena reproducibilidad entre laboratorios y entre días y la variabilidad se asoció al uso de diferentes lotes. También se obtuvieron valores elevados de coeficiente de variación en muestras con resultados de índice en torno a valor de cut off no solo entre diferentes lotes, sino también intraensayo¹²⁸. Se recomienda que la técnica se lleve a cabo de forma automatizada para evitar la variabilidad y error que pueda ser aportado por cada operador ya que, como se sabe, antes del montaje de la técnica, ya se parte de cierta oscilación aportada por el proceso de pretratamiento de la muestra.

Múltiples factores pueden hacer que se obtengan resultados falsos positivos como es el error aportado por el operador que lleva a cabo la prueba, el tratamiento con piperacilina-tazobactam, ingesta de alimentos contaminados y presencia de bacterias de la microbiota que incluyen *Escherichia coli*, *Rhodococcus equi*, *Corynebacterium jeikeium* y *Bifidobacterium spp.*, puesto que estos presentan un epítipo de galactofuranósido que es reconocido por el mAB empleado en la técnica¹⁵⁷. La amplia reactividad cruzada declarada para este kit puede verse justificada por los numerosos estudios realizados sobre este.

En cuanto a los estudios de sensibilidad y especificidad, la detección de este biomarcador mediante la técnica ELISA constituye un soporte al diagnóstico rápido de la infección por aportar resultados en menor periodo de tiempo y con mayor sensibilidad que las técnicas convencionales. La capacidad de detección del biomarcador en muestras LBA puede ser mayor que en muestras de suero ya que está asociada al grado de invasión fúngica y al estado del paciente⁴⁷. La sensibilidad puede verse mermada en muestras de suero en pacientes no hematológicos^{48,76,118,158-160} o en aquellos que reciben profilaxis antifúngica^{49,161,162}. El rendimiento diagnóstico de la prueba en muestras de LBA ha sugerido, en numerosos estudios, la necesidad de disponer de un punto de corte superior. Un índice de 1,0 en lugar de 0,5 con el objetivo de mejorar la especificidad sin ver perjudicada la sensibilidad⁷⁶. Un estudio llevado a cabo en muestras de esputo, donde se compara la técnica PCR con este kit, refleja valores elevados de índice para la técnica ELISA, que son confirmados por cultivo, y falta de detección de ADN de *Aspergillus* por PCR⁸⁰.

- CHORUS *Aspergillus* galactomannan Ag DIESSE - DIAGNOSTICA SENESE SPA (Siena, Italia)

Se trata de un ensayo inmunoenzimático para la determinación de antígeno de GM de forma cualitativa. Su uso está recomendado para muestras de suero y LBA.

Se basa en la técnica ELISA y se dispone de un mAB sensibilizando la placa; una vez la muestra ha sido tratada con solución de tratamiento, será dispuesta sobre la placa junto con el mAB conjugado con peroxidasa. Tras la incubación de los elementos, tiene lugar un proceso de lavado para eliminar todos aquellos elementos no reactivos y, por último, se añade la solución TMB para revelar la reacción. La reacción se para mediante una solución de ácido sulfúrico 0,3 M.

El kit dispone de controles, los cuales deben tratarse y montarse junto con las muestras en el sistema automatizado denominado CHORUS TRIO.

El formato del kit consiste en 36 tiras monodosis, las cuales presentan todos los reactivos disponibles para llevar a cabo la reacción. Un inconveniente que puede presentar es el gasto extra de monodosis en el montaje de controles, ya que cada tira tiene capacidad solo para una muestra o control. Por otro lado, tal y como se señala en sus instrucciones de uso, el kit solo es compatible para su montaje con 2 kits de la misma casa comercial limitando la versatilidad del sistema. El tiempo estimado para la obtención de resultados es de 2 horas. El fabricante declara una sensibilidad de 93,4% y una especificidad de 94,4%.

10. DESARROLLO DE UN INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO BASADO EN QUIMIOLUMINISCENCIA.

La técnica ELISA es una técnica convencional ampliamente distribuida y comercializada. Se basa en un inmunoensayo que tiene como fundamento la interacción de un antígeno con un anticuerpo. Se requiere, además, la presencia de anticuerpos secundarios y/o antígenos que vayan conjugados a una enzima como, por ejemplo, peroxidasa y fosfatasa alcalina. Esta enzima es la que es capaz de generar un producto final cuantificable.

10.1. TIPOS DE TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS.

- a) ELISA directo: consiste en un antígeno que se encuentra inmovilizado en una superficie sólida y un anticuerpo conjugado a una enzima (Figura 22). La acción de esta enzima y la adición a posteriori del sustrato enzimático dará una señal que será traducida en intensidad de color y será la que se mida a la longitud de onda determinada.

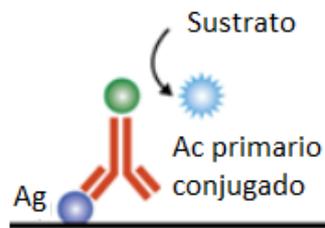


Figura 22. Estructura de ensayo directo¹⁶³.

- b) ELISA indirecto: consiste en sensibilizar una superficie sólida con un antígeno, a continuación, se disponen anticuerpos primarios y como tercera capa, anticuerpos secundarios conjugados con una enzima determinada (Figura 23). Mediante esta técnica se consigue ampliar la señal aportada ya que, por cada anticuerpo primario unido al antígeno, se pueden unir varios anticuerpos secundarios conjugados. La aplicación de sustrato enzimático será el que nos aporte la intensidad de señal una vez que entra en contacto con la enzima presente en el anticuerpo secundario.

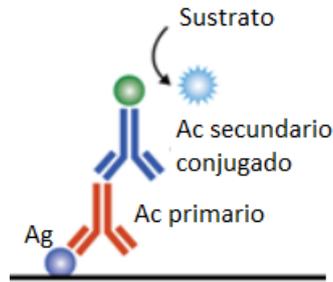


Figura 23. Estructura de ensayo indirecto¹⁶³.

- c) ELISA de inhibición o competición: en este caso puede ser un antígeno o un anticuerpo el que se encuentre inmovilizado en placa. A continuación, el antagonista del mismo será el que se someta a un paso intermedio de incubación con la muestra objeto de estudio (Figura 24). En el caso de que exista un antígeno inmovilizado en placa, la muestra podrá ser neutralizada o no con un anticuerpo dispuesto junto a la misma. Una vez que la mezcla de muestra + anticuerpo se disponga sobre la placa, aquella muestra negativa, no será neutralizada por los anticuerpos. De este modo, estos últimos reaccionarán frente al antígeno presente en la placa dando lugar a señal. En este caso, actúa de forma inversa que, en los tipos de ELISA anteriores, a más intensidad de señal, menor positividad de la muestra. Cuando una muestra sea positiva, el antígeno que presente será neutralizado por el anticuerpo. De este modo, una vez que se dispensen en placa, existirá poco o ningún anticuerpo libre para reaccionar frente al antígeno y, por tanto, la señal obtenida será menor.

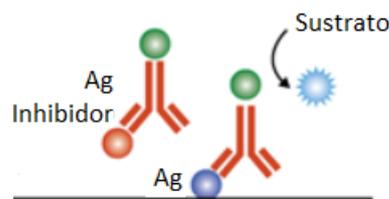


Figura 24. Estructura de ensayo de inhibición o competición¹⁶³.

- d) ELISA de captura o tipo sandwich: está compuesta por un anticuerpo de captura y un anticuerpo detector (Figura 25). Se establece una interacción anticuerpo-antígeno-anticuerpo. Este último será el que esté conjugado con una enzima determinada. Este sistema de captura aporta gran sensibilidad y especificidad ya que ambos anticuerpos son específicos frente al antígeno en cuestión. Se buscará el balance entre el anticuerpo sensibilizado en placa y el anticuerpo conjugado con el objetivo de obtener la mayor detección posible y, al mismo tiempo, una alta especificidad. Es el más usado para la detección de antígeno, aunque puede usarse también para detectar anticuerpos.

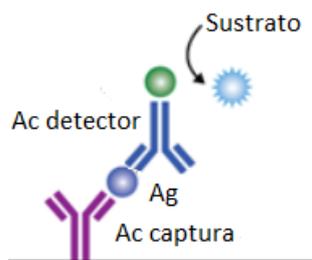


Figura 25. Estructura de ensayo de captura o tipo sandwich¹⁶³.

Y, teniendo como principio la técnica ELISA, el **inmunoensayo enzimático basado en quimioluminiscencia** (CLIA, por sus siglas en inglés: ChemiLuminescent Immuno Assay) busca aportar altas tasas de sensibilidad y especificidad con amplificación de señal. Asimismo, se obtienen resultados con mayor brevedad debido a la aplicación de periodos de incubación más reducidos. En la técnica ELISA se obtiene como producto final color gracias al sustrato cromógeno. En este caso, el producto final es luz, expresado en unidades relativas de luz (siglas en inglés RLU: relative light units). El término quimioluminiscencia se define como el fenómeno mediante el cual, en una reacción química, además de la liberación de energía en forma de calor, también se lleva a cabo en forma de luz. Para que la quimioluminiscencia entre en juego, se necesita de un catalizador como es la peroxidasa. La peroxidasa puede ser aislada de microorganismos, animales o plantas. El tipo de peroxidasa más empleada en inmunoensayos enzimáticos es la peroxidasa del rábano picante (*Armoracia rusticana* P.Gaertn., B.Mey. & Scherb.; Cruciferae). Esta es una hierba perenne resistente cultivada en regiones templadas de cuyas raíces se extrae la enzima. Es conocida también por sus siglas en inglés como HRP (**H**orse**R**adish **P**eroxidase)¹⁶⁴. Es una glicoproteína pequeña con 6 residuos de lisina y cuando se somete a una incubación con un sustrato enzimático adecuado, es capaz de proporcionar un producto colorimétrico, fluorimétrico o luminiscente. Su uso más común en inmunoensayos es formando parte de los conjugados permitiendo así la detección de los elementos que se han visto inmovilizados en una primera etapa de incubación. Los ensayos CLIA se caracterizan por aportar mayor sensibilidad, una velocidad de reacción más rápida y un rango dinámico más amplio que otros métodos, ya que mejoran y aumentan la linealidad y la capacidad discriminativa entre el fondo de la reacción y la señal proporcionada por el analito al no existir saturación en la lectura.

El luminol, 5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona, es el compuesto químico presente en este tipo de técnica y es el encargado de emitir luz cuando entra en contacto con un agente oxidante. Es soluble en disolventes polares como el dimetilsulfóxido y no es soluble en agua. En los inmunoensayos enzimáticos el agente oxidante empleado suele ser peróxido de hidrógeno, este se somete a la presencia de un catalizador, como puede ser ferricianuro de potasio o periodato potásico, y se descompone dando lugar a oxígeno y agua. El luminol reacciona con el ion hidrógeno dando un elemento denominado dianión que reacciona con el oxígeno resultante de la descomposición originando un peróxido inestable gracias a la pérdida de una molécula de nitrógeno.

Por último, los electrones excitados emiten un fotón de luz (Figura 26). La degradación de la luz generada se ve afectada por su exposición a temperatura y a la luz.



Figura 26. Reacción de quimioluminiscencia.
(Figura modificada de Mosley¹⁶⁵)

La peroxidasa de rábano picante necesita de la presencia de potenciadores en el sustrato con el objetivo de aumentar la intensidad de la reacción y obtener señales más estables y prolongadas en el tiempo¹⁶⁶. Muchos compuestos derivados de p-fenol pueden actuar como potenciadores de la señal de luminol como, por ejemplo, el imidazolfenol.

Con el objetivo de detectar el antígeno de GM en muestras biológicas de suero, plasma y LBA, se pretende desarrollar un ensayo de captura tipo sandwich (Figura 25). El sistema contará de un mAB inmovilizado en placa como elemento de captura y el mismo o distinto mAB conjugado como elemento detector. La enzima elegida para conjugar al mAB dispuesto en fase líquida es la peroxidasa de rábano picante (HRP) debido a que, tal y como está descrito en numerosos sistemas, con la biotina puede darse reacción inespecífica por encontrarse en alimentos y suplementos vitamínicos. Por otro lado, presenta mayor estabilidad y menor coste que la fosfatasa alcalina¹⁶⁷. Muchos ensayos inmunoenzimáticos recurren al uso del sistema biotina-estreptavidina con el objetivo de amplificar la señal de la reacción y conseguir mayor sensibilidad en el sistema. La biotina, perteneciente al grupo de vitaminas B, denominada también B7, con fórmula química $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ y peso molecular de 244,31 g/mol, actúa como coenzima de enzimas que intervienen en el metabolismo de aminoácidos, carbohidratos y grasas. El mayor inconveniente que se encuentra es su interferencia en ensayos inmunoenzimáticos basados en el sistema biotina-estreptavidina. Residuos de biotina sérica pueden competir con los elementos biotinilados del sistema, pudiéndose obtener resultados falsos positivos o falsos negativos¹⁶⁸⁻¹⁷⁰. Se ve cada vez más el crecimiento en el consumo de suplementos de biotina, ya sea bajo prescripción médica o consumo libre ya que no se requiere receta y su comercialización se da con frecuencia en tiendas.

10.2. POSIBLES CAUSAS DE LA OBTENCIÓN DE RESULTADOS FALSOS ASOCIADOS A LA TÉCNICA.

Además de los falsos positivos ocasionados a la reactividad cruzada que presenta el mAB utilizado en la técnica con otras especies de hongos que presentan GM en su pared y por el uso erróneo de la prueba, existen más factores que hacen que pueda verse reducida la especificidad.

Con gran frecuencia, productos derivados de los hongos son protagonistas de los falsos positivos. La piperacilina-tazobactam, amoxicilina y amoxicilina-clavulánico son antibióticos betalactámicos que pueden dar una elevada reacción cruzada con el mAB el cual va dirigido a la región 1-5-β-D-galactofuranosa. Estos antibióticos son compuestos semisintéticos derivados de compuestos naturales producidos por mohos del género *Penicillium*^{157,171}. La aparición de resultados falsos positivos en la técnica de detección de GM debido a tratamiento con antibióticos, relacionados con la pureza de los mismos, es una preocupación ya que puede dar lugar a exploraciones de tomografía computarizada y/o aplicación de tratamiento con agentes antifúngicos en vano.

Además de la reactividad cruzada con otras especies de hongos y la debida al tratamiento con antibióticos, otra fuente de falsos positivos, en pacientes con enfermedades hematológicas, es la administración de IGIV. Esta falsa positividad parece estar relacionada con la sacarosa presente en dichas soluciones que actúa como agente estabilizador¹⁷². Este tipo de resultados también se ven asociados a la aplicación de PLASMA-LYTE debido a su contenido en gluconato de sodio el cual se produce por fermentación por *Aspergillus niger*^{173,174}.

En el caso de pacientes hematológicos asintomáticos que reciben profilaxis contra el hongo pueden darse resultados falsos negativos. Esto es debido a que las tasas de GM circulante son menores. También se pueden obtener resultados falsos positivos en aquellos sobre los que se esté aplicando tratamiento con micafungina¹⁷⁵. Esta es empleada frecuentemente debido a su efectividad y la poca interacción con otros fármacos.

Otras fuentes de falsos positivos se asocia con la ingesta de alimentos contaminados y nutrición enteral (por ejemplo, la leche de vaca)¹⁷⁶, así como la presencia de bacterias de la microbiota humana donde se incluyen *Escherichia coli*, *Rhodococcus equi*, *Corynebacterium jeikeium* y *Bifidobacterium* spp. Estas presentan un residuo de galactofuranósido sobre el que puede reaccionar el mAB EB-A2¹⁵⁷.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Aunque se dispone de técnicas convencionales para el diagnóstico de aspergilosis invasiva por *Aspergillus fumigatus*, todas ellas presentan limitaciones por una sensibilidad insuficiente que conlleva un diagnóstico tardío. La presente investigación se ha planteado con la finalidad de desarrollar un procedimiento de diagnóstico fiable y rápido, para lo cual se ha elegido un inmunoensayo enzimático de captura tipo sandwich basado en quimioluminiscencia, capaz de capturar antígeno de galactomanano en muestras biológicas. Los objetivos concretos del presente estudio son los siguientes:

1. Obtener anticuerpos monoclonales reactivos frente a antígeno de galactomanano y caracterización de los mismos.
2. Diseñar y desarrollar un inmunoensayo enzimático de captura tipo sandwich basado en quimioluminiscencia para la detección de antígeno de galactomanano.
3. Presentar la técnica en un formato de monodosis automatizable para garantizar el procesamiento individualizado y precoz de las muestras biológicas.
4. Evaluar el rendimiento diagnóstico del kit desarrollado mediante un estudio comparativo frente a un kit comercial de ELISA.
5. Analizar las prestaciones analíticas del inmunoensayo enzimático que certifiquen su correcto funcionamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CEPAS DE HONGOS: GÉNEROS Y ESPECIES.

Las cepas de hongos que se han usado en la realización de este trabajo (Tabla 4) han sido adquiridas del Instituto Leibniz DSMZ - Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH (Braunschweig, Alemania) y de la National Collection of Pathogenic Fungi (NCPF) o Colección Nacional de Hongos Patógenos (Reino Unido).

La especie *Aspergillus fumigatus* se ha empleado como fuente de antígeno para la obtención de anticuerpos monoclonales procedentes de rata y el resto de las especies han sido objeto de estudio para analizar la reactividad cruzada del kit de diagnóstico diseñado.

Tabla 4. Cepas géneros y especies de hongos.

Microorganismo	Referencia	Origen
<i>Cladosporium</i> spp.	DSM 832	Instituto Leibniz
<i>Trichoderma virens</i>	DSM 1963	Instituto Leibniz
<i>Trichophyton interdigitale</i>	DSM 4870	Instituto Leibniz
<i>Aspergillus fumigatus</i>	DSM 819	Instituto Leibniz
<i>Aspergillus flavus</i>	DSM 1959	Instituto Leibniz
<i>Aspergillus niger</i>	DSM 1957	Instituto Leibniz
<i>Aspergillus terreus</i>	DSM 1958	Instituto Leibniz
<i>Penicillium digitatum</i>	DSM 2748	Instituto Leibniz
<i>Fusarium solani</i>	DSM 10696	Instituto Leibniz
<i>Fusarium oxysporum</i>	DSM 841	Instituto Leibniz
<i>Paecilomyces variotii</i>	DSM 1961	Instituto Leibniz
<i>Histoplasma capsulatum</i>	NCPF 4120	National Collection of Pathogenic Fungi (NCPF)
<i>Candida albicans</i>	NCPF 3153	National Collection of Pathogenic Fungi (NCPF)

2. MEDIO DE CULTIVO PARA HONGOS.

Los medios de cultivo empleados para el cultivo de los hongos han sido:

- Agar dextrosa Sabouraud: Ref. NCM0008A, casa comercial NEOGEN.
- Caldo dextrosa Sabouraud: Ref. NCM0147B, casa comercial NEOGEN.

Se usa en primer lugar el medio agar dextrosa Sabouraud y a continuación, con el producto resultante del mismo, se procede a la inoculación del medio líquido o caldo dextrosa Sabouraud.

3. ANTÍGENOS NATIVOS PURIFICADOS.

Los antígenos utilizados para la inmunización de ratas y para la evaluación de los hibridomas y/o anticuerpos monoclonales purificados se exponen a continuación (Tabla 5), así como el volumen y concentración final obtenida para cada uno de ellos.

Tabla 5. Antígenos nativos purificados.

Peso molecular	Volumen (ml)	Concentración
>440 kDa	31,4	0,25 mg/ml
440-75 kDa	25	0,59 mg/ml
75-29 kDa	27,8	0,54 mg/ml
<13 kDa	35	0,84 mg/ml
Glicoproteína	15,1	0,41 mg/ml

4. REACTIVOS.

Los reactivos usados, así como su referencia y la casa comercial donde han sido adquiridos, se presentan en la Tabla 6. Los procesos donde se emplean cada uno de ellos y la concentración a la que son preparados se describen en el Apartado 5. "Soluciones".

Tabla 6. Reactivos.

Reactivo	Referencia	Casa comercial
Cloruro de sodio	59888	Sigma-Aldrich
Cloruro de potasio	P3911	Sigma-Aldrich
Cloruro de calcio	C1016	Sigma-Aldrich
Cloruro de manganeso	M1787	Sigma-Aldrich
Cloruro de magnesio	M8266	Sigma-Aldrich
Fosfato de sodio	342483	Sigma-Aldrich
Fosfato de potasio	P3786	Sigma-Aldrich
Bicarbonato de sodio	S5761	Sigma-Aldrich
Carbonato de sodio	225530	Sigma-Aldrich
Tween 20	P1379	Sigma-Aldrich
Urea	U5378	Sigma-Aldrich
Tris	252859	Sigma-Aldrich
Ácido clorhídrico	320331	Sigma-Aldrich
Citrato de sodio	PHR1416	Supelco
Proclin® 300	48914-U	Sigma-Aldrich
Acetato de sodio	32318-1KG	Fluka
Periodato de sodio	311448	Sigma-Aldrich
Borohidruro de sodio	213462	Sigma-Aldrich
Trietanolamina	90279	Sigma-Aldrich
Glicina	410225	Sigma-Aldrich
Peroxidasa (POD) EIA	10814407001	Roche
Fenol	W322318	Sigma-Aldrich
Ácido sulfúrico	258105	Sigma-Aldrich
Ácido cítrico	251275	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sodio	S8045	Sigma-Aldrich

Reactivo	Referencia	Casa comercial
Ácido acético	1.60305	Sigma-Aldrich
Carboximetilcelulosa	A18105	Thermo Scientific
Polietilenglicol	81300-5KG	Sigma-Aldrich
Etilenglicol	324558	Sigma-Aldrich
Etanol	51976	Sigma-Aldrich
EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, clorhidrato)	E2247	Thermo Scientific
N-Acetil-D-glucosamina	A3286	Sigma-Aldrich
Tampón borato	11949292	Thermo Scientific
Azida sódica	199931	Sigma-Aldrich
Neolone®	725765	Sigma-Aldrich
Bronidox®	B8791	Sigma-Aldrich

5. SOLUCIONES.

Las soluciones requeridas por la metodología detallada en los siguientes apartados, se describen a continuación:

- Tampón fosfato salino (PBS): Contiene 8 g/l de cloruro de sodio (NaCl), 0,2 g/l de cloruro de potasio (KCl), 1,44 g/l de fosfato sódico (Na₂HPO₄) y 0,24 g/l de fosfato potásico (KH₂PO₄). Su pH final es de 7,2 ± 0,1.

- Tampón carbonato: Compuesto por 6 g/l de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) y 3 g/l de carbonato de sodio (NaCO₃). Su pH final es de 9,6 ± 0,1.

- Solución de lavado: Compuesto por tampón fosfato salino (PBS) con suplemento de Tween 20 al 0,05% (v/v).

- Solución conservante/bloqueante de microplacas: Adquirido comercialmente a Thermo Scientific, BSA Blocker™ (10X) en PBS Ref. 37525. Consiste en una solución con albúmina de suero bovino, conocida por sus siglas en inglés como BSA, purificada de alta calidad que suele emplearse diluida 1X en el mismo tampón que se presenta, PBS.

- Tampones conservantes/bloqueantes de microplacas de la casa comercial Surmodics:

Distintos tampones adquiridos de la casa comercial Surmodics (Tabla 7) son empleados con el objetivo de reducir las interacciones inespecíficas y garantizar la conservación de la microplaca.

Tabla 7. Tampones conservantes/bloqueantes de microplacas.

	Bloqueante 1	Bloqueante 2	Bloqueante 3	Bloqueante 4
Nombre	StabilCoat	StabilGuard	StabilGuard	StabilBlock
Referencia	SC01	SG01	SG02	ST01
Proteína	Bovina	Ninguna	Ninguna	Libre de BSA
Tampón	PBS	PBS	PBS	MOPS
Rango de pH	7,0-7,4	7,0-7,4	6,6-7,2	6,5-7,5

- Solución para dilución de anticuerpos secundarios conjugados: Preparado en el laboratorio, compuesto por tampón fosfato salino con suplemento de albúmina de suero bovino al 1% (p/v), Rocky Mountain Biologicals, Inc. Ref. BSA-BAF-1Kg. Empleado para la dilución de anticuerpos secundarios, ya estén conjugados o no con peroxidasa, en ensayos directos, indirectos y de captura.
- Tampones estabilizantes de anticuerpos conjugados de la casa comercial Surmodics:

Distintos tampones adquiridos de la casa comercial Surmodics (Tabla 8) son empleados con el objetivo de obtener elevadas tasas de discriminación entre muestras negativas y muestras positivas garantizando la conservación en formato líquido del anticuerpo monoclonal conjugado.

Tabla 8. Tampones estabilizantes de anticuerpos conjugados.

	Diluyente 1	Diluyente 2	Diluyente 3	Diluyente 4
Nombre	StabilZyme	StabilZyme Select	StabilZyme Noble	StabilZyme Protein-Free
Referencia	SZ02	SZ03	SZ04	SZPF
Proteína	Bovina	Bovina	Libre de BSA	Ninguna
Tampón	MOPS	Ninguno	MOPS	MOPS
Rango de pH	6,2-6,7	6,5-7,5	6,0-7,0	6,3-7,3

- Sustrato de CLIA: Fabricado en VIRCELL S.L. y empleado en los kits comerciales de VirClia, Ref. CLIA016 – CLIA017. Se compone de dos reactivos (A: luminol; B: peróxido de hidrógeno) que se combinan en proporción 1:1 justo antes de su incubación. Se emplea en los ensayos quimioluminiscentes directos, indirectos y de captura.
- Solución de disociación: Urea (NH_2CONH_2), preparada a 5 M, cloruro sódico 2,9 g/l, Tween 20 1ml/l, Proclin® 300 1ml/l, diluidos en tampón Tris-HCl 150 mM. Su pH es de $7,5 \pm 0,2$.
- Acetato sódico: Empleado en el protocolo de marcaje con peroxidasa. Acetato sódico ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$), diluido en agua destilada, a 1 mM. Su pH es de $4,4 \pm 0,1$.
- Periodato sódico: Empleado en el protocolo de marcaje con peroxidasa. Periodato sódico (NaIO_4) diluido en agua destilada a razón de 21,4 mg por cada ml.
- Borohidruro de sodio: Empleado en el protocolo de marcaje con peroxidasa. Borohidruro sódico (NaBH_4) diluido en agua destilada a razón de 7,6 mg por cada ml.
- Trietanolamina: Empleado en el protocolo de marcaje con peroxidasa. Trietanolamina (HOCH_2CH_2)₃N diluida en agua destilada a 2 M. Su pH es de $8,0 \pm 0,1$.
- Glicina: Empleado en el protocolo de marcaje con peroxidasa. Glicina

(NH₂CH₂COOH) diluida en agua destilada a 1 M. Su pH es de 7,0 ± 0,1.

- Fosfato de sodio: Empleado en el proceso de purificación de mAB. Fosfato de sodio (Na₃PO₄) diluido en agua destilada a 20 mM. Su pH es de 7,0 ± 0,1.
- Tris aminometano: Empleado en el proceso de purificación de mAB. Tris (hydroxymethyl) aminometano diluido en agua destilada a 1 M. El pH es ajustado a 9,0 ± 0,1 con solución HCl.
- Fosfato de sodio/Cloruro de sodio: Empleado en el proceso de purificación de mAB. Fosfato de sodio (Na₃PO₄) a 20 mM y cloruro de sodio (NaCl) a 150 mM, ambos diluidos en agua destilada. Su pH es de 7,2 ± 0,1.
- Glicina-HCl: Empleado en el proceso de purificación de mAB. Glicina (NH₂CH₂COOH) diluida en agua destilada a 0,1 M. El pH es ajustado a 2,7 ± 0,1 con solución HCl.
- Citrato de sodio: Empleado en el proceso de purificación de mAB. Citrato de sodio (HOC(COONa)(CH₂COONa)₂ · 2H₂O a 0,1 M. Su pH está entre 2,0-3,5 ± 0,1.
- Agua destilada: Ref. 0123, casa comercial B|BRAUN.

6. REACTIVOS Y MATERIAL EMPLEADO EN INMUNOENSAYOS.

Se describen a continuación los reactivos y materiales requeridos:

- Anticuerpo secundario anti-rata: Mouse monoclonal [KT100] Anti-Rat IgG+IgM light chain (HRP) Ref. AB106762, casa commercial Abcam.
- Estreptavidina conjugada con peroxidasa: Ref. SNN1004, casa comercial Invitrogen.
- Microplacas de inmunoensayo: Microplacas blancas de poliestireno aptas para reacciones de CLIA, constan de 96 pocillos de reacción.
 - a) HIGH BINDING, GREINER BIO-ONE Ref. 705092.
 - b) MEDIUM BINDING, GREINER BIO-ONE Ref. 705091.
 - c) MAXISORP, THERMO SCIENTIFIC Ref. 463201.
 - d) POLYSORP, THERMO SCIENTIFIC Ref. 463200.
- Lectinas biotinadas:
 - a) Biotinylated Lectin Kit I, Ref. BK-1000, casa comercial Vector Laboratories, Inc.
 - b) Biotinylated Lectin Kit, Ref. BK-2000, casa comercial Vector Laboratories, Inc.
 - c) Biotinylated Lectin Kit, Ref. BK-3000, casa comercial Vector Laboratories, Inc.

- Columna PD10 SEPHADEX G-25: Empleada en el protocolo de marcaje con peroxidasa. Las columnas comerciales adquiridas de Cytiva, Ref. 17085101, contienen resina Sephadex G-25 garantizando un rápido intercambio de tampones y la eliminación de contaminantes. Tiene capacidad para muestras entre 1,0 y 2,5 ml.

7. MATERIAL EMPLEADO EN PURIFICACIÓN Y CROMATOGRAFÍA.

A continuación, se describe el material empleado en el proceso de cromatografía por parte del Dpto. de Proteómica.

- Columna HiTrap Protein L: Empleada en el protocolo de purificación de mAB. Ref. 17547855, de la casa comercial Cytiva. Se presenta en 2 formatos, de 1 y 5 ml de capacidad. Este tipo de columna se utiliza en sistemas de cromatografía líquida (por ejemplo, el sistema ÄKTA™).
- Concanavalina A: Con-A Sepharose 4B, Ref. 17-0440-03, casa comercial Cytiva. Medio para cromatografía de afinidad. Según lo declarado por su fabricante, presenta alta afinidad para la captura de glicoproteínas y glicolípidos siendo más elevada para la α -D-glucosa que para la α -D-manosa.
- Sepharose 4B activado con CNBr: Ref. 17-0430-01, casa comercial Cytiva. Medio preactivado para acoplar anticuerpos u otras proteínas mediante grupos $-NH_2$.
- Aglutinina de germen de trigo: Wheat Germ Agglutinin, Ref. AL-1023, casa comercial Vector Laboratories, Inc. La aglutinina de germen de trigo se encuentra unida a agarosa. Es un medio para cromatografía de afinidad con especificidad frente a la N-acetilglucosamina.
- Partículas magnéticas: TANBead U-128 Magnetic Beads, Ref. U-128, casa comercial TAN Bead. Presentan un núcleo interno de Fe_3O_4 y una capa exterior de SiO_2 . La superficie de sílice se encuentra modificada con un grupo carboxilo y se puede acoplar covalentemente con biomoléculas. Son presentadas en solución acuosa con un tamaño de 500 nm y a una concentración de 200 mg/ml.
- Cromatógrafos para la purificación de proteínas por FPLC en el sistema ÄKTA de GE Healthcare.
 - a) ÄKTA Modelo EXPLORER, casa comercial Cytiva, N/S 01154224
 - b) ÄKTA Modelo PURE, casa comercial Cytiva, N/S 2179112
- Columna HiLoad 16/60 Superdex 200 pg: Ref. CRO0054, casa comercial GE Healthcare. Destinada a cromatografía de exclusión por tamaño.

- Columna Concanavalina A: Ref. 28-9520-85, casa comercial GE Healthcare. Destinada a cromatografía de afinidad.
- Membrana de diálisis: membrana de celulosa, Sigma-Aldrich Ref. D9652, con capacidad para retener proteínas de peso molecular 12000 o más Da. Es una membrana de diálisis semipermeable que se presenta en formato de tubo, mediante la misma se permite la eliminación de solutos de bajo peso molecular teniendo en cuenta el cut off definido para cada una de ellas consiguiendo también el equilibrio mediante una solución tamponada.
- Matraz Kitasato y Erlenmeyer.
- Filtro de jeringa: con un tamaño de poro de 0,45 μm y con PVDF como material de la membrana. Presenta baja capacidad de unión a proteínas. Adquirido de la casa comercial Fisher Scientific, Ref. 15191499.

8. MUESTRAS BIOLÓGICAS DE GALACTOMANANO.

Se muestran a continuación las muestras biológicas destinadas a la optimización y desarrollo de la técnica de CLIA (Tabla 9) y las empleadas en la validación diagnóstica del kit desarrollado (estudio interno Tabla 10 y estudio externo Tabla 11).

- Ensayos optimización de la técnica:

Se realizan ensayos de captura tipo sandwich para definir las condiciones de uso del anticuerpo de captura y del anticuerpo detector, así como la evaluación de la automatización de la técnica. La identificación de cada muestra de suero viene asociada con su clasificación según los resultados obtenidos por la técnica ELISA de Bio-Rad (Tabla 9).

Tabla 9. Muestras biológicas empleadas en la optimización de la técnica.

Identificación muestra	Clasificación según Bio-Rad	Identificación muestra	Clasificación según Bio-Rad
44200	Negativo	A-83-045	Negativo
61200	Negativo	A-83-046	Negativo
62400	Negativo	A-83-047	Negativo
78600	Negativo	A-83-048	Negativo
8325133	Negativo	A-83-049	Negativo
8325139	Negativo	A-83-050	Negativo
8325159	Negativo	A-83-051	Negativo
8325798	Negativo	A-83-052	Negativo
8325803	Negativo	A-83-053	Negativo
8325836	Negativo	A-83-054	Negativo
8325858	Negativo	W41781600420400	Negativo

MATERIAL Y MÉTODOS

Identificación muestra	Clasificación según Bio-Rad	Identificación muestra	Clasificación según Bio-Rad
8328450	Negativo	W41781600455400	Negativo
8395461	Negativo	w41781600503600	Negativo
8395776	Negativo	W41781600516300	Negativo
8395783	Negativo	41800	Positivo
8395806	Negativo	72800	Positivo
A-109-076	Negativo	96800	Positivo
A-109-093	Negativo	97600	Positivo
A-109-095	Negativo	8325132	Positivo
A-110-001	Negativo	8325137	Positivo
A-110-005	Negativo	8325148	Positivo
A-120-023	Negativo	8325169	Positivo
A-120-027	Negativo	8325832	Positivo
A-122-021	Negativo	8325854	Positivo
A-122-023	Negativo	8328398	Positivo
A-122-025	Negativo	8328427	Positivo
A-122-027	Negativo	8328436	Positivo
A-83-007	Negativo	8328441	Positivo
A-83-008	Negativo	8395782	Positivo
A-83-009	Negativo	8395808	Positivo
A-83-010	Negativo	A-109-097	Positivo
A-83-011	Negativo	A-120-025	Positivo
A-83-012	Negativo	A-120-066	Positivo
A-83-013	Negativo	A-120-074	Positivo
A-83-014	Negativo	A-120-078	Positivo
A-83-015	Negativo	A-120-088	Positivo
A-83-016	Negativo	A-120-092	Positivo
A-83-017	Negativo	A-121-012	Positivo
A-83-018	Negativo	A-121-030	Positivo
A-83-019	Negativo	A-121-057	Positivo
A-83-020	Negativo	A-122-031	Positivo
A-83-021	Negativo	A-122-033	Positivo
A-83-022	Negativo	A-122-035	Positivo
A-83-035	Negativo	A-90-026	Positivo
A-83-036	Negativo	A-90-027	Positivo
A-83-037	Negativo	A-90-028	Positivo
A-83-038	Negativo	A-90-029	Positivo
A-83-039	Negativo	A-90-030	Positivo
A-83-040	Negativo	w41781600741800	Positivo
A-83-041	Negativo	w41781600781300	Positivo

Identificación muestra	Clasificación según Bio-Rad	Identificación muestra	Clasificación según Bio-Rad
A-83-042	Negativo	w41781600796800	Positivo
A-83-043	Negativo	w41781600797600	Positivo
A-83-044	Negativo		

- Estudio interno:

Muestras empleadas en la evaluación del rendimiento diagnóstico del kit de VIRCLIA realizada en VIRCELL S.L. (Tabla 10). El número de identificación de la muestra se relaciona con el tipo de matriz y su origen.

Tabla 10. Muestras biológicas empleadas en el estudio interno para el análisis del rendimiento diagnóstico.

LBA: Lavado BroncoAlveolar; ANNAR: ANNAR Health Technologies, Colombia; BIOMNIS: Eurofins Biomnis, Francia; CERBA: Cerba Research, Bélgica; DISCOVERY LIFE SCIENCES: Discovery Life Sciences, Biomarker Services GmbH, Alemania; FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ: Hospital Universitario Jiménez Díaz, Madrid; H2B: SEQENS In Vitro Diagnostics, Francia; H. GREGORIO MARAÑÓN: Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid; H. VIRGEN DE LAS NIEVES: Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada; H. LA PAZ: Hospital Universitario La Paz, Madrid; H. VALL D'HEBRON: Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona; H. PUERTA DE HIERRO: Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Madrid; H. DE CONXO: Hospital Provincial de Conxo, Santiago de Compostela, Galicia; H. LA FE VALENCIA: Hospital Universitario y Politécnico de La Fe, Valencia; H. SAN JOAN DE DEU: Hospital de Sant Joan de Déu, Barcelona; TRINA: TRINA BIOREACTIVES AG, Suiza.

Nº	Nº MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
1	R-317-034	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
2	R-317-042	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
3	R-317-061/063	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
4	R-317-068	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
5	R-317-069 R-317-070	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
6	R-321-066/071	LBA	H.VIRGEN DE LAS NIEVES
7	R-321-072/79	LBA	TRINA
8	R-321-080/86	LBA	TRINA
9	R-321-087/100	LBA	TRINA
10	R-322-036/040-R319-092	LBA	CERBA
11	R-322-046/049-R318-094	LBA	CERBA
12	R-322-054/061-R318-096	LBA	CERBA
13	R-322-074/087-R318-098	LBA	CERBA
14	R-322-088/091-R318-099	LBA	CERBA
15	R-323-003/010-R319-002	LBA	CERBA
16	R-323-011/022-R319-003	LBA	CERBA
17	R-323-023/025-R319-004	LBA	CERBA
18	R-406-040	LBA	BIOMNIS
19	R-406-041	LBA	BIOMNIS
20	R-406-042	LBA	BIOMNIS
21	R-407-040	LBA	CERBA
22	R-407-041	LBA	CERBA
23	R-407-042	LBA	CERBA
24	R-407-084	LBA	H. LA PAZ

MATERIAL Y MÉTODOS

Nº	Nº MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
25	R-408-014	LBA	H. VALL D'HEBRON
26	R-408-015	LBA	H. VALL D'HEBRON
27	R-408-016	LBA	H. VALL D'HEBRON
28	R-408-017	LBA	H. VALL D'HEBRON
29	R-408-019	LBA	H. VALL D'HEBRON
30	R-408-023	LBA	H. VALL D'HEBRON
31	R-408-027	LBA	ITALIA (ALIFAX)
32	R-408-028	LBA	ITALIA (ALIFAX)
33	R-408-029	LBA	ITALIA (ALIFAX)
34	R-408-030	LBA	ITALIA (ALIFAX)
35	R-408-031	LBA	ITALIA (ALIFAX)
36	R-408-032	LBA	ITALIA (ALIFAX)
37	R-407-085	SUERO	H. LA PAZ
38	R-317-093 R-317-094	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
39	R-397-078/082 R-291-038/039	SUERO	H. PUERTA DE HIERRO
40	R-408-006	SUERO	H. VALL D'HEBRON
41	R-397-073/077 R-291-033/034	SUERO	H. PUERTA DE HIERRO
42	R-318-052	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
43	R-318-044	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
44	R-318-057	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
45	R-318-038	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
46	R-318-058	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
47	R-318-040	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
48	R-318-028	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
49	R-318-048	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
50	R-318-022	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
51	R-318-029	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
52	R-318-020	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
53	R-318-046	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
54	R-318-023	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
55	R-318-045	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
56	R-318-037	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
57	R-317-100 R-318-001	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
58	R-318-021	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
59	R-318-041	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
60	R-318-008 R-318-009	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
61	R-318-010	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
62	R-318-059	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
63	R-318-031	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
64	R-318-027	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
65	R-318-014	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
66	R-318-016	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
67	R-318-024	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

MATERIAL Y MÉTODOS

Nº	Nº MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
68	R-317-089 R-317-090	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
69	R-318-019	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
70	R-318-054	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
71	R-318-030	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
72	R-317-079 R-317-080	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
73	R-318-002 R-318-003	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
74	R-317-098 R-317-099	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
75	R-318-047	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
76	R-318-075 R-318-076	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
77	R-318-049	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
78	R-318-013	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
79	R-318-034	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
80	R-317-095/097	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
81	R-318-043	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
82	R-318-011 R-318-012	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
83	R-318-018	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
84	R-318-077 R-318-078	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
85	R-318-026	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
86	R-318-051	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
87	R-317-087 R-317-088	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
88	R-318-072 R-318-073	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
89	R-318-042	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
90	R-321-055/065	SUERO	H.VIRGEN DE LAS NIEVES
91	R-318-056	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
92	R-318-050	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
93	R-318-004	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
94	R-408-004	SUERO	H. VALL D'HEBRON
95	R-318-079	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
96	R-317-081 R-317-082	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
97	R-318-032	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
98	R-317-083 R-317-084	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
99	R-408-007	SUERO	H. VALL D'HEBRON
100	R-318-005/007	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
101	R-320-055/058	SUERO	H. VALL D'HEBRON
102	R-397-070/072 R-291-027/028	SUERO	H. PUERTA DE HIERRO
103	R-318-025	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
104	R-398-003/005 R-291-054	SUERO	H. PUERTA DE HIERRO
105	R-397-097/398-002 R-291-051/052	SUERO	H. PUERTA DE HIERRO
106	R-408-001	SUERO	H. VALL D'HEBRON
107	R-319-020/022	SUERO	H. VALL D'HEBRON
108	R-397-067/069 R-291-025/026	SUERO	H. PUERTA DE HIERRO
109	R-320-071/074	SUERO	H. VALL D'HEBRON
110	R-322-020/025-R318-090	SUERO	CERBA

MATERIAL Y MÉTODOS

Nº	Nº MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
111	R-320-062/065	SUERO	H. VALL D'HEBRON
112	R-322-007/011-R318-088	SUERO	CERBA
113	R-322-050/053-R318-095	SUERO	CERBA
114	R-408-021	SUERO	H. VALL D'HEBRON
115	R-321-044/047 R-321-048/054	SUERO	H.VIRGEN DE LAS NIEVES
116	R-319-092/094	SUERO	H. VALL D'HEBRON
117	R-322-001/006-R318-087	SUERO	CERBA
118	R-322-041/045-R318-093	SUERO	CERBA
119	R-319-012/014	SUERO	H. VALL D'HEBRON
120	R-322-099-100/323-002-R319-001	SUERO	CERBA
121	R-397-084/091 R-291-041/042	SUERO	H. VALL D'HEBRON
122	R-317-085 R-317-086	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
123	R-408-022	SUERO	H. VALL D'HEBRON
124	R-398-006/013	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
125	R-407-076	SUERO	H. LA PAZ
126	R-318-035	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
127	R-407-075	SUERO	H. LA PAZ
128	R-318-017	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
129	R-322-092/098-R-318-100	SUERO	CERBA
130	R-320-052/054	SUERO	H. VALL D'HEBRON
131	R-318-036	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
132	R-322-012/019-R318-089	SUERO	CERBA
133	R-317-091 R-317-092	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
134	R-408-025	SUERO	H. VALL D'HEBRON
135	R-320-039/043	SUERO	H. VALL D'HEBRON
136	R-319-098/100	SUERO	H. VALL D'HEBRON
137	R-320-044/047	SUERO	H. VALL D'HEBRON
138	R-407-074	SUERO	H. LA PAZ
139	R-406-076	SUERO	BIOMNIS
140	R-321-017/031	SUERO	H.VIRGEN DE LAS NIEVES
141	R-319-067/072	SUERO	H. VALL D'HEBRON
142	R-406-061	SUERO	BIOMNIS
143	R-407-065	SUERO	H. LA PAZ
144	R-406-044	SUERO	BIOMNIS
145	R-406-045	SUERO	BIOMNIS
146	R-406-089	SUERO	BIOMNIS
147	R-406-081	SUERO	BIOMNIS
148	R-406-057	SUERO	BIOMNIS
149	R-406-043	SUERO	BIOMNIS
150	R-406-047	SUERO	BIOMNIS
151	R-406-059	SUERO	BIOMNIS
152	R-406-046	SUERO	BIOMNIS
153	R-406-048	SUERO	BIOMNIS

MATERIAL Y MÉTODOS

Nº	Nº MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
154	R-406-085	SUERO	BIOMNIS
155	R-406-084	SUERO	BIOMNIS
156	R-406-087	SUERO	BIOMNIS
157	R-320-021/024	SUERO	H. VALL D'HEBRON
158	R-407-083	SUERO	H. LA PAZ
159	R-406-056	SUERO	BIOMNIS
160	R-406-053	SUERO	BIOMNIS
161	R-406-072	SUERO	BIOMNIS
162	R-406-073	SUERO	BIOMNIS
163	R-406-058	SUERO	BIOMNIS
164	R-406-064	SUERO	BIOMNIS
165	R-406-080	SUERO	BIOMNIS
166	R-406-052	SUERO	BIOMNIS
167	R-406-049	SUERO	BIOMNIS
168	R-401-056/070	SUERO	H.VIRGEN DE LAS NIEVES
169	R-406-054	SUERO	BIOMNIS
170	R-406-071	SUERO	BIOMNIS
171	R-406-082	SUERO	BIOMNIS
172	R-406-066	SUERO	BIOMNIS
173	R-406-051	SUERO	BIOMNIS
174	R-406-060	SUERO	BIOMNIS
175	R-406-075	SUERO	BIOMNIS
176	R-320-033/038	SUERO	H. VALL D'HEBRON
177	R-406-074	SUERO	BIOMNIS
178	R-406-077	SUERO	BIOMNIS
179	R-406-068	SUERO	BIOMNIS
180	R-406-070	SUERO	BIOMNIS
181	R-406-055	SUERO	BIOMNIS
182	R-318-015	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
183	R-406-050	SUERO	BIOMNIS
184	R-406-065	SUERO	BIOMNIS
185	R-406-083	SUERO	BIOMNIS
186	R-406-086	SUERO	BIOMNIS
187	R-406-078	SUERO	BIOMNIS
188	R-406-062	SUERO	BIOMNIS
189	R-406-067	SUERO	BIOMNIS
190	R-406-069	SUERO	BIOMNIS
191	R-407-088	SUERO	H. LA PAZ
192	R-407-086	SUERO	H. LA PAZ
193	R-318-082	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
194	R-318-086	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
195	R-287-074	SUERO	H. DE CONXO
196	R-318-083	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

MATERIAL Y MÉTODOS

Nº	Nº MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
197	R-279-088	SUERO	H. LA FE VALENCIA
198	R-296-091	SUERO	ANNAR
199	R-296-088	SUERO	ANNAR
200	R-320-007/010	SUERO	H. VALL D'HEBRON
201	R-320-025/028	SUERO	H. VALL D'HEBRON
202	R-319-058/061	SUERO	H. VALL D'HEBRON
203	R-279-087	SUERO	H. LA FE VALENCIA
204	R-290-002	SUERO	H. SAN JOAN DE DEU
205	R-320-048/051	SUERO	H. VALL D'HEBRON
206	R-290-003	SUERO	H. SAN JOAN DE DEU
207	R-320-029/032	SUERO	H. VALL D'HEBRON
208	R-279-091	SUERO	H. LA FE VALENCIA
209	R-319-049/052	SUERO	H. VALL D'HEBRON
210	R-296-090	SUERO	ANNAR
211	R-288-047	SUERO	H. SAN JOAN DE DEU
212	R-407-069	SUERO	H. LA PAZ
213	R-279-090	SUERO	H. LA FE VALENCIA
214	R-279-086	SUERO	H. LA FE VALENCIA
215	R-319-042/045	SUERO	H. VALL D'HEBRON
216	R-279-089	SUERO	H. LA FE VALENCIA
217	R-281-075	SUERO	H. DE CONXO
218	R-281-076	SUERO	H. DE CONXO
219	R-281-077	SUERO	H. DE CONXO
220	R-287-070	SUERO	H. DE CONXO
221	R-287-071	SUERO	H. DE CONXO
222	R-287-072	SUERO	H. DE CONXO
223	R-287-075	SUERO	H. DE CONXO
224	R-287-076	SUERO	H. DE CONXO
225	R-288-048	SUERO	H. SAN JOAN DE DEU
226	R-288-051	SUERO	H. SAN JOAN DE DEU
227	R-289-100	SUERO	H. SAN JOAN DE DEU
228	R-290-001	SUERO	H. SAN JOAN DE DEU
229	R-291-046	SUERO	H. PUERTA DE HIERRO
230	R-316-001	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
231	R-316-002	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
232	R-316-003	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
233	R-316-004	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
234	R-316-005	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
235	R-316-006	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
236	R-316-007	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
237	R-316-008	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
238	R-316-009	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
239	R-316-010	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN

MATERIAL Y MÉTODOS

Nº	Nº MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
240	R-316-011	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
241	R-316-012	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
242	R-316-013	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
243	R-316-014	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
244	R-316-015	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
245	R-316-016	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
246	R-316-017	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
247	R-316-018	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
248	R-316-019	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
249	R-316-020	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
250	R-316-021	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
251	R-316-022	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
252	R-316-023	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
253	R-316-024	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
254	R-316-025	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
255	R-316-026	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
256	R-316-027	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
257	R-316-028	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
258	R-316-029	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
259	R-316-030	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
260	R-316-031	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
261	R-316-032	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
262	R-316-033	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
263	R-316-035	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
264	R-316-036	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
265	R-316-037	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
266	R-316-038	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
267	R-316-039	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
268	R-316-040	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
269	R-316-042	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
270	R-316-043	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
271	R-316-045	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
272	R-316-047	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
273	R-316-049	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
274	R-316-050	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
275	R-316-053	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
276	R-316-054	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
277	R-316-057	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
278	R-316-058	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
279	R-316-059	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
280	R-316-061	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
281	R-316-062	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
282	R-316-063	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN

MATERIAL Y MÉTODOS

Nº	Nº MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
283	R-316-065	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
284	R-316-067	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
285	R-316-068	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
286	R-316-069	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
287	R-316-071	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
288	R-316-072	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
289	R-316-073	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
290	R-316-074	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
291	R-316-076	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
292	R-316-077	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
293	R-316-078	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
294	R-316-079	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
295	R-316-080	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
296	R-316-081	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
297	R-316-083	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
298	R-316-086	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
299	R-316-088	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
300	R-316-089	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
301	R-316-091	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
302	R-316-093	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
303	R-316-094	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
304	R-316-095	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
305	R-316-096	SUERO	H. LA PAZ
306	R-316-097	SUERO	H. LA PAZ
307	R-316-099	SUERO	H. LA PAZ
308	R-316-100	SUERO	H. LA PAZ
309	R-317-001	SUERO	H. LA PAZ
310	R-317-003	SUERO	H. LA PAZ
311	R-317-005	SUERO	H. LA PAZ
312	R-317-007	SUERO	H. LA PAZ
313	R-318-039	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
314	R-318-053	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
315	R-318-055	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
316	R-318-060	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
317	R-318-074	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
318	R-318-080	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
319	R-318-084	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
320	R-318-085	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
321	R-319-008/009	SUERO	H. VALL D'HEBRON
322	R-319-017/018	SUERO	H. VALL D'HEBRON
323	R-319-026/028	SUERO	H. VALL D'HEBRON
324	R-319-029/030	SUERO	H. VALL D'HEBRON
325	R-319-032/033	SUERO	H. VALL D'HEBRON

MATERIAL Y MÉTODOS

Nº	Nº MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
326	R-319-034/036	SUERO	H. VALL D'HEBRON
327	R-319-037/039	SUERO	H. VALL D'HEBRON
328	R-319-040/041	SUERO	H. VALL D'HEBRON
329	R-319-046/048	SUERO	H. VALL D'HEBRON
330	R-319-056/057	SUERO	H. VALL D'HEBRON
331	R-319-073/074	SUERO	H. VALL D'HEBRON
332	R-319-075/076	SUERO	H. VALL D'HEBRON
333	R-319-077/078	SUERO	H. VALL D'HEBRON
334	R-319-079/080	SUERO	H. VALL D'HEBRON
335	R-319-081/082	SUERO	H. VALL D'HEBRON
336	R-319-086/088	SUERO	H. VALL D'HEBRON
337	R-320-004/006	SUERO	H. VALL D'HEBRON
338	R-320-011/013	SUERO	H. VALL D'HEBRON
339	R-320-014/015	SUERO	H. VALL D'HEBRON
340	R-320-068/070	SUERO	H. VALL D'HEBRON
341	R-320-096/097	SUERO	H. VALL D'HEBRON
342	R-407-067	SUERO	H. LA PAZ
343	R-407-068	SUERO	H. LA PAZ
344	R-407-070	SUERO	H. LA PAZ
345	R-407-071	SUERO	H. LA PAZ
346	R-407-073	SUERO	H. LA PAZ
347	R-407-077	SUERO	H. LA PAZ
348	R-407-078	SUERO	H. LA PAZ
349	R-407-080	SUERO	H. LA PAZ
350	R-407-081	SUERO	H. LA PAZ
351	R-407-089	SUERO	H. LA PAZ
352	R-407-091	SUERO	H. LA PAZ
353	R-408-009	SUERO	H. VALL D'HEBRON
354	R-408-010	SUERO	H. VALL D'HEBRON
355	R-408-020	SUERO	H. VALL D'HEBRON
356	R-318-066	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
357	R-317-037	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
358	R-317-066	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
359	R-317-072	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
360	R-317-038	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
361	R-317-056	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
362	R-318-068	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
363	R-317-033	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
364	R-317-015	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
365	R-317-016	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
366	R-317-017	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
367	R-317-018	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
368	R-317-020	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN

MATERIAL Y MÉTODOS

Nº	Nº MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
369	R-317-021	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
370	R-317-022	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
371	R-317-023	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
372	R-317-024	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
373	R-317-025	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
374	R-317-026	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
375	R-317-027	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
376	R-317-011	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
377	R-317-012	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
378	R-317-008	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
379	R-317-009	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
380	R-317-010	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
381	R-289-099	LBA	H. SAN JOAN DE DEU
382	R-320-077/078	LBA	H. VALL D'HEBRON
383	R-320-079/080	LBA	H. VALL D'HEBRON
384	R-320-081/082	LBA	H. VALL D'HEBRON
385	R-320-083/084	LBA	H. VALL D'HEBRON
386	R-320-085/086	LBA	H. VALL D'HEBRON
387	R-320-087/088	LBA	H. VALL D'HEBRON
388	R-320-089/091	LBA	H. VALL D'HEBRON
389	R-320-092/093	LBA	H. VALL D'HEBRON
390	R-320-098/100	LBA	H. VALL D'HEBRON
391	R-408-011	LBA	H. VALL D'HEBRON
392	R-408-012	LBA	H. VALL D'HEBRON
393	R-408-013	LBA	H. VALL D'HEBRON
394	R-408-018	LBA	H. VALL D'HEBRON
395	R-408-002	LBA	H. VALL D'HEBRON
396	R-318-062	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
397	R-318-063	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
398	R-318-067	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
399	R-318-069	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
400	R-318-071	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
401	R-319-083	SUERO	H. VALL D'HEBRON
402	R-319-089	SUERO	H. VALL D'HEBRON
403	R-319-095	SUERO	H. VALL D'HEBRON
404	R-320-001	SUERO	H. VALL D'HEBRON
405	R-321-002	SUERO	H. VALL D'HEBRON
406	R-321-005	SUERO	H. VALL D'HEBRON
407	R-321-007	LBA	H. VALL D'HEBRON
408	R-321-009	LBA	H. VALL D'HEBRON
409	R-321-013	LBA	H. VALL D'HEBRON
410	R-321-015	LBA	H. VALL D'HEBRON
411	R-321-034	LBA	H. VALL D'HEBRON

MATERIAL Y MÉTODOS

Nº	Nº MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
412	R-322-026	SUERO	CERBA
413	R-322-062	SUERO	CERBA
414	R-397-091	SUERO	H. PUERTA DE HIERRO
415	R-401-071	SUERO	H.VIRGEN DE LAS NIEVES
416	R-401-079	SUERO	H.VIRGEN DE LAS NIEVES
417	R-409-038	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
418	R-409-039	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
419	R-409-040	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
420	R-409-041	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
421	R-409-042	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
422	R-409-043	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
423	R-409-044	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
424	R-409-045	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
425	R-409-046	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
426	R-409-047	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
427	R-409-048	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
428	R-409-049	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
429	R-409-050	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
430	R-409-051	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
431	R-409-052	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
432	R-409-053	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
433	R-409-054	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
434	R-409-056	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
435	R-409-057	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
436	R-409-058	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
437	R-409-059	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
438	R-409-060	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
439	R-409-061	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
440	R-409-063	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
441	R-409-064	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
442	R-409-066	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
443	R-409-067	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
444	R-409-068	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
445	R-409-069	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
446	R-409-070	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
447	R-409-071	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
448	R-409-072	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
449	R-409-073	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
450	R-409-074	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
451	R-409-075	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
452	R-409-076	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
453	R-409-077	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
454	R-409-078	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES

MATERIAL Y MÉTODOS

Nº	Nº MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
455	R-409-079	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES
456	R-296-087	SUERO	ANNAR
457	R-296-089	SUERO	ANNAR
458	R-296-092	SUERO	ANNAR
459	R-317-014	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
460	R-317-029	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
461	R-317-030	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
462	R-317-039	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
463	R-317-045	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
464	R-317-046	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
465	R-317-049	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
466	R-317-054	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
467	R-317-057	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
468	R-317-071	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
469	R-317-074	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
470	R-317-076	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
471	R-317-077	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
472	R-412-042	SUERO	H. VALL D'HEBRON
473	R-412-043	SUERO	H. VALL D'HEBRON
474	R-412-045	SUERO	H. VALL D'HEBRON
475	R-412-046	SUERO	H. VALL D'HEBRON
476	R-412-047	SUERO	H. VALL D'HEBRON
477	R-412-048	SUERO	H. VALL D'HEBRON
478	R-412-049	SUERO	H. VALL D'HEBRON
479	R-412-050	SUERO	H. VALL D'HEBRON
480	R-412-051	SUERO	H. VALL D'HEBRON
481	R-412-052	SUERO	H. VALL D'HEBRON
482	R-412-053	SUERO	H. VALL D'HEBRON
483	R-412-054	SUERO	H. VALL D'HEBRON
484	R-412-055	SUERO	H. VALL D'HEBRON
485	R-412-056	SUERO	H. VALL D'HEBRON
486	R-412-057	SUERO	H. VALL D'HEBRON
487	R-412-058	SUERO	H. VALL D'HEBRON
488	R-412-059	SUERO	H. VALL D'HEBRON
489	R-412-060	SUERO	H. VALL D'HEBRON
490	A-126-001	PLASMA	H2B
491	A-126-002	PLASMA	H2B
492	A-126-003	PLASMA	H2B
493	A-126-004	PLASMA	H2B
494	A-126-005	PLASMA	H2B
495	A-126-006	PLASMA	H2B
496	A-126-007	PLASMA	H2B
497	A-126-008	PLASMA	H2B

Nº	Nº MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
498	A-126-009	PLASMA	H2B
499	A-126-010	PLASMA	H2B
500	A-126-014	PLASMA	H2B
501	A-126-018	PLASMA	H2B
502	A-126-019	PLASMA	H2B
503	A-126-020	PLASMA	H2B
504	A-126-021	PLASMA	H2B
505	A-126-022	PLASMA	H2B
506	A-126-023	PLASMA	H2B
507	A-126-024	PLASMA	H2B
508	A-126-025	PLASMA	H2B
509	A-126-026	PLASMA	H2B
510	A-126-027	PLASMA	H2B
511	A-126-028	PLASMA	H2B
512	A-126-029	PLASMA	H2B
513	R-316-034	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
514	R-317-028	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
515	R-319-062/067	SUERO	H. VALL D'HEBRON
516	R-321-004	LBA	H. VALL D'HEBRON
517	R-406-079	SUERO	BIOMNIS
518	R-409-055	LBA	DISCOVERY LIFE SCIENCES

- Estudio externo:

Muestras empleadas en la evaluación del rendimiento diagnóstico del kit de VIRCLIA realizada en el Hospital Gregorio Marañón, Fundación Jiménez Díaz y Hospital La Paz (Tabla 11). El número de identificación de la muestra se relaciona con el tipo de matriz y su origen.

Tabla 11. Muestras biológicas empleadas en el estudio externo para el análisis del rendimiento diagnóstico.

LBA: Lavado BroncoAlveolar; FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ: Hospital Universitario Jiménez Díaz, Madrid; H. GREGORIO MARAÑÓN: Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid; H. LA PAZ: Hospital Universitario La Paz, Madrid.

Nº	Nª MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
1	4007849	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
2	4008968	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
3	4008973	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
4	4010385	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
5	4010392	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
6	4010395	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
7	4010398	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
8	4010814	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
9	50978761	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
10	4010441	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
11	4011413	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

Nº	Nª MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
12	4011735	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
13	4011752	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
14	4012876	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
15	4013033	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
16	4013305	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
17	4013492	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
18	4014723	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
19	4014725	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
20	4014727	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
21	4014733	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
22	4014736	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
23	4014740	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
24	4014969	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
25	4016839	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
26	4016840	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
27	4017231	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
28	4018064	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
29	4018067	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
30	4018070	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
31	4018076	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
32	4018283	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
33	4019539	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
34	4019559	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
35	4019569	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
36	4021206	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
37	4021220	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
38	4021267	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
39	4021478	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
40	4021479	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
41	50103017	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
42	85169747	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
43	4024687	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
44	70990178	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
45	4024688	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
46	70989807	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
47	4028296	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
48	4028306	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
49	4028092	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
50	90151610	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
51	4025334	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
52	90151608	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
53	4026646	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
54	4026557	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

Nº	Nª MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
55	4028290	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
56	4026554	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
57	4028432	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
58	4027587	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
59	4025621	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
60	4025597	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
61	37117244	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
62	4029872	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
63	4029867	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
64	4029680	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
65	40137468	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
66	4031237	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
67	4030150	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
68	4026920	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
69	4032780	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
70	4033828	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
71	4032344	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
72	4032352	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
73	4032347	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
74	4032695	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
75	4032698	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
76	4035642	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
77	4035641	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
78	4032697	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
79	80528398	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
80	4036946	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
81	4037019	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
82	4037020	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
83	22172110	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
84	4038312	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
85	4042322	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
86	90151631	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
87	4039321	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
88	4039318	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
89	4042443	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
90	4039324	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
91	4040009	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
92	50983569	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
93	4042052	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
94	4042050	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
95	4038311	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
96	4040977	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
97	4040966	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

Nº	Nº MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
98	4045204	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
99	60296572	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
100	36377769	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
101	4045064	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
102	4044942	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
103	4047087	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
104	4047096	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
105	4049093	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
106	4046109	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
107	4046098	LBA	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
108	70177082	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
109	4049210	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
110	90153123	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
111	70167362	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
112	4050666	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
113	4051641	SUERO	FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
114	19118917	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
115	19118919	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
116	19118921	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
117	19118923	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
118	19118925	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
119	19118927	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
120	19118928	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
121	19118933	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
122	19118935	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
123	19118936	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
124	19118937	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
125	19118949	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
126	19123150	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
127	19123151	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
128	19123152	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
129	19123153	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
130	19123154	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
131	19123157	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
132	19123158	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
133	19123161	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
134	19123159	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
135	19123165	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
136	19123166	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
137	19123391	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
138	19123160	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
139	16005703	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
140	16011696	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN

Nº	Nº MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
141	16031644	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
142	16036014	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
143	16036089	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
144	16036902	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
145	16158351	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
146	16158427	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
147	16165378	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
148	16169470	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
149	16172368	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
150	16173775	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
151	16175698	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
152	16230224	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
153	16265664	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
154	16267742	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
155	16267853	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
156	16283474	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
157	16293485	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
158	17006391	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
159	17006410	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
160	17006780	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
161	17012311	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
162	17012732	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
163	17014413	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
164	17019416	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
165	17039893	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
166	17039911	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
167	17041249	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
168	17041700	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
169	17050345	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
170	17050722	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
171	17050830	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
172	17056507	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
173	17056639	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
174	17060141	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
175	17060470	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
176	17060621	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
177	17066063	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
178	17066495	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
179	17075111	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
180	17075562	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
181	17080041	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
182	17080297	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
183	17080550	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN

Nº	Nº MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
184	17095393	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
185	17095547	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
186	17098551	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
187	17108989	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
188	17117464	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
189	17218848	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
190	17232121	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
191	17232851	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
192	17242058	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
193	17242268	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
194	17242580	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
195	17248423	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
196	17248873	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
197	17248878	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
198	18004802	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
199	18013318	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
200	18015878	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
201	18018156	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
202	18018517	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
203	18023187	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
204	18027500	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
205	18028396	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
206	18028700	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
207	18031376	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
208	18032265	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
209	18032534	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
210	18037118	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
211	18037422	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
212	18042793	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
213	18043197	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
214	18043515	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
215	18047712	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
216	18051091	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
217	18073214	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
218	18076049	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
219	18082079	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
220	18082405	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
221	18086014	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
222	18094190	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
223	18094332	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
224	18097160	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
225	18104408	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
226	18104464	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN

Nº	Nº MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
227	18104602	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
228	18114123	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
229	18119752	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
230	18142948	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
231	18151933	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
232	18253602	LBA	H. GREGORIO MARAÑÓN
233	19060128	SUERO	H. GREGORIO MARAÑÓN
234	57816164	SUERO	H. LA PAZ
235	57819989	SUERO	H. LA PAZ
236	57823191	SUERO	H. LA PAZ
237	57826510	SUERO	H. LA PAZ
238	57826730	LBA	H. LA PAZ
239	57826786	SUERO	H. LA PAZ
240	5782749291	SUERO	H. LA PAZ
241	5782758991	SUERO	H. LA PAZ
242	5782767491	SUERO	H. LA PAZ
243	5782769991	SUERO	H. LA PAZ
244	57827716	SUERO	H. LA PAZ
245	5781766891	SUERO	H. LA PAZ
246	57826995	SUERO	H. LA PAZ
247	5782762791	SUERO	H. LA PAZ
248	57827733	SUERO	H. LA PAZ
249	57829743	SUERO	H. LA PAZ
250	57831456	LÍQUIDO PERICÁRDICO	H. LA PAZ
251	5783181591	SUERO	H. LA PAZ
252	57844057	LBA	H. LA PAZ
253	57845266	SUERO	H. LA PAZ
254	57845605	SUERO	H. LA PAZ
255	57844532	SUERO	H. LA PAZ
256	5784508091	SUERO	H. LA PAZ
257	5784510791	SUERO	H. LA PAZ
258	5784517791	SUERO	H. LA PAZ
259	5784531291	SUERO	H. LA PAZ
260	5784533391	SUERO	H. LA PAZ
261	5784552091	SUERO	H. LA PAZ
262	578553291	SUERO	H. LA PAZ
263	57844058	SUERO	H. LA PAZ
264	57845270	SUERO	H. LA PAZ
265	5785082991	SUERO	H. LA PAZ
266	5785330191	SUERO	H. LA PAZ
267	5785688891	SUERO	H. LA PAZ
268	57844538	SUERO	H. LA PAZ
269	57853037	SUERO	H. LA PAZ

Nº	Nº MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
270	57853060	SUERO	H. LA PAZ
271	5785610591	SUERO	H. LA PAZ
272	57857742	SUERO	H. LA PAZ
273	57857908	SUERO	H. LA PAZ
274	57856119	SUERO	H. LA PAZ
275	57857753	SUERO	H. LA PAZ
276	5785611291	SUERO	H. LA PAZ
277	5785663191	SUERO	H. LA PAZ
278	57859282	SUERO	H. LA PAZ
279	57859324	SUERO	H. LA PAZ
280	5786014791	SUERO	H. LA PAZ
281	57860236	SUERO	H. LA PAZ
282	57860357	SUERO	H. LA PAZ
283	57860624	SUERO	H. LA PAZ
284	5786108191	SUERO	H. LA PAZ
285	57864188	SUERO	H. LA PAZ
286	57864191	SUERO	H. LA PAZ
287	57869182	LBA	H. LA PAZ
288	5787916191	SUERO	H. LA PAZ
289	5728125691	SUERO	H. LA PAZ
290	5731019891	SUERO	H. LA PAZ
291	53906954	SUERO	H. LA PAZ
292	57103027	SUERO	H. LA PAZ
293	56957601	SUERO	H. LA PAZ
294	57894037	SUERO	H. LA PAZ
295	57904571	SUERO	H. LA PAZ
296	57904573	SUERO	H. LA PAZ
297	5789965991	SUERO	H. LA PAZ
298	57907509	SUERO	H. LA PAZ
299	57907514	SUERO	H. LA PAZ
300	5790754191	SUERO	H. LA PAZ
301	5790757191	SUERO	H. LA PAZ
302	57909481	SUERO	H. LA PAZ
303	57893843	SUERO	H. LA PAZ
304	57907510	SUERO	H. LA PAZ
305	57907518	SUERO	H. LA PAZ
306	57908810	SUERO	H. LA PAZ
307	5790889091	SUERO	H. LA PAZ
308	5790923891	SUERO	H. LA PAZ
309	5790925291	SUERO	H. LA PAZ
310	57909531	SUERO	H. LA PAZ
311	57911079	SUERO	H. LA PAZ
312	57909112	SUERO	H. LA PAZ

Nº	Nº MUESTRA	TIPO DE MUESTRA	ORIGEN
313	57916306	SUERO	H. LA PAZ
314	57919012	LBA	H. LA PAZ
315	57919017	LBA	H. LA PAZ
316	57930379	LBA	H. LA PAZ
317	5791319891	SUERO	H. LA PAZ
318	5791572091	SUERO	H. LA PAZ
319	5791634091	SUERO	H. LA PAZ
320	5791635191	SUERO	H. LA PAZ
321	5791659091	SUERO	H. LA PAZ
322	5791274891	SUERO	H. LA PAZ
323	57917672	SUERO	H. LA PAZ
324	57927081	SUERO	H. LA PAZ
325	5792507591	SUERO	H. LA PAZ
326	5792522691	SUERO	H. LA PAZ
327	5792874591	SUERO	H. LA PAZ
328	57930095	SUERO	H. LA PAZ

9. MUESTRAS BIOLÓGICAS DE OTRAS PATOLOGÍAS.

Se realiza un estudio de reactividad cruzada con muestras derivadas de una serie de infecciones que no están relacionadas con aspergilosis invasiva pero que podrían presentar un riesgo potencial de interferencia con la técnica (Tabla 12).

Tabla 12. Muestras biológicas empleadas en el estudio de reactividad cruzada.

HAMA: Human Anti-Mouse Antibody; Colección Vircell: muestras desfibrinadas en VIRCELL S.L. procedentes del Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Granada (CRTS), Granada; Biomnis: Eurofins Biomnis, Francia.

Nº	Microorganismo/Patología	Muestra	Origen
1	Micoplasma	A-20-039	Colección Vircell
2	Micoplasma	A-07-057	Colección Vircell
3	Micoplasma	A-10-026	Colección Vircell
4	Micoplasma	A-05-044	Colección Vircell
5	Micoplasma	A-07-098	Colección Vircell
6	Micoplasma	A-06-077	Colección Vircell
7	Micoplasma	A-08-058	Colección Vircell
8	Micoplasma	A-25-034	Colección Vircell
9	Micoplasma	A-44-082	Colección Vircell
10	Micoplasma	A-44-080	Colección Vircell
11	Micoplasma	A-39-084	Colección Vircell
12	Micoplasma	A-40-060	Colección Vircell
13	Micoplasma	A-42-062	Colección Vircell
14	Micoplasma	A-39-001	Colección Vircell
15	Micoplasma	A-50-016	Colección Vircell
16	Toxoplasma	A-02-171	Colección Vircell
17	Toxoplasma	A-20-040	Colección Vircell

Nº	Microorganismo/Patología	Muestra	Origen
18	Toxoplasma	A-20-031	Colección Vircell
19	Toxoplasma	A-17-071	Colección Vircell
20	Toxoplasma	A-02-196	Colección Vircell
21	Toxoplasma	A-13-086	Colección Vircell
22	Toxoplasma	A-16-086	Colección Vircell
23	Toxoplasma	A-20-017	Colección Vircell
24	Toxoplasma	A-39-088	Colección Vircell
25	Toxoplasma	A-38-096	Colección Vircell
26	Toxoplasma	A-38-094	Colección Vircell
27	Toxoplasma	A-08-092	Colección Vircell
28	Toxoplasma	A-39-004	Colección Vircell
29	Toxoplasma	A-42-087	Colección Vircell
30	Toxoplasma	A-40-098	Colección Vircell
31	Toxoplasma	A-43-096	Colección Vircell
32	Toxoplasma	A-42-090	Colección Vircell
33	Citomegalovirus	A-01-089	Colección Vircell
34	Citomegalovirus	A-07-024	Colección Vircell
35	Citomegalovirus	A-09-026	Colección Vircell
36	Citomegalovirus	A-14-087	Colección Vircell
37	Citomegalovirus	A-18-002	Colección Vircell
38	Citomegalovirus	A-17-064	Colección Vircell
39	Citomegalovirus	A-38-093	Colección Vircell
40	Citomegalovirus	A-01-088	Colección Vircell
41	Citomegalovirus	R-003-065	Colección Vircell
42	Citomegalovirus	A-46-028	Colección Vircell
43	Citomegalovirus	A-39-003	Colección Vircell
44	Citomegalovirus	A-39-085	Colección Vircell
45	Citomegalovirus	A-39-006	Colección Vircell
46	Citomegalovirus	A-44-056	Colección Vircell
47	Rubeola	A-02-010	Colección Vircell
48	Rubeola	A-02-027	Colección Vircell
49	Rubeola	A-02-032	Colección Vircell
50	Rubeola	A-02-108	Colección Vircell
51	Rubeola	A-02-109	Colección Vircell
52	Rubeola	A-02-110	Colección Vircell
53	Rubeola	A-02-111	Colección Vircell
54	Rubeola	A-02-112	Colección Vircell
55	Rubeola	A-82-047	Colección Vircell
56	Rubeola	A-82-049	Colección Vircell
57	Rubeola	A-82-048	Colección Vircell
58	Rubeola	A-82-051	Colección Vircell
59	Rubeola	A-82-050	Colección Vircell
60	Sífilis	A-03-034	Colección Vircell
61	Sífilis	A-03-084	Colección Vircell
62	Sífilis	A-03-087	Colección Vircell
63	Sífilis	A-03-095	Colección Vircell
64	Sífilis	A-03-097	Colección Vircell
65	Sífilis	A-04-027	Colección Vircell
66	Sífilis	A-04-029	Colección Vircell
67	Sífilis	A-37-041	Colección Vircell
68	Sífilis	A-72-039	Colección Vircell
69	Sífilis	A-31-079	Colección Vircell
70	Sífilis	A-72-040	Colección Vircell

Nº	Microorganismo/Patología	Muestra	Origen
71	Sífilis	A-72-036	Colección Vircell
72	Sífilis	A-29-085	Colección Vircell
73	Sífilis	A-72-037	Colección Vircell
74	Sífilis	A-72-038	Colección Vircell
75	Hepatitis C	R-337-060	Biomnis
76	Hepatitis C	R-337-062	Biomnis
77	Hepatitis C	R-337-078	Biomnis
78	Hepatitis C	R-337-087	Biomnis
79	Hepatitis C	R-338-019	Biomnis
80	Hepatitis C	R-338-020	Biomnis
81	Hepatitis C	R-338-021	Biomnis
82	Hepatitis C	R-338-023	Biomnis
83	Hepatitis C	R-338-026	Biomnis
84	Factor reumatoide	R-215-100	Colección Vircell
85	Factor reumatoide	R-216-002	Colección Vircell
86	Factor reumatoide	R-216-003	Colección Vircell
87	Factor reumatoide	R-216-005	Colección Vircell
88	Factor reumatoide	R-216-006	Colección Vircell
89	Factor reumatoide	R-216-010	Colección Vircell
90	Factor reumatoide	R-216-011	Colección Vircell
91	Factor reumatoide	R-216-012	Colección Vircell
92	Hepatitis E	A-68-010	Colección Vircell
93	Hepatitis E	A-79-030	Colección Vircell
94	Hepatitis E	A-79-031	Colección Vircell
95	Hepatitis E	A-79-032	Colección Vircell
96	Hepatitis E	A-79-033	Colección Vircell
97	Hepatitis E	A-79-034	Colección Vircell
98	Hepatitis E	A-67-025	Colección Vircell
99	Hepatitis E	A-79-035	Colección Vircell
100	Anticuerpos antinucleares	R-312-038	Biomnis
101	Anticuerpos antinucleares	R-312-039	Biomnis
102	Anticuerpos antinucleares	R-312-040	Biomnis
103	Anticuerpos antinucleares	R-312-041	Biomnis
104	Anticuerpos antinucleares	R-312-042	Biomnis
105	HAMA	A-100-044	Colección Vircell
106	HAMA	A-101-024	Colección Vircell
107	HAMA	A-111-048	Colección Vircell
108	HAMA	A-93-058	Colección Vircell

10. FÁRMACOS.

Se estudian distintos tipos de fármacos con el objetivo de analizar interferencias ocasionadas por los mismos (Tabla 13):

- Antibióticos: fármacos derivados de hongos.
- Ciclofosfamida: empleado en terapias de pacientes con cáncer.
- Lidocaína: principal agente anestésico local que se usa para la obtención de muestra de LBA.

Tabla 13. Interferencias relacionadas con fármacos.

Fármaco	Referencia	Casa comercial
Piperacilina (Estándar secundario farmacéutico)	PHR1805-1G	Sigma-Aldrich
Tazobactam	PHR1686-1G	Sigma-Aldrich
Amoxicilina (amoxicilina trihidratada)	PHR1127-1G	Sigma-Aldrich
Amoxicilina-clavulánico (amoxicilina trihidratada:clavulanato de potasio (4:1))	SMB00607-1G	Sigma-Aldrich
Ciclofosfamida (Estándar secundario farmacéutico)	PHR1404-1G	Sigma-Aldrich
Lidocaína (clorhidrato de lidocaína)	L5647-100G	Sigma-Aldrich

11. SUSTANCIAS ENDÓGENAS.

Se estudian concentraciones elevadas de sustancias endógenas que pueden estar presentes en muestras de suero e interferir en los resultados de la técnica (Tabla 14).

Tabla 14. Interferencias relacionadas con sustancias endógenas.

Sustancia endógena	Referencia	Casa comercial
Tributirina	W222322	Sigma-Aldrich
Bilirrubina	B4126-1G	Sigma-Aldrich
Colesterol	A11470/L03321	Alfa Aesar
Hemoglobina	F0507-1L-D	Sigma-Aldrich
Albúmina	A9511-500MG	Sigma-Aldrich
Gamma globulina	G4386-5G	Sigma-Aldrich

12. KITS DE DIAGNÓSTICO.

Los kits de diagnóstico empleados para la caracterización de muestras biológicas del estudio de reactividad cruzada, así como los que se usan para el estudio comparativo con el kit de VIRCLIA, se detallan en la Tabla 15. El nombre del kit viene asociado con la referencia del producto y la casa comercial.

Tabla 15. Kits de diagnóstico empleados para la caracterización de muestras biológicas.

Kit de diagnóstico	Referencia	Casa comercial
Platelia™ <i>Aspergillus</i> Ag	62794	Bio-Rad
Human anti-mouse Ig (HAMA)	438307	Biolegend Inc.
MYCOPLASMA PNEUMONIAE VIRCLIA IgG MONOTEST	VCM062	VIRCELL S.L.
MYCOPLASMA PNEUMONIAE VIRCLIA IgM MONOTEST	VCM064	VIRCELL S.L.
TOXOPLASMA VIRCLIA IgG MONOTEST	VCM087	VIRCELL S.L.
TOXOPLASMA VIRCLIA IgM MONOTEST	VCM088	VIRCELL S.L.
CYTOMEGALOVIRUS VIRCLIA IgG MONOTEST	VCM021	VIRCELL S.L.
CYTOMEGALOVIRUS VIRCLIA IgM MONOTEST	VCM022	VIRCELL S.L.
RUBELLA VIRCLIA IgG MONOTEST	VCM083	VIRCELL S.L.
RUBELLA VIRCLIA IgM MONOTEST	VCM084	VIRCELL S.L.
SYPHILIS VIRCLIA IgG MONOTEST	VCM085	VIRCELL S.L.

Kit de diagnóstico	Referencia	Casa comercial
SYPHILIS VIRCLIA IgG MONOTEST	VCM032	VIRCELL S.L.
HEPATITIS E VIRCLIA IgG MONOTEST	VCM066	VIRCELL S.L.
RHEUMAJET ASO	30007010	BIOKIT
SÖNA ASPERGILLUS GM	AF2003	IMMY
AspLFD	OLM1906	OLM Diagnostics
CHORUS <i>Aspergillus galactomannan</i> Ag	81178	DIESSE
<i>Aspergillus</i> antigen	EQ6911-9601	EUROIMMUN

13. INSTRUMENTOS DE LABORATORIO.

- Balanza analítica: casa comercial COBOS, modelo JT-120AI, N/S 121841006.
- pHmetro: casa comercial CRISON, modelo BASIC 20, N/S 536010.
- Pipetas y multipipetas ajustables.
- Tubos de rosca de polipropileno, de 2ml de capacidad y tapones roscados.
- Estufa: casa comercial MMM Group, modelo Incucell LSIS-B2V, N/S D152279.
- Centrifugadora: casa comercial BIOSAN, modelo Microspin 12, N/S 010213-1310-0336.
- Agitador vórtex: casa comercial BIOSAN, modelo Vortex V-1 plus, N/S 01020317061314.
- Termobloque: casa comercial BIOSAN, modelo TDB-120 con A-103, N/S 01040118110237.
- Incubador de microplacas: casa comercial BIOSAN, modelo PST-60HL-4, N/S 01012820030125.
- Lavador de microplacas automático, casa comercial BIOTEK INSTRUMENTS, modelo 405 LS, N/S 209065.
- Lector de microplacas con filtros de 450 nm y 630 nm: casa comercial AUTOBIO, modelo PHOMO, N/S 301 100 1004.
- Lector de microplacas de CLIA: casa comercial GOLD STANDARD DIAGNOSTICS, modelo Thunderbolt – EIA, S/N 12061-47.
- Thermomixer compact: casa comercial Eppendorf, N/S 5350 060 1P.
- Agitador orbital: casa comercial Biosan, modelo Type 3D, N/S 01015119050126.

14. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN.

- Cuantificación de proteínas mediante Bradford: Bradford Reagent, Ref. B6916, casa comercial Supelco.

La técnica colorimétrica de cuantificación de proteínas se basa en el cambio de color del reactivo Coomassie Brilliant Blue G-250. Este colorante reacciona con los aminoácidos básicos creando una fijación colorante-proteína. La solución se basa en Coomassie Brilliant Blue G-250, ácido fosfórico, metanol y agua destilada. Pasados un par de minutos tras mezclar la solución proteica con el reactivo de Bradford, se realiza una medida de la absorbancia a 595 nm. Es necesario el análisis de una curva

de calibración de forma paralela para estimar la concentración de proteínas de la solución objeto de estudio.

El cálculo de la concentración de proteínas se determinó despejando "x" de la siguiente ecuación:

$$y = b_0 + b_1 x$$

Siendo "b₀" la intersección en el eje Y, "b₁" la pendiente, "y" el valor obtenido de absorbancia y "x" la cantidad de proteína en mg/ml.

- Cuantificación de azúcares mediante el método fenol-sulfúrico.

La cuantificación de azúcares se llevó a cabo mediante el método de fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois¹⁷⁷. Consiste en un método colorimétrico capaz de medir azúcares y sus derivados gracias a la presencia de fenol y ácido sulfúrico. Los azúcares se deshidratan en contacto con ácido sulfúrico concentrado dando lugar a derivados de furfural. Estos en presencia de fenol, generan un producto de color amarillo-naranja que se cuantifica mediante espectofotómetro a 490 nm. En primer lugar, se requiere de la preparación de la curva patrón. Esta se basó en concentraciones graduales de glucosa que trazaron una recta desde los 10 a los 100 mg/ml. 2 ml de cada punto de la recta, junto con las muestras objeto de estudio, se sometieron a 1 ml de solución acuosa con fenol al 5%. A continuación, se añadió 5 ml de ácido sulfúrico concentrado a la mezcla anterior dejando reposar durante 10 minutos. Tras este periodo de tiempo, se agitó 30 segundos y se colocó en un baño a temperatura ambiente durante 20 minutos.

La cuantificación de la concentración de cada muestra se llevó a cabo con el valor de densidad óptica (DO) obtenido tras la lectura a 490 nm y los valores de la pendiente de la recta resultante de la relación entre la concentración y la absorbancia de la curva patrón incluida. Se recomienda ensayar varias réplicas de cada punto de la recta para conseguir mayor precisión en la obtención de los resultados.

El cálculo de la concentración de azúcares se determinó despejando "x" de la siguiente ecuación:

$$y = b_0 + b_1 x$$

Siendo "b₀" la intersección en el eje Y, "b₁" la pendiente, "y" el valor obtenido de absorbancia y "x" la cantidad de azúcar en mg/ml.

15. MÉTODO DE CULTIVO Y CRECIMIENTO DE LA FASE MICELIAL DE *ASPERGILLUS FUMIGATUS*.

Aspergillus fumigatus es un agente perteneciente al grupo de riesgo tipo II, es decir, aportan un riesgo moderado individual y un riesgo comunitario limitado. Pueden ocasionar enfermedades en humanos y/o animales, pero bajo las condiciones controladas de manipulación que se dan en un

laboratorio, estos no dan lugar a riesgos serios para los trabajadores ni para el ambiente donde se lleva a cabo su cultivo.

El cultivo del hongo se llevó a cabo en el Laboratorio de Seguridad Biológica (BSL-3) de VIRCELL S.L. Se utilizó, por un lado, placas de agar dextrosa Sabouraud y, por otro lado, caldo dextrosa Sabouraud. Las placas permanecieron 96 horas a 37°C. Transcurrido ese tiempo, una suspensión del micelio obtenido, se incorporó a un erlenmeyer que contenía caldo dextrosa Sabouraud y se incubó a 37°C en agitación durante 3 días. Pasado este periodo de tiempo, se separó la parte sólida de la líquida empleando asa de siembra y papel de filtro plegado en forma de embudo. Se obtuvo, por un lado, un sobrenadante limpio y, por otro, los restos de micelio, los cuales se añadieron a los obtenidos del cultivo en placa (Figura 27).

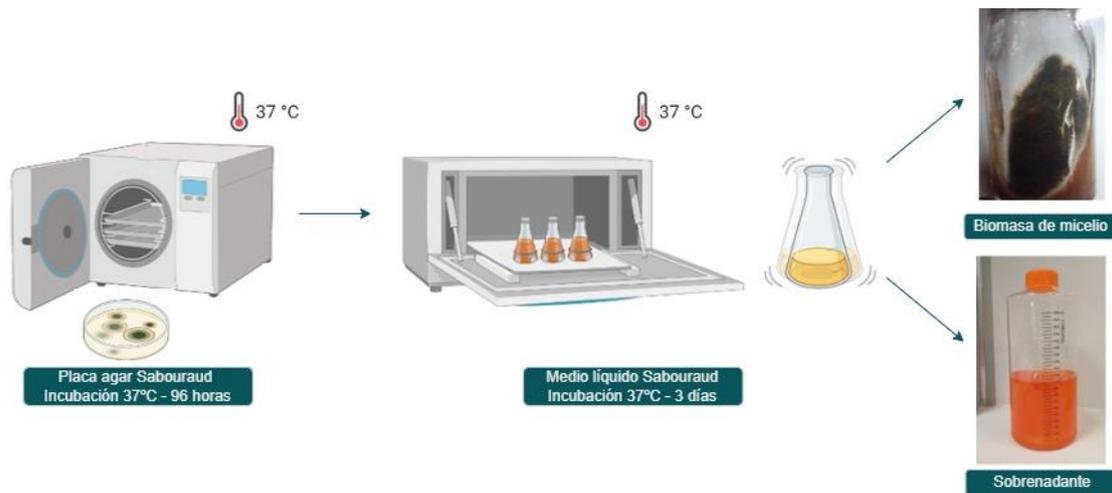


Figura 27. Cultivo *Aspergillus fumigatus* (Imagen modificada de BioRender¹⁷⁸)

16. MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ANTÍGENO.

Los dos productos resultantes del cultivo de *Aspergillus fumigatus* (biomasa de micelio y sobrenadante) fueron proporcionados al Departamento de Proteómica de VIRCELL S.L. Este llevó a cabo el proceso de extracción y purificación de los antígenos de distinta naturaleza y peso molecular. Una vez obtenidos, fueron caracterizados mediante la técnica de ELISA tomada como referencia y fueron empleados en los inmunoensayos enzimáticos basados en la técnica de CLIA.

16.1. OBTENCIÓN DE ANTÍGENO DE GALACTOMANANO DE DIFERENTE PESO MOLECULAR.

De la biomasa se obtuvieron fracciones de distintos pesos moleculares derivadas de la cromatografía de exclusión por tamaño (Figura 28). Se partió de una suspensión de hifas de *Aspergillus fumigatus* que fue inactivada a 80°C en baño termostático durante 30 minutos. A continuación, se procedió a pesar el micelio, se añadió un tampón de ácido cítrico-NaOH 0,02 M (pH 7), y se homogeneizó. Tras

la homogeneización se sometió a un proceso de autoclavado a 121°C durante 90 minutos y a 7,82 atmósferas de presión. Después se dejó enfriar y se pasó a centrifugar a 8000 x g durante 30 minutos a una temperatura de 4°C. Se pasó a descartar el sobrenadante y el pellet se volvió a resuspender en el mismo tampón mencionado anteriormente para someterse a otro ciclo de autoclavado. Tras enfriar, la muestra volvió a someterse a otro ciclo de centrifugación y el pellet obtenido se resuspendió en un tampón de borohidruro alcalino. Este fue el que se procesó para la extracción de galactomanano. La muestra homogeneizada se dispuso en un Kitasato que se sometió a nitrógeno y agitación en frío durante aproximadamente 20 horas. Trascorrido este periodo, se centrifugó bajo las mismas condiciones citadas anteriormente. El sobrenadante obtenido se filtró a través de un papel de filtro y se ajustó el pH a 6,5 con ácido acético. El pellet se puede conservar congelado a -20°C para sucesivas fases de extracción. Una vez obtenidos los extractos, se sometieron a una fase de concentración por diálisis inversa usando una membrana de diálisis con un cut-off inferior a 14 kDa hasta llevarlos a una concentración 100-150X. Los compuestos usados para la concentración pueden ser polietilenglicol y carboximetilcelulosa. El producto resultante se dializó en agua desionizada llevando a cabo al menos 4 cambios¹⁷⁹ siendo cada uno con un volumen 10 veces superior al de la fracción.

Antes de la purificación se procedió a la cuantificación de azúcares totales mediante caracterización espectrofotométrica y, el sistema ÄKTA™ (GE Healthcare) se sometió a un proceso de limpieza. La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de exclusión por tamaño en la que la fase estacionaria estaba compuesta por un material con distintos tamaños de poro. De esta forma, se obtuvieron fracciones de diferente peso molecular. La matriz de dicha columna estaba compuesta de dextrano y agarosa reticulada.

Una vez eliminado el tampón de almacenamiento de la columna y, tras pasar agua desionizada autoclavada, se inyectó un volumen del tampón usado en la diálisis para su equilibrio antes de proceder a la inyección del extracto. Se recomienda añadir al menos 0,15 M de sal en el tampón para evitar interacciones con la matriz. Una vez terminado el proceso de purificación se realizó una limpieza de la resina empleando agua desionizada autoclavada e hidróxido sódico 1 N. Por último, se pasó tampón de almacenamiento para su conservación a 2-8°C.

Las eluciones se concentraron un mínimo de 3 veces con respecto al volumen inicial por diálisis inversa en carboximetilcelulosa usando membranas de bajo cut-off, ≤ 10 kDa. Sobre los productos concentrados se realizó una cuantificación de azúcares totales según el protocolo ácido fenol-sulfúrico.

Una vez obtenidas las distintas fracciones, estas fueron evaluadas mediante la técnica comercial ELISA de Bio-Rad.

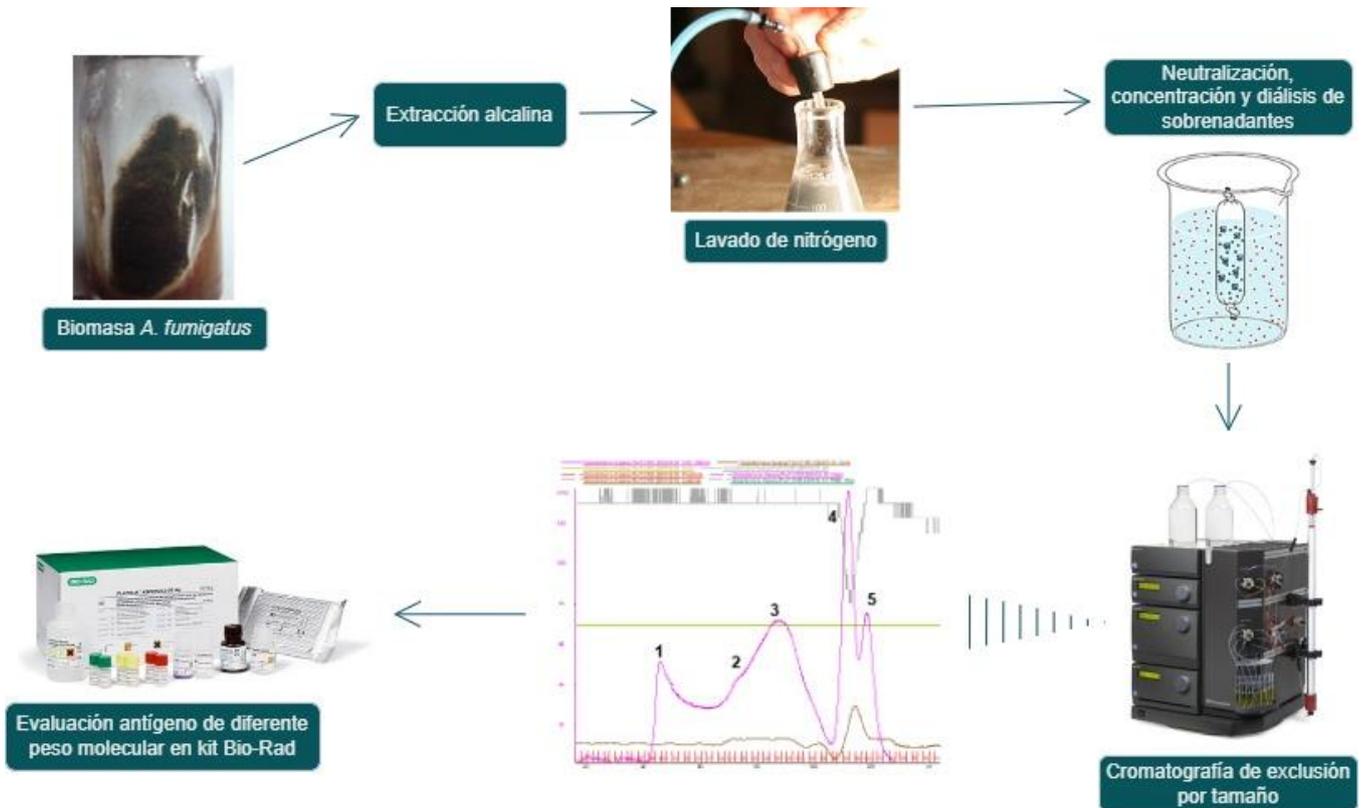


Figura 28. Procedimiento de obtención de antígeno de galactomanano de distinto peso molecular a partir de biomasa de micelio.

16.2. OBTENCIÓN DE ANTÍGENO DE GALACTOMANANO UNIDO A PROTEÍNA PARTIENDO DE SOBRENADANTE DE CULTIVO.

Por otro lado, partiendo de sobrenadante, se obtuvo antígeno de galactomanano unido a proteína y mediante fraccionamiento químico, la fracción proteica aislada (Figura 29). Se llevó a cabo una precipitación con 4 volúmenes de etanol. El precipitado de dicho tratamiento se lavó tres veces con etanol y, por último, se resuspendió en agua¹⁸⁰. Tras varios ciclos de diálisis tuvo lugar la purificación del producto obtenido a través de columna de concanavalina A. La concanavalina A es una proteína tetramérica, una lectina de la familia de las leguminosas que se obtiene de *Canavalia virosa* y cuyo peso molecular es de unos 110 kDa. Tiene la capacidad de unirse a residuos α -D-manosilo y α -D-glucosilo, situados en la posición terminal de estructuras ricas en α -manosa.

La columna con concanavalina A inmovilizada permitió realizar una cromatografía de afinidad que aseguró la unión de los carbohidratos presentes en la muestra. El producto final obtenido contenía proteína unida a la fracción glucídica.

Por otro lado, una parte de ese producto obtenido se sometió a un tratamiento con periodato sódico 30 mM durante 15 minutos a 4°C. Pasado este tiempo la solución se sometió a etilenglicol para combatir el exceso de periodato. Una vez hecho esto, la solución fue dializada y neutralizada con borohidruro de sodio durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, la solución se llevó a pH 5-6 con ácido acético y se sometió a diálisis frente a ácido acético a 0,5% (p/v) dejando el último ciclo de diálisis con agua destilada¹⁸⁰. Este proceso garantizó la escisión de enlaces glicosídicos presentes en la muestra y dejó libre la parte proteica.

El complejo obtenido de la cromatografía de afinidad y el resultante tras el tratamiento con periodato sódico fueron evaluados por el kit de Bio-Rad.

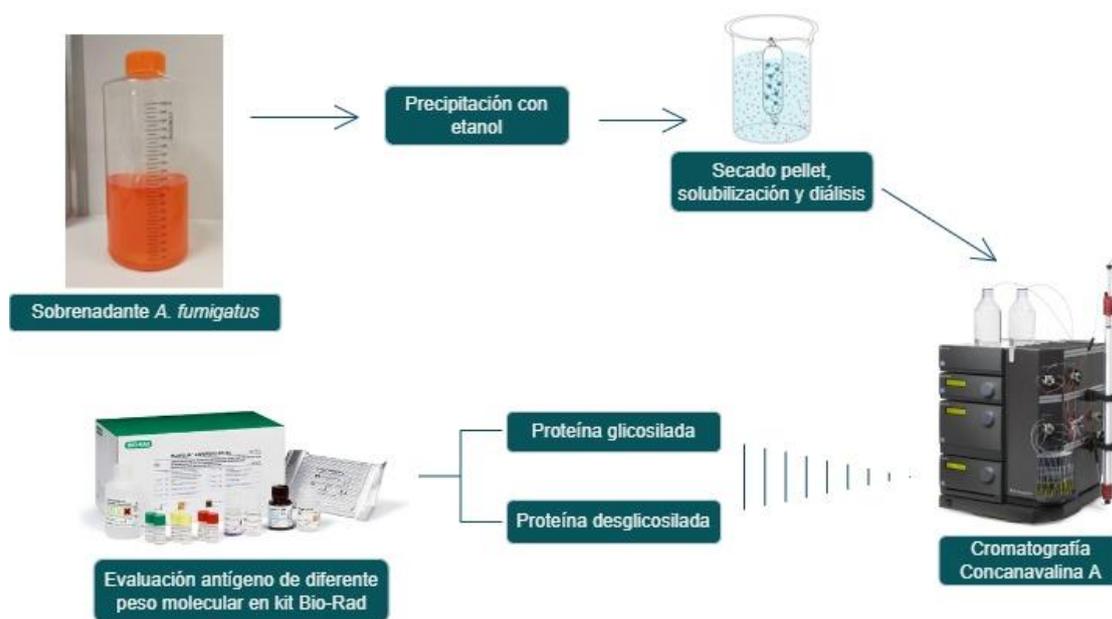


Figura 29. Procedimiento de obtención de galactomananoproteína y proteína a partir de sobrenadante.

17. EVALUACIÓN DEL ANTÍGENO DE GALACTOMANANO PURIFICADO MEDIANTE TÉCNICA ELISA.

Se llevó a cabo la titulación de las fracciones de antígeno purificado mediante la técnica ELISA con el kit comercial Platelia *Aspergillus* Ag (Bio-Rad) (Figura 30). Se tomaron como base las concentraciones aportadas mediante el método fenol-sulfúrico. La dilución realizada para cada una de las fracciones de antígeno se hizo en tampón neutro. Una vez obtenidas las dobles diluciones de cada una de ellas, se sometieron al tratamiento de muestra basado en la aplicación de un tampón de tratamiento cuya base es tampón fosfato con EDTA (en relación 1:4). A continuación, se sometieron a 120°C durante

6 minutos en caso de usar termobloque o a 100°C durante 5 minutos en caso de emplear baño maría. Por último, tuvo lugar un proceso de centrifugación a 10000 x g durante 10 minutos.



Figura 30. Evaluación antígeno purificado de galactomanano por técnica comercial de Bio-Rad. (Imagen modificada de BioRender¹⁷⁸)

Los sobrenadantes obtenidos de dicho tratamiento fueron los que se analizaron mediante la técnica de ELISA tipo sandwich. Se dispuso la muestra y el conjugado en relación 1:1 en un único paso. Tras el periodo de incubación de 90 minutos a 37°C, tuvo lugar el lavado de la placa consistente en 5 ciclos. Posteriormente, se añadió sustrato TMB que se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, se paró la reacción mediante la adición de solución de parada. La lectura de la placa se llevó a cabo a 450 nm usando un filtro de referencia a 630 nm.

Mediante el punto de corte establecido por el fabricante, es decir, índices positivos $\geq 0,5$, se determinó qué fracción o fracciones son reactivas y se estimó el límite de cuantificación para cada una de ellas.

18. INMUNIZACIÓN DE RATAS Y OBTENCIÓN DE HIBRIDOMAS.

Debido a la imposibilidad de inmunizar animales, esta parte del proceso se desarrolló en una empresa externa. A esta se le suministró el antígeno purificado para llevar a cabo la inmunización de ratas. A continuación, se describe en qué consiste el proceso mediante el cual, a través de la técnica de fusión, se obtuvieron los hibridomas.

Cuando un sistema inmunitario responde frente a la acción de un antígeno se desencadena una respuesta de varios clones obteniéndose una mezcla heterogénea de anticuerpos. La capacidad de obtener anticuerpos idénticos en naturaleza y afinidad, fue descubierta por Köhler y Milstein (1975)¹⁸¹, que los llevó a ganar el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1984. Dichos anticuerpos idénticos se denominaron mAB y se producen mediante la fusión de un linfocito B con una célula de mieloma. Ambos contribuyen a la formación de hibridomas, el linfocito B aporta la característica de

inmunoglobulina específica y la célula de mieloma permite el crecimiento y multiplicación de forma ilimitada.

Las líneas celulares de mieloma deben presentar una serie de características que las hagan aptas para su uso en la producción de hibridomas. Por un lado, deben haber perdido la capacidad de secretar inmunoglobulina para que esa información únicamente sea aportada por el linfocito B. Por otro lado, deben no contar con la enzima hipoxantina-guanosina fosforibosil-transferasa y timidina quinasa. Estas están implicadas en la síntesis de nuevo ADN y tienen que estar aportadas por el linfocito fusionado.

El método de fusión ampliamente usado a lo largo de los años ha sido una solución de polietilenglicol (PEG). Este se caracteriza por ser un método sencillo, pero también tiene sus inconvenientes haciendo que a veces se produzca la fusión de varias células. El método empleado en este caso fue la electrofusión, considerada más eficaz que la fusión convencional con PEG.

Una vez realizada la fusión, las células serán dispuestas en placas de 96 pocillos. El medio destinado para el cultivo de las células fusionadas se denomina HAT (hipoxantina, aminoptericina y timidina). Este favorece el crecimiento y desarrollo de las células híbridas y no el de las células de mieloma ya que no presentan las enzimas necesarias y son incapaces de crecer en presencia de aminoptericina.

Un antígeno purificado se usa para la inmunización de murinos. Una vez que el animal es inmunizado con el antígeno, las células B se diferencian a células plasmáticas que serán las responsables de producir anticuerpos. Para garantizar la proliferación en cultivo celular, las células B del bazo del animal inmunizado se fusionan con células tumorales de mieloma múltiple. Las células fusionadas dan lugar al hibridoma aproximadamente 15 días después de la fusión. El hibridoma se diluye y se cultiva tantas veces como se quiera (Figura 31).

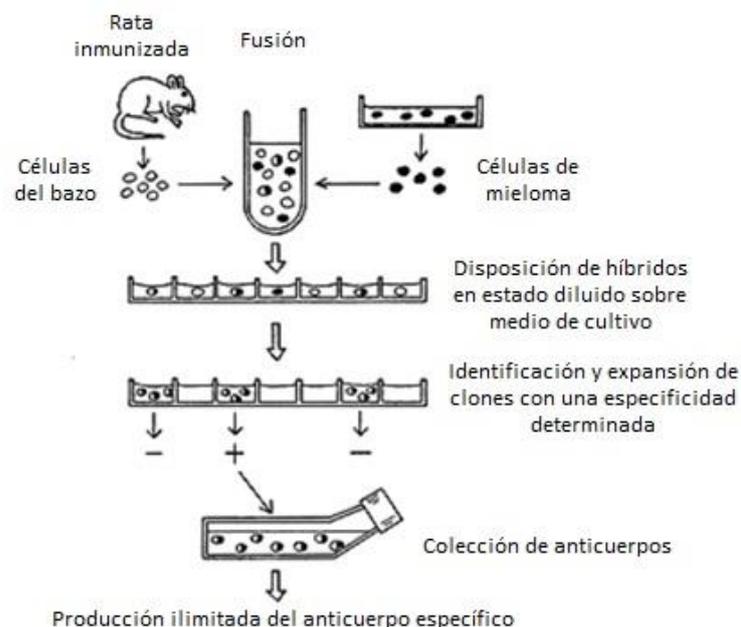


Figura 31. Producción de hibridomas.
(Figura modificada "The Nobel Prize"¹⁸²)

Cuando se alcance la confluencia celular adecuada y el medio de cultivo vire a amarillo, el sobrenadante está listo para ser evaluado mediante la técnica ELISA (Figura 32). El antígeno usado para la inmunización, antígeno de glicoproteína, fue el mismo que se usó para sensibilizar las placas de ELISA. Este fue dispuesto en un tampón neutro a una dilución determinada. Tras un periodo de incubación durante una noche en cámara climática, las placas se sometieron a un proceso de lavado para eliminar el antígeno que no se había unido. A continuación, se bloquearon con tampón neutro, suero de origen animal y sacarosa, con el objetivo de eliminar reacciones inespecíficas.

Mediante la técnica de inmunoensayo indirecto se pudieron seleccionar aquellos clones reactivos dando lugar a la expansión de aquellos que presentaron una elevada especificidad frente al antígeno.

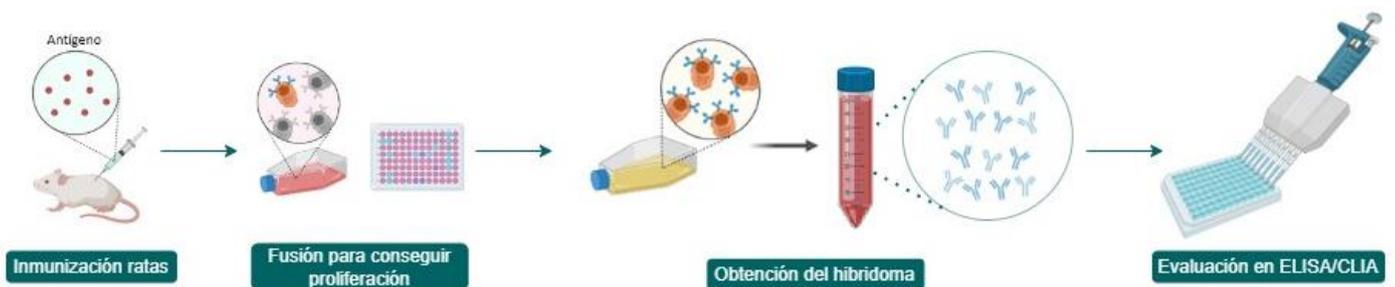


Figura 32. Inmunización de ratas y obtención de hibridomas.
(Imagen modificada de BioRender¹⁷⁸)

Algunas células pierden la capacidad de producción de anticuerpos por lo que tan pronto como se obtenga reactividad, tendrá lugar la clonación para evitar que las células no productoras de anticuerpos, que son metabólicamente más eficientes, acaben desplazando a las otras en el cultivo.

Existe otra forma de producir anticuerpos en el animal, aunque es un método menos practicado. Consiste en inyectar células del hibridoma en el peritoneo. Las células del hibridoma se expanden en la cavidad peritoneal originando un acúmulo de líquido ascítico que contiene el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma. Sin embargo, este procedimiento es menos practicado para evitar el uso de animales.

Las células del hibridoma se pueden conservar en nitrógeno líquido (-196°C) pudiendo generar a partir de ellas el mAB específico cada vez que se desee.

19. CARACTERIZACIÓN DE HIBRIDOMAS.

19.1. ISOTIPADO.

Se llevó a cabo a través del kit comercial Ig Isotyping Rat Instant ELISA™ Kit (Invitrogen, Ref. 88-50650-22). Consiste en una técnica ELISA con la que se detecta, de forma cualitativa, anticuerpos específicos de isotipo IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgA, IgM y de cadena ligera, como son κ y λ . La muestra empleada fueron los sobrenadantes obtenidos de rata.

Mediante esta técnica se detecta con gran especificidad qué tipo de cadena pesada y ligera está produciendo cada uno de los hibridomas ensayados. Consiste en una microplaca recubierta de estreptavidina a la que se unen anticuerpos de captura específicos para cada isotipo de globulina. Estos están unidos a biotina. Para cerrar el sistema, se encuentra un anticuerpo detector anti-rata Ig (H+L) conjugado con peroxidasa (Figura 33). En una incubación única de 2 horas a temperatura ambiente se establece la unión de los tres elementos, es decir, elemento de captura biotinado, el sobrenadante del hibridoma y el elemento detector conjugado con peroxidasa. Trascurrido ese tiempo y después de un proceso de lavado, se aplica el sustrato TMB que será el que nos indique el isotipo de inmunoglobulina presente en la muestra. La lectura se lleva a cabo midiendo absorbancia a 450 nm.

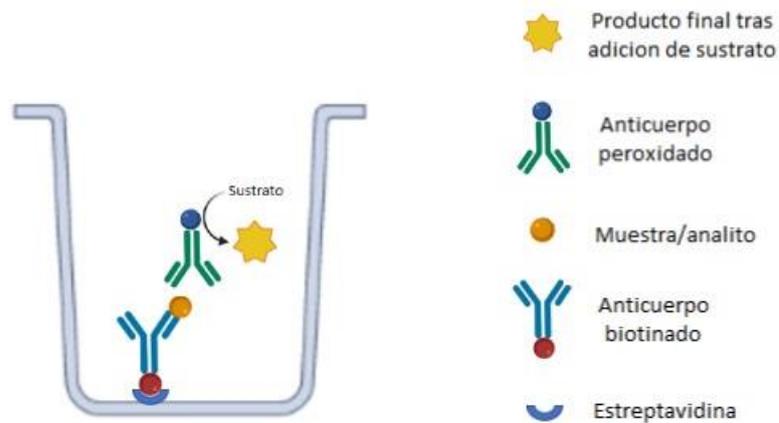


Figura 33. Inmunoensayo enzimático llevado a cabo para el isotipado de hibridomas. (Imagen modificada de BioRender¹⁷⁸)

19.2. REACTIVIDAD DE LOS HIBRIDOMAS FRENTE A ANTÍGENO PURIFICADO DE DISTINTO PESO MOLECULAR.

El antígeno purificado obtenido tras la cromatografía de exclusión por tamaño y la columna de concanavalina A fue empleado con el fin de analizar la reacción de cada uno de los hibridomas. Como anticuerpo secundario se utilizó una globulina anti-IgG+IgM de rata conjugada con peroxidasa. El análisis de cada fracción obtenida se llevó a cabo mediante el método CLIA usando una técnica

indirecta. Esta se basó en la sensibilización de placas con las diferentes fracciones tomando como referencia su concentración. Las fracciones se dispusieron en placa normalizadas de tal forma que todas ellas fueron dispuestas a la misma concentración independientemente de su concentración de partida. Se diluyeron en un tampón neutro y se dispusieron sobre placas CLIA (Greiner Bio-One High Binding). Se mantuvieron durante toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente, tras 4 ciclos de lavado, se procedió a aplicar la solución conservante/bloqueante con el objetivo de evitar reacciones inespecíficas y garantizar la conservación de la proteína en la placa a lo largo del tiempo. De forma paralela, una placa fue procesada del mismo modo que las anteriores, se dispuso con tampón neutro sin antígeno y con la solución bloqueante/conservante. De este modo, se estudió la reacción inespecífica que pueden presentar los hibridomas frente a la placa y/o a la solución bloqueante/conservante. Los hibridomas reactivos a la placa que no fue sensibilizada con el antígeno, fueron considerados inespecíficos y no se tuvieron en cuenta en los análisis.

Mediante la técnica CLIA indirecta (Figura 34), se usaron los antígenos purificados inmovilizados en la fase sólida normalizados según concentración. A continuación, se dispusieron los hibridomas sobre las mismas, 100 μ l de cada uno, y se incubaron a 37°C durante 20 minutos. Tras este periodo, las placas se sometieron a un proceso de lavado consistente en 4 ciclos y una vez realizado esto, se dispensaron 100 μ l por pocillo de globulina anti-rata conjugada con peroxidasa a título 1/3000 (título recomendado por el fabricante). Esta fue diluida en tampón neutro con suplemento de proteína animal y se mantuvo a 37°C durante 20 minutos. Por último, se volvió a repetir el procedimiento de lavado y una vez eliminados los residuos no unidos, se dispuso el sustrato enzimático quimioluminiscente consistente en 2 componentes (luminol y peróxido de hidrógeno). La mezcla de ambos componentes se llevó a cabo a partes iguales y se dispuso 100 μ l de la misma en cada pocillo de reacción. Pasados 10 minutos a 37°C la placa fue leída en un luminómetro.

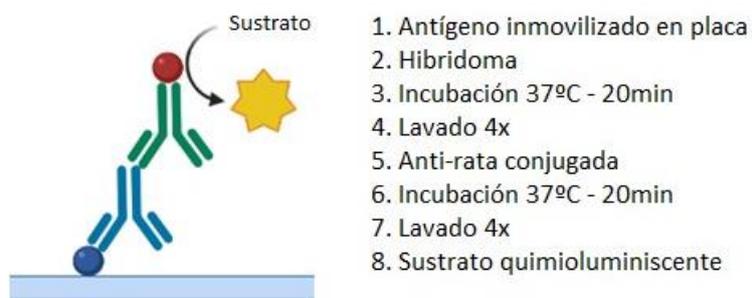


Figura 34. Esquema de los pasos a seguir en el ensayo indirecto.
(Imagen modificada de BioRender¹⁷⁸)

Debido a la falta de conocimiento sobre qué antígeno está presente en muestras de suero, plasma y LBA y, teniendo en cuenta que *Aspergillus* puede secretar antígenos de diferente tamaño en cada forma de expresión¹⁸³, se seleccionaron como hibridomas más óptimos en este primer ensayo aquellos que presentaron reactividad frente a todas las fracciones antigénicas ensayadas. En principio, la reactividad frente a la parte proteica se tomó como información secundaria ya que, en

el futuro, las muestras serán tratadas mediante un agente quelante y sometidas a un proceso de hervido y centrifugado de tal forma que gran parte de la parte proteica asociada al antígeno precipitará dejando libre al antígeno de galactomanano.

Los resultados obtenidos fueron expresados en RLU. Cada hibridoma aportó un valor RLU para cada tipo de fracción antigénica evaluada y para la placa sin antígeno.

El conjunto de datos reportados por la placa sin antígeno se reflejó en un diagrama de caja para observar la distribución de los resultados e identificar los considerados como valores atípicos u *outliers*. Los límites de la caja se indican mediante el primer y tercer cuartil (Q1 y Q3) correspondiendo con la mediana la línea que divide dicha caja (Q2). A la diferencia entre Q3 y Q1 se le denomina rango intercuartílico (RIC). Los bigotes que se prolongan a raíz de la misma corresponden a los valores extremos, obtenidos mediante $Q1-1,5RIC$ y $Q3+1,5RIC$. De tal manera que el conjunto de valores típicos quedaría comprendido entre ambos puntos, es decir, $[Q1-1,5RIC, Q3+1,5RIC]$. Obtenido esto, se eliminaron del estudio aquellos hibridomas que presentaron valores atípicos según el análisis.

19.3. INHIBICIÓN DE HIBRIDOMAS FRENTE AL ANTICUERPO MONOCLONAL EB-A2.

Tal y como se describe en la bibliografía, el mAB EB-A2 producido por Latgé y usado posteriormente en kit de ELISA Platelia *Aspergillus* Ag (Bio-Rad), se obtuvo de rata y presenta isotipo IgM¹⁸⁴. Teniendo como antecedente este kit y tomándolo como referencia, se buscó comparar los hibridomas reactivos con el mAB EB-A2 conjugado. Para ello, se realizó un ensayo de inhibición frente a antígeno de glicoproteína (Figura 35). Este ensayo tuvo como objetivo el análisis de la similitud entre los hibridomas objeto de estudio y el mAB EB-A2. De este modo, permite concluir qué hibridoma o hibridomas van dirigidos frente al mismo o los mismos epítopos que el mAB EB-A2.

El antígeno de glicoproteína se dispuso a 0,5 µg/ml sobre placa CLIA (Greiner Bio-One High Binding). Tras el proceso de sensibilización de la placa con el antígeno de galactomanano+proteína, los hibridomas se dispusieron en la misma durante 20 minutos a 37°C. Un pocillo de reacción actuó como control, sobre este se aplicó tampón neutro en lugar de hibridoma. A continuación, tras 4 ciclos de lavado, fue añadido el mAB EB-A2 conjugado con peroxidasa en todos los pocillos de reacción. Una vez sometido al mismo periodo de incubación, es decir, 37°C durante 20 minutos, se lavó de nuevo para eliminar el anticuerpo conjugado no unido. Por último, se dispensaron los componentes A y B que forman el sustrato enzimático quimioluminiscente.

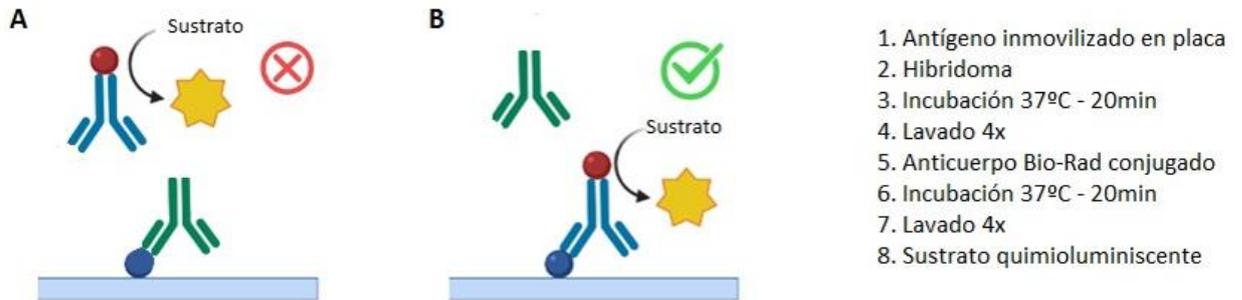


Figura 35. Esquema de los pasos seguidos en el ensayo de inhibición.

A: Inhibición completa por parte de los anticuerpos contenidos en el hibridoma, no se permite la unión del anticuerpo conjugado de Bio-Rad; B: No existe inhibición, el antígeno está disponible para la unión del anticuerpo conjugado de Bio-Rad. (Imagen modificada de BioRender¹⁷⁸)

Con los resultados RLU de cada uno de los hibridomas ensayados y con el valor RLU del mAB EB-A2 conjugado aplicado directamente sobre la placa, se calculó el porcentaje de inhibición para cada uno de los hibridomas. De tal forma que aquellos hibridomas con menores señales RLU fueron los que más inhibieron al mAB conjugado y, por tanto, los que más se asemejan al mAB EB-A2. Mayores señales RLU fueron indicativas de que el hibridoma va dirigido frente a distintos epítomos que el mAB EB-A2.

El cálculo del porcentaje de inhibición para cada uno de los hibridomas se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \frac{100 \times RLU \text{ Hibridoma} + mAB \text{ BioRad}^*}{RLU \text{ mAB BioRad}^*}$$

* mAB BioRad *: mAB conjugado kit ELISA Platelia *Aspergillus* Ag (BioRad)

19.4. ESTUDIO DE AVIDEZ DE HIBRIDOMAS.

El estudio de la avidéz tiene como objetivo analizar la interacción de los epítomos de un antígeno con los sitios de unión del anticuerpo. En serología, el análisis de la avidéz de anticuerpos IgG frente a un antígeno ayuda a diferenciar entre una infección aguda o pasada.

La técnica consiste en aplicar por duplicado cada muestra de tal forma que a una réplica se le aplica una solución de disociación y a la otra una solución control.

En este caso, una vez que los hibridomas se dispusieron frente al antígeno, fueron sometidos posteriormente a un baño con una solución de disociación de urea a 5,5 M. Finalmente, se comparó la señal obtenida por cada uno de los hibridomas sometidos a esta condición frente a la señal

obtenida con la condición control. Esta consistió en una incubación en paralelo con una solución neutra. Aquellos hibridomas susceptibles a dicha solución de disociación vieron comprometida la unión antígeno-anticuerpo dando como resultado baja avidéz (Figura 36). Aquellos que no mostraron susceptibilidad, con elevada fuerza de unión, mantuvieron su interacción con el antígeno dando como resultado alta avidéz (Figura 37).

Se eligió para el estudio el antígeno de glicoproteína ya que es frente al que se obtuvo reactividad por parte de todos los hibridomas elegidos para este análisis. El criterio seguido para la elección de los hibridomas ensayados fue su reactividad eliminando aquellos que presentaron reacción inespecífica frente a la placa sin antígeno y aquellos que se consideraron *outliers* tras aplicar el análisis previo.

El antígeno se dispuso a una concentración de 0,5 µg/ml sobre placa de CLIA. Tras el proceso de sensibilización con el antígeno seleccionado, se llevó a cabo un ensayo de avidéz. De cada uno de los hibridomas hubo dos réplicas, una de ellas fue la tratada con la solución de disociación y la otra con el tampón neutro. Los hibridomas se dispusieron en una primera incubación a 37°C durante 20 minutos sobre la placa con antígeno. Posteriormente, tras 2 ciclos de lavado, se añadió la solución de disociación o solución de urea a una de las réplicas y el tampón neutro a la otra réplica. Pasados 10 minutos a 37°C, se sometió a 3 ciclos de lavado. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario que consistió en una inmunoglobulina anti-IgG+IgM murina conjugada con peroxidasa. Sometidos a un periodo de incubación a 37°C durante 20 minutos, pasó a lavarse de nuevo, esta vez con 4 ciclos. Por último, se dispensó a partes iguales los componentes A y B que forman el sustrato enzimático quimioluminiscente.

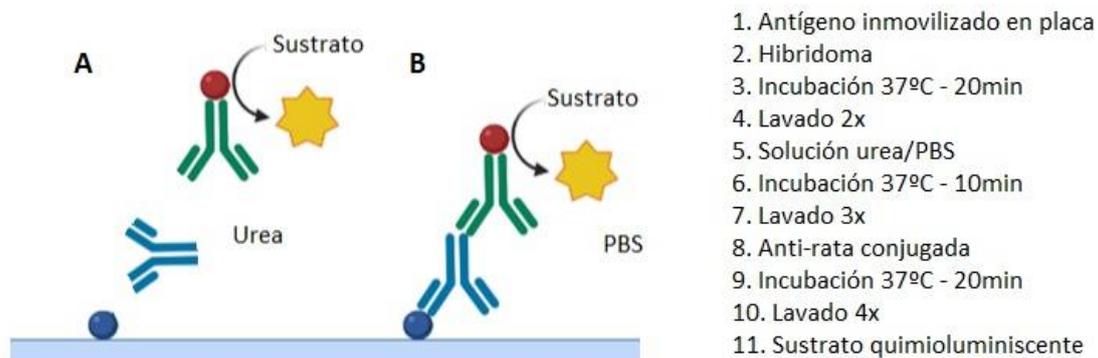


Figura 36. Esquema de los pasos a seguir en el ensayo de avidéz: avidéz baja.

A: Avidéz baja, el anticuerpo es susceptible a la solución de urea. B: condición tomada como referencia donde se aplica tampón neutro. (Imagen modificada de BioRender¹⁷⁸)

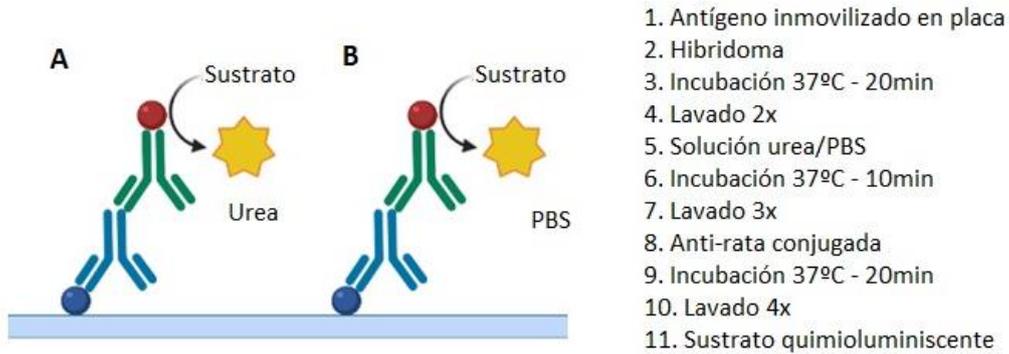


Figura 37. Esquema de los pasos a seguir en el ensayo de avidez: avidez alta.
 A: Avidez alta, el anticuerpo no es susceptible a la solución de urea. B: condición tomada como referencia donde se aplica tampón neutro. (Imagen modificada de BioRender¹⁷⁸)

El cálculo del índice de avidez se llevó a cabo a través del cociente entre el valor RLU del hibridoma sometido a la solución de urea y el valor RLU del hibridoma de la condición de referencia:

$$\text{Índice avidez} = \frac{\text{RLU Hibridoma sometido a solución de urea}}{\text{RLU Hibridoma sometido a solución neutra}}$$

Si el valor de índice de avidez fue superior a 0,5, se caracterizó como alta avidez, es decir, fuerte interacción del anticuerpo por el antígeno; si, por el contrario, el resultado fue menor a 0,5, la unión se considera débil y se definió como baja avidez.

20. PURIFICACIÓN DE LOS HIBRIDOMAS PARA LA OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

El proceso de purificación se llevó a cabo por parte del Departamento de Proteómica de VIRCELL S.L. y se basó en el aislamiento de mAB del sobrenadante de cultivo de una línea de células híbridas. Existen diferentes métodos o estrategias de purificación que se aplican según el isotipo y origen de la inmunoglobulina. En nuestro caso, el método elegido fue cromatografía de afinidad a proteína L.

La cromatografía de afinidad la forman 2 componentes. El primero es lo que se denomina como ligando y se encuentra unido a un soporte. El segundo componente complementario está contenido en la mezcla de moléculas. La unión de ambos es reversible. En muchas ocasiones hay presencia de un brazo espaciador que se encuentra unido al ligando, esto se aplica con el objetivo de evitar problemas estéricos.

A modo general, una resina preactivada es usada como soporte, haciendo pasar por esta la mezcla. Se recomienda que la velocidad del flujo sea lenta para garantizar la unión y aumentar el rendimiento; una vez hecho esto, se lleva a cabo un lavado, normalmente usando un tampón neutro,

para eliminar las moléculas restantes que no se han unido. Por último, mediante un cambio en el medio como puede ser un cambio de pH, aplicación de agentes caotrópicos y/o empleo de soluciones de alta molaridad, tiene lugar la elución de la molécula específica debido a su disociación del ligando. Si se emplea un tampón de elución con pH ácido con el objetivo de separar al mAB purificado, posteriormente se requiere recoger las fracciones en un tampón amortiguador con el objetivo de neutralizar el pH.

La purificación mediante cromatografía de afinidad a proteína L se basa en la unión de una columna compuesta por una matriz de agarosa con ligando de proteína L la cual presenta afinidad por las cadenas ligeras kappa de las inmunoglobulinas. La proteína L tiene una capacidad de unión fuerte a cualquier tipo de anticuerpo y es una proteína recombinante que se expresa en *Escherichia coli*. Estas se unen de forma covalente sobre resinas permaneciendo así inmovilizadas. La columna empleada es HiTrap Protein L, de la casa comercial Cytiva (Ref. 17547855), presentada en 2 formatos, de 1 y 5 ml de capacidad. Este tipo de columna se utiliza en sistemas de cromatografía líquida como es el caso de ÄKTA™.

La muestra debe estar acondicionada a la naturaleza que presenta el tampón de unión. Antes de comenzar el proceso de purificación se requiere que todos los tampones empleados, así como la muestra, presenten alta pureza y para ello se recomienda su filtrado por 0,45 µm. Para el lavado, el fabricante recomienda un flujo de 16 ml/min para el tipo de columna elegida y el caudal para el paso de muestra de 5 ml/min. En primer lugar, se lavó la columna con 5 volúmenes de columna con el tampón de unión, tampón fosfato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM a pH 7,2. Una vez que las condiciones de conductividad y pH se estabilizaron dentro de la columna, tuvo lugar el paso de la muestra con el caudal definido anteriormente y, por último, tuvo lugar el paso del tampón de elución, que en este caso es citrato de sodio 0,1 M, pH 2,0-3,5. Los tubos destinados a recoger las fracciones de anticuerpo purificadas, contenían 60 µl/ml de tampón Tris-HCl 1,0 M, pH 9,0 para garantizar la conservación de los anticuerpos. Una vez eluida la muestra, tuvo lugar el lavado de la columna con tampón neutro de unión usando 3 volúmenes de columna.

También puede realizarse la limpieza "in situ" de la columna (CIP) con al menos 2 volúmenes de columna de NaOH 15 mM, manteniéndola en contacto durante 10-15 minutos. Si se realiza este paso, después se requiere de nuevo su lavado con tampón neutro para que el pH quede equilibrado. El fabricante recomienda, en caso de conservación entre 2-8°C, lavar con 2 volúmenes de columna de agua destilada y, por último, etanol al 20% (v/v).

Las eluciones correspondientes al pico de actividad generado por cada hibridoma, fueron analizadas mediante dos puntos de control, por un lado, se aplicó la técnica Dot Blot con el objetivo de detectar aquellas eluciones reactivas mediante el anticuerpo secundario anti-rata, y por otro, se usó Western Blot para descartar las que presentaban restos de proteína L resultantes del proceso cromatográfico. Aquellas que cumplían presencia de anticuerpos y ausencia de restos de proteína L, fueron las evaluadas de forma conjunta mediante ensayo indirecto para definir sus características de reactividad, avidéz e inhibición, y posteriormente, para su análisis como elemento de captura y/o elemento detector en el inmunoensayo tipo sandwich.

De todos los hibridomas evaluados, se seleccionaron un total de 12 para proceder a su purificación basándonos en su comportamiento en los ensayos de reactividad, inhibición y avidéz. Se eligió, por un lado, aquellos que compartían características con el mAB EB-A2 y, por otro lado, otros que diferían del mismo con el objetivo de contemplar otras opciones en el diseño y desarrollo del inmunoensayo.

Los productos resultantes del proceso de purificación fueron recibidos para su validación y caracterización mediante inmunoensayos enzimáticos.

21. OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA INMUNOENZIMÁTICO DE CAPTURA TIPO SANDWICH.

21.1. CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PURIFICADOS.

Los mAB empleados en los siguientes ensayos fueron los elegidos mediante la caracterización previa de su correspondiente hibridoma a través de la técnica de inhibición, técnica de avidéz y mediante el análisis de reactividad frente a los antígenos purificados de distinta naturaleza y tamaño molecular.

En primer lugar, para garantizar la reactividad una vez han sido purificados, se sometieron a un ensayo indirecto donde el antígeno purificado se dispuso inmovilizado en placa y sobre el mismo se titularon los mAB purificados. Como anticuerpo secundario se empleó un conjugado anti-IgG+IgM murino marcado con peroxidasa.

Se dispuso, por tanto, una placa CLIA con antígeno purificado de naturaleza glicoproteica, otra con antígeno de >440 kDa y otra con el compuesto únicamente por proteína. Fueron diluidos en tampón neutro, PBS, a la concentración de 0,5 µg/ml. Los tipos de antígeno se eligieron en función de la reactividad encontrada frente al mismo por parte de cada uno de los hibridomas ensayados en la etapa anterior. Tras una incubación durante toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda, se sometió a un proceso de lavado consistente en 4 ciclos con el objetivo de eliminar la parte de antígeno que no se ha unido a la placa. Una vez hecho esto, la placa se sometió a un proceso de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Pasado este periodo, se retiró el bloqueante y se dejó secar durante 2 horas aproximadamente a temperatura ambiente.

Cada uno de los mAB purificados se titularon en tampón neutro con suplemento de BSA al 1% (p/v) y se dispusieron sobre la placa antigenada durante 20 minutos a 37°C. Pasado este periodo de incubación, la placa se sometió a 4 ciclos de solución de lavado y a continuación, se añadió la globulina anti-IgG+IgM murina conjugada. Esta reacción tuvo lugar a 37°C durante 20 minutos. Completada esta segunda etapa, tras otro proceso de 4 ciclos de lavado, se añadió sustrato de CLIA. Este se mantuvo durante un periodo de 10 minutos a 37°C. Por último, la placa fue leída en el lector de CLIA y se obtuvieron valores de RLU.

Otro aspecto de gran importancia que ya se analizó en su formato hibridoma fue la similitud que presentan los mAB propios con respecto al mAB EB-A2 en cuanto a reactividad frente a antígeno de alto y bajo peso molecular y al antígeno formado por la unión de galactomanano y proteína. En este caso, cada tipo de antígeno se dispuso inmovilizado en placa de CLIA. La concentración definida para el ensayo fue de 0,5 µg/ml. La primera etapa del ensayo indirecto se basó en la incubación de los mAB propios sin conjugar con peroxidasa a la concentración de 10 µg/ml, diluidos en PBS con BSA al 1% (p/v). La segunda etapa consistió en la incubación del mAB EB-A2 conjugado. Finalmente, con sustrato de CLIA, se cuantificó la luz emitida en cada condición.

Un pocillo control es el que alberga el mAB EB-A2 conjugado con peroxidasa, este pocillo no ha sido ocupado previamente por ningún otro. Para evitar que ese pocillo esté en seco en la primera incubación, se dispuso sobre él tampón PBS con BSA al 1% (p/v).

La reducción de señal de cada condición con respecto a la señal aportada por el monoclonal EB-A2 se tradujo en un porcentaje de inhibición aportado por cada mAB frente a cada tipo de antígeno. Tal y como se ha mencionado anteriormente, esto puede significar la reacción de los anticuerpos propios frente al mismo determinante antigénico que el monoclonal comercial.

El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \frac{100 \times RLU \text{ mAB purificado} + \text{mAB BioRad}^*}{RLU \text{ mAB BioRad}^*}$$

* mAB BioRad: mAB conjugado kit ELISA Platelia *Aspergillus* Ag (Bio-Rad)

A continuación, y relacionado con el ensayo anterior, se buscó analizar la similitud entre los propios mAB purificados. Estos se sometieron a un ensayo de inhibición donde se enfrentaron cada uno de ellos al resto de tal forma que se obtuvieron 144 combinaciones. Se trata de un ensayo no competitivo ya que la técnica consiste en dos pasos de incubación independientes. El antígeno usado para este ensayo fue el de alto peso molecular, es decir >440 kDa. Se decidió usar este tipo de antígeno ya que es aquel sobre el que se obtuvo mayor reactividad por parte de la mayoría de los hibridomas.

La placa fue sensibilizada con antígeno de alto peso molecular, >440 kDa, a concentración de 0,5 µg/ml según el protocolo de sensibilización habitual. Tras el proceso de bloqueo, la placa se dispuso para su montaje donde en una primera incubación se dispusieron los mAB purificados a la concentración de 10 µg/ml diluidos en tampón neutro con suplemento de BSA al 1% (p/v). Tras 20 minutos a 37°C y tras el proceso de 4 ciclos de lavado, la placa se sometió a los mismos mAB, en este caso, conjugados con peroxidasa. De este modo, actuaron como anticuerpos secundarios y revelaron la reacción tras la formación, en mayor o menor medida, de complejos antígeno-anticuerpo. Estos se presentaron a 1 µg/ml según la concentración inicial de mAB en PBS con BSA al 1% (p/v). Tras el segundo periodo de incubación de 20 minutos a 37°C y proceso de 4 ciclos de lavado, se dispensaron a partes iguales los componentes del sustrato de CLIA y se mantuvieron durante 10 minutos a 37°C. Por último, la placa se leyó en el luminómetro.

Mediante la señal RLU obtenida en cada una de las combinaciones y usando también la señal del pocillo control en cada caso, se calculó el porcentaje de inhibición para cada uno de los mAB frente al antígeno de alto peso molecular mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \frac{100 \times RLU \text{ mAB purificado} + \text{mAB purificado (CL - H)}}{RLU \text{ mAB purificado (CL - H)}}$$

CL-H: mAB purificado conjugado con peroxidasa.

21.2. DISEÑO DEL SISTEMA DE CAPTURA TIPO SANDWICH BASADO EN QUIMIOLUMINISCENCIA.

Todos los ensayos realizados anteriormente han servido para caracterizar cada uno de los mAB teniendo presente las características del mAB EB-A2. En el proceso de diseño y desarrollo del sistema, se usó el kit de ELISA Platelia *Aspergillus* Ag y sus reactivos como elementos de referencia.

Los ensayos que se plantean a continuación se basan en un sistema de captura tipo sandwich. El mAB purificado se dispone inmovilizado en la placa de CLIA. Tras el proceso de sensibilización, bloqueo y secado, la placa está lista para usarse. Sobre ella se dispone un determinado antígeno purificado y/o muestras reales. Pasado el tiempo de la primera incubación, se presenta el mAB purificado conjugado con peroxidasa que es el encargado de cerrar el sistema. Este mAB, ayudado de la enzima, es el responsable de emitir luz una vez que la mezcla de peróxido de hidrógeno y luminol entren en contacto con él (Figura 38).

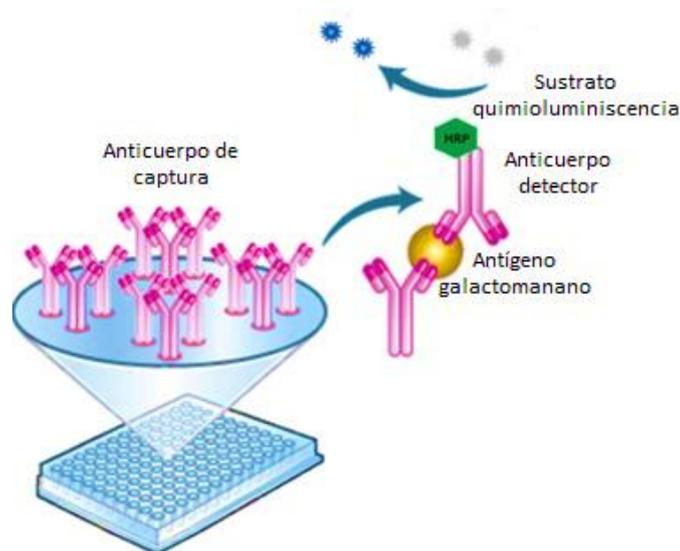


Figura 38. Esquema de ensayo de captura tipo sandwich. (Imagen modificada de Liu y colaboradores¹⁸⁵)

El esquema del ensayo de captura tipo sandwich se describe a continuación:

1. Se dispuso la placa sensibilizada con el mAB purificado a una determinada concentración.
2. Incubación de antígeno y/o muestras a 37°C durante 20 minutos. Señalar que los tiempos de incubación fueron estudiados para elegir los óptimos en cuanto a la discriminación entre muestras negativas y positivas.
3. Proceso de lavado: 4 ciclos con solución PBS pH 7,2 con suplemento de Tween 20 al 0,05% (v/v).
4. Incubación mAB purificado conjugado con peroxidasa a una determinada concentración a 37°C durante 20 minutos. Al igual que en el punto 2, los tiempos de incubación fueron estudiados en esta etapa para elegir el óptimo en cuanto a la discriminación entre muestras negativas y positivas.
5. Proceso de lavado: 4 ciclos con solución PBS pH 7,2 con suplemento de Tween 20 al 0,05% (v/v).
6. Incubación sustrato CLIA durante 10 minutos a 37°C. El tiempo de incubación está establecido en 10 minutos. Esto se sustenta por la experiencia ya que se usa en todas las referencias de la línea VirClia de VIRCELL S.L. Tal y como se estudió, tras este periodo de tiempo, la señal de luz emitida comienza a agotarse.
7. La lectura se llevó a cabo en un luminómetro y los resultados obtenidos fueron expresados en RLU.

En la primera etapa, se usó el mAB EB-A2 como mAB de referencia. Para ello, se usaron placas sensibilizadas con los mAB purificados propios y la placa proporcionada por Bio-Rad. Y, además, tanto los mAB propios como el mAB EB-A2 se analizaron conjugados como elementos de detección.

Un primer ensayo consistió en diseñar y evaluar el sistema de captura usando todos los mAB purificados inmovilizados en placa de forma individual. Como anticuerpo detector, se usó el mAB EB-A2 conjugado con peroxidasa.

El proceso de sensibilización de placa consistió en los mismos pasos descritos previamente. El ensayo de captura consistió en disponer en placa cada mAB purificado de forma individual a 1µg/ml. El antígeno fue el que se tituló ensayando 3 concentraciones. Un pocillo fue destinado para el blanco de la reacción. El tipo de antígeno que se tituló en cada caso fue aquel sobre el que cada mAB purificado presenta reacción. La dilución del antígeno se llevó a cabo en tampón neutro con suplemento de BSA al 1% (p/v). Como anticuerpo detector se empleó el mAB conjugado EB-A2, este se dispuso diluido en PBS con BSA al 1% (p/v) con el objetivo, como siempre, de reducir el fondo aportado en la reacción.

Invirtiendo el sistema, en un segundo ensayo, se pasó a analizar la capacidad de detección por parte de cada mAB purificado. En este caso se empleó como mAB de captura el mAB aportado en el kit de Bio-Rad, por tanto, para realizar el ensayo se requirió la placa de Bio-Rad. En este caso, se desconocen las condiciones de sensibilización. El antígeno seleccionado para este ensayo fue el antígeno de glicoproteína, este se diluyó en tampón neutro con suplemento de BSA al 1% (p/v) a una concentración única determinada. Otro pocillo fue el denominado "blanco" con el objetivo de

analizar el fondo de reacción aportado por cada uno de los mAB conjugados con peroxidasa frente a dicha placa. Tras la primera etapa de incubación de 1 hora a 37°C y posterior lavado para eliminar los restos no unidos, se incubó el anticuerpo detector en una segunda etapa durante 30 minutos a 37°C. Trascurrido este tiempo, tras el segundo proceso de lavado, se aplicó sustrato colorimétrico. Pasados 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad se procedió a la lectura en un espectrofotómetro.

A continuación, una vez analizado el sandwich usando el mAB EB-A2 como complementario, las placas fueron sensibilizadas con cada uno de los mAB de forma individual a una concentración de 1 µg/ml diluidos en PBS pH 7,2. Una vez pasado el proceso de sensibilización y bloqueo descrito anteriormente, se dispusieron sobre la placa cuatro tipos de antígeno a una única concentración diluidos en PBS-BSA 1% (p/v): antígeno de glicoproteína, antígeno de galactomanano de bajo y alto peso molecular y antígeno exclusivamente proteico. Se dejó un quinto pocillo con tampón PBS-BSA 1% (p/v) sin adición de antígeno que actuó como “blanco”. Cada uno de los sistemas de captura se completó con el mismo mAB que se dispone en placa y con el resto, en este caso, conjugados con peroxidasa. De esta manera, los 12 mAB purificados seleccionados se evaluaron como elementos de captura y como elementos detectores en el sistema. Para el análisis de los resultados se empleó el cálculo de la ratio señal/fondo derivado de la señal aportada por cada tipo antígeno (señal) y por el valor del pocillo que actúa como blanco (fondo).

$$\text{Ratio } S/F = \frac{\text{Promedio RLU positivos o concentración de antígeno}}{\text{Promedio RLU negativos o blanco}}$$

A mayor valor de ratio S/F, mejor tasa de discriminación entre el fondo de la señal y las concentraciones de antígeno evaluadas. Debido al reducido tamaño muestral (N=4), no pudo aplicarse ningún test estadístico seleccionándose como pareja de mAB óptima aquella opción donde se obtuvo la mayor ratio S/F.

21.2.1. DISEÑO Y DEFINICIÓN DEL SOPORTE SÓLIDO DEL SISTEMA.

En primer lugar, se trató de definir el tipo de placa y la solución de bloqueo adecuada con el objetivo de conseguir una buena discriminación entre la señal aportada por las muestras positivas y la señal aportada por las muestras negativas.

Teniendo de antecedente el tipo de placa usado en la línea de VirClia, se evaluaron distintos tipos de plástico de diferentes casas comerciales (Tabla 16) con el objetivo de obtener una adecuada discriminación, así como un límite de detección que se aproximara al obtenido por Bio-Rad.

Tabla 16. Tipo de placas de CLIA.

	Thermo Tipo Maxisorp	Thermo Tipo Polysorp	Greiner Bio One Tipo 1	Greiner Bio One Tipo 2
Ref. producto	463201	463200	705092	705091
Técnica	CLIA	CLIA	CLIA	CLIA
Característica de unión	Hidrófilo	Hidrófobo	Alta	Media
Tipo de unión	Adsorción	Adsorción	Adsorción	Adsorción
Color	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
Material	Poliestireno	Poliestireno	Poliestireno	Poliestireno

En cuanto a las placas de Thermo Scientific™, MaxiSorp se caracteriza por presentar una superficie modificada cargada con alta afinidad por moléculas con grupos polares o hidrofílicos. Debido a esto, se recomienda para ensayos de captura tipo sandwich por ofrecer una elevada sensibilidad. La superficie PolySorp es más hidrófoba y presenta afinidad por otro tipo de moléculas, aunque también se evalúa en este caso ya que no contamos con experiencia en técnicas de detección de antígeno. Respecto a las placas de Greiner Bio-One, ambas presentan capacidad de adsorción por parte de proteínas, pero dentro de las mismas hay diferencia entre las de alta y media capacidad de unión. Lo común a todas ellas es su color blanco característico para su uso en mediciones de luminiscencia y la naturaleza de su tipo de plástico, poliestireno.

Cada tipo de placa se analizó en un ensayo de captura tipo sandwich donde el mAB purificado se dispuso inmovilizado en placa. A continuación, se dispuso el antígeno de bajo peso molecular dispuesto a varias concentraciones, después el elemento detector del sistema y finalmente el sustrato quimioluminiscente.

Además de analizar la capacidad de discriminación por parte del mAB en cada tipo de plástico, se realizó un estudio, donde el mAB se dispuso a diferentes concentraciones con el objetivo de determinar la capacidad o condiciones de saturación que presenta el sistema.

Una vez establecido el tipo de placa y la concentración óptima del mAB, se ensayaron diferentes soluciones bloqueantes con la finalidad de mejorar la capacidad de detección y/o discriminación de la técnica de captura. El proceso de bloqueo tiene como fundamento ocupar todas aquellas regiones de la placa que no han sido ocupadas por el mAB para reducir al mínimo la opción de que exista reacción inespecífica por parte de la muestra frente a la placa o de otro elemento que forme parte del sistema. La solución diseñada debe instalarse en todas aquellas regiones libres y debe garantizar la conservación de la placa a lo largo del tiempo para que sea posible su comercialización sin que la materia prima inmovilizada en la misma sufra ninguna alteración.

Para ello, basándonos en la composición de la solución base de bloqueante reflejada en numerosas referencias bibliográficas, consistente en emplear BSA en un tampón neutro, se estudió este tipo de bloqueo, así como soluciones bloqueantes comerciales de la casa Surmodics (Tabla 17).

Tabla 17. Soluciones bloqueantes.

	Bloqueante 1	Bloqueante 2	Bloqueante 3	Bloqueante 4	Bloqueante 5
Nombre	N/A	StabilCoat	StabilGuard	StabilGuard	StabilBlock
Referencia	N/A	SC01	SG01	SG02	ST01
Proteína	Bovina 4%(p/v)	Bovina	Ninguna	Ninguna	Libre de BSA
Tampón	PBS	PBS	PBS	PBS	MOPS
Rango de pH	7,0-7,4	7,0-7,4	7,0-7,4	6,6-7,2	6,5-7,5

Tras el proceso de sensibilización de la placa con el mAB purificado, se procedió al bloqueo, dicho proceso tiene una duración de 2 horas a temperatura ambiente. Tras esto se llevó a cabo el secado de la placa a temperatura ambiente durante 2 horas aproximadamente.

Una vez preparadas, se llevó a cabo el ensayo de captura siguiendo el esquema definido en ensayos anteriores:

1. Incubación de antígeno de bajo peso molecular a 0,5 µg/ml diluido en tampón PBS-BSA 1% (p/v) a 37°C durante 20 minutos.
2. Proceso de lavado: 4 ciclos con solución PBS pH 7,2 con Tween 20 al 0,05% (v/v).
3. Incubación mAB purificado conjugado con peroxidasa a 1/5000 a 37°C durante 20 minutos.
4. Proceso de lavado: 4 ciclos con solución PBS pH 7,2 con Tween 20 al 0,05% (v/v).
5. Incubación sustrato CLIA durante 10 minutos a 37°C.
6. Lectura en luminómetro. Obtención de resultados expresados en RLU.

Cada uno de los ensayos descritos previamente aportó un conjunto de valores RLU para cada condición evaluada. Se llevó a cabo un análisis de la ratio señal/fondo derivado de la señal aportada por las muestras negativas y positivas y/o por la condición con antígeno y el blanco o fondo de reacción. Para ello se usó la fórmula anteriormente comentada:

$$\text{Ratio S/F} = \frac{\text{Promedio RLU positivos o concentración de antígeno}}{\text{Promedio RLU negativos o blanco}}$$

En este tipo de ensayos, además de obtener señales elevadas en las muestras positivas, se busca que el fondo de reacción sea lo más reducido posible. Para ello, es de vital importancia analizar la proporcionalidad que guarda la señal aportada por los negativos y la señal aportada por los positivos.

En aquellos casos donde se evaluaron muestras reales, se realizó también el cálculo de “cut off” o punto de corte teórico (CO teórico) con el objetivo de obtener un valor que se emplee para normalizar los valores RLU obtenidos en la técnica CLIA manual. El CO teórico viene dado por la siguiente fórmula:

$$CO \text{ teórico} = \text{Promedio RLU muestras negativas} + (3 \times \sigma \text{ RLU muestras negativas})$$

σ : desviación estándar

Aplicar tres desviaciones estándar se hace con el objetivo de representar en dicha fórmula el 99,7% de la población que se estudia¹⁷².

Cada valor RLU se dividió entre el CO teórico dando lugar a lo que definimos como “Señal/CO”. El conjunto de estos resultados, es el que se sometió al análisis estadístico en aquellos casos donde el tamaño muestral así lo permita.

$$\text{Señal/CO} = \frac{\text{RLU muestra negativa o positiva}}{\text{Valor CO teórico}}$$

Se aplicó el test no paramétrico Wilcoxon, también conocido como prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Este compara el rango medio de dos muestras relacionadas dando lugar a la significancia estadística entre ambas. Este test es similar al de t de Student y se emplea cuando no puede asumirse normalidad en el conjunto de datos. Los datos sometidos al test fueron los ratios “Señal/CO” del conjunto de muestras. A través del análisis del p-valor, que ayuda a diferenciar si los resultados obtenidos son productos del azar o son estadísticamente significativos, se aceptó o rechazó la hipótesis nula definida.

En cuanto a la representación gráfica, se muestran diagramas de líneas para analizar la tendencia de cada una de las condiciones evaluadas y, mediante diagramas de cajas y bigotes, la dispersión de los datos. La información de estos últimos viene dada por los cuartiles (Q1 y Q3), el valor de la mediana (Q2), el RIC y valores máximos y mínimos que engloban los valores admisibles (Q1-1,5RIC y Q3+1,5RIC). Asimismo, también son representados los valores que se extienden más allá de los bigotes los cuales son denominados valores atípicos o *outliers*.

Además de la capacidad de discriminación proporcionada por la concentración a la que se emplea el mAB y la solución bloqueante, es imprescindible que la placa permanezca estable a lo largo del tiempo. Para ello, se realizó un estudio de estabilidad forzada consistente en disponer la placa sensibilizada con el mAB y bloqueada a 37°C y a 4°C durante 12 días¹⁸⁶. La placa que se mantuvo a 37°C fue la placa sometida a la condición forzada y la placa que se mantuvo a 4°C actuó como referencia. Una vez cumplido el tiempo, ambas placas fueron evaluadas en paralelo. A continuación, se calculó el porcentaje de caída de señal respecto a los valores RLU obtenidos de la condición sometida a 37°C vs. la condición tomada como referencia.

$$\% \text{ caída señal} = 100 - \frac{100 \times \text{RLU } 37^\circ\text{C } 12 \text{ días}}{\text{RLU } 4^\circ\text{C } 12 \text{ días}}$$

El requerimiento establecido para la condición forzada es obtener un porcentaje de caída de señal igual o inferior al 20% con respecto a la condición control.

21.2.2. DISEÑO Y DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA EL ELEMENTO DETECTOR DEL SISTEMA.

Una vez definidos los componentes del soporte sólido del sistema y teniendo el elemento de captura seleccionado, pasamos a establecer las condiciones óptimas que garanticen una adecuada discriminación entre negativos y positivos por parte del conjunto. Es importante garantizar un ruido de fondo bajo y un límite de detección elevado. Para ello se estudiaron una serie de soluciones tamponadas con diferentes aditivos en las cuales va diluido el mAB conjugado con peroxidasa.

En primer lugar, se procedió a la conjugación con peroxidasa del mAB seleccionado, para ello se siguió el protocolo de marcaje con peroxidasa empleado habitualmente en VIRCELL S.L. basado en la activación de la misma con periodato sódico¹⁸⁷⁻¹⁸⁹.

La proteína objeto de conjugación debe presentar una concentración igual o superior a 2 mg/ml, si no es así, debe concentrarse mediante membrana de diálisis y carboximetilcelulosa hasta llegar a la concentración requerida. La proteína se dializó antes de ser conjugada frente a tampón carbonato pH $9,6 \pm 0,1$, el volumen de diálisis fue como mínimo 10 veces el volumen de la proteína. Se realizaron 4 cambios de tampón durante 4 días a una temperatura entre 2-8°C.

Se calcularon los mg de proteína mediante su concentración y el volumen del que se disponía. La relación seguida para la conjugación fue la siguiente: 6mg de peroxidasa por cada 4,5 mg de proteína.

La peroxidasa se disolvió a razón de 1 ml de agua destilada por cada 30 mg de la misma. Para la activación se usó periodato sódico, 21,4 mg por cada ml de agua destilada. Una vez pesados y disueltos ambos, se añadió este último a razón 1/5 sobre la solución de peroxidasa. Se mantuvo en agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Para proceder a la conjugación de la proteína a la peroxidasa, se equilibró una columna PD10 Sephadex G-25 por la que se pasó la peroxidasa una vez que fue activada. Para ello, se dejó pasar por la columna 25 ml de acetato sódico 1 mM pH $4,4 \pm 0,1$ antes del paso de la peroxidasa. Una vez equilibrada se dejó pasar la peroxidasa tratada con el periodato sódico por la columna dejando que el contenido entrara por completo en la misma. A continuación, se añadió tampón acetato sódico hasta recoger la fracción de color marrón intenso que corresponde a la peroxidasa.

Antes de adicionar la peroxidasa a la proteína, se ajustó su pH añadiendo 16,7 μ l de tampón carbonato pH $9,6 \pm 0,1$ por cada ml de peroxidasa.

Una vez calculados los mg de proteína y los mg de peroxidasa que se deben añadir, se mezclaron ambos y se incubaron durante toda la noche entre 2-8°C.

A continuación, se usaron 3 soluciones:

- Trietanolamina: disuelta en agua destilada a 2 M pH $8,0 \pm 0,1$.
- Borohidruro de sodio: disuelto en agua destilada a 0,2 M pH $7,0 \pm 0,1$. Esta solución se debe preparar justo antes de añadir a la mezcla de proteína y peroxidasa.
- Glicina: disuelta en agua destinada a 1 M pH $7,0 \pm 0,1$.

Pasada la incubación de la proteína+peroxidasa, se añadió solución de trietanolamina a razón 1/10 e inmediatamente 1/8 de borohidruro de sodio. Una vez hecho esto se incubó durante 30 minutos entre 2-8°C. Pasado este tiempo, se añadió un volumen a razón 1/20 de la solución de trietanolamina y se incubó durante 90 minutos entre 2-8°C. Por último, se añadió glicina a 1/40.

Con el objetivo de eliminar los restos de reactivos que no hayan reaccionado, se realizó una diálisis en membrana de 12 kDa en tampón PBS pH $7,2 \pm 0,1$. Se llevaron a cabo 2 cambios durante 2 días a temperatura entre 2-8°C. Para asegurar la conservación, se añadió Proclin® a una concentración final de 0,1% (v/v).

Una vez obtenido el mAB conjugado, se verificó su funcionalidad mediante ensayo de CLIA directo mediante análisis de su reactividad frente a antígeno de bajo y medio peso molecular.

El ensayo directo consistió en:

1. Se dispuso una placa sensibilizada con antígeno de bajo peso molecular, <13 kDa, y antígeno de medio peso molecular, 75-29 kDa, a una concentración de 0,5 µg/ml. Otra placa fue sensibilizada con tampón neutro sin antígeno con el objetivo de analizar el ruido de fondo aportado por el mAB conjugado con peroxidasa. Tras el proceso de sensibilización, bloqueo y secado, la placa se encuentra disponible para su uso.
2. Incubación mAB purificado conjugado con peroxidasa a tres títulos diluidos en un tampón PBS con BSA al 1% (p/v). El proceso de incubación se llevó a cabo a 37°C durante 20 minutos.
3. Proceso de lavado: 4 ciclos con solución PBS pH 7,2 con Tween 20 al 0,05% (v/v).
4. Incubación sustrato CLIA durante 10 minutos a 37°C.
5. Lectura en luminómetro. Obtención de resultados expresados en RLU.

Una vez analizada la solución habitual empleada para diluciones de conjugado, se procedió a realizar un nuevo ensayo directo donde se analizaron diferentes diluyentes de conjugado de la casa comercial Surmodics (Tabla 18).

Tabla 18. Soluciones para la dilución de anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa.

	Diluyente 1	Diluyente 2	Diluyente 3	Diluyente 4	Diluyente 5
Nombre	N/A	StabilZyme	StabilZyme Select	StabilZyme Noble	StabilZyme Protein-Free
Referencia	N/A	SZ02	SZ03	SZ04	SZPF
Proteína	Bovina	Bovina	Bovina	Libre de BSA	Ninguna
Tampón	PBS	MOPS	Ninguno	MOPS	MOPS
Rango de pH	7,0-7,4	6,2-6,7	6,5-7,5	6,0-7,0	6,3-7,3

Para ello se dispuso el antígeno inmovilizado en placa, en este caso se analizaron antígenos purificados de varios pesos moleculares y el antígeno formado por proteína+galactomanano. En este ensayo se usó de nuevo como blanco una placa sensibilizada con tampón neutro que siguió los mismos pasos del proceso de inmovilización, bloqueo y secado que la placa antigenada.

El ensayo de CLIA de tipo directo consistió en los siguientes pasos:

1. Se dispuso una placa sensibilizada con antígeno de alto peso molecular, >440 kDa, medio peso molecular, 75-29 kDa, bajo peso molecular, <13 kDa, y antígeno de glicoproteína (GP), a una concentración de 0,5 µg/ml. La placa sensibilizada con tampón neutro sin antígeno se dispuso con el objetivo de analizar el ruido de fondo. Tras el proceso de sensibilización, bloqueo y secado, la placa se encuentra disponible para su uso.
2. Incubación mAB purificado conjugado con peroxidasa a 1/5000 en los diferentes tampones que se detallan en la tabla 18. El proceso de incubación se llevó a cabo a 37°C durante 20 minutos.
3. Proceso de lavado: 4 ciclos con solución PBS pH 7,2 con Tween 20 al 0,05% (v/v).
4. Incubación sustrato CLIA durante 10 minutos a 37°C.
5. Lectura en luminómetro. Obtención de resultados expresados en RLU.

El ensayo de captura realizado constó de los siguientes pasos:

1. Se dispuso la placa sensibilizada con el mAB purificado a una concentración de 2 µg/ml.
2. Incubación de las muestras a 37°C durante 20 minutos.
3. Proceso de lavado: 4 ciclos con solución PBS pH 7,2 con Tween 20 al 0,05% (v/v).
4. Incubación mAB purificado conjugado con peroxidasa a un título de 1/5000 dispuesto en los diferentes diluyentes de conjugado detallados en la tabla que se mostró anteriormente. La incubación se realizó a 37°C durante 20 minutos.
5. Proceso de lavado: 4 ciclos con solución PBS pH 7,2 con Tween 20 al 0,05% (v/v).
6. Incubación sustrato CLIA a 37°C durante 10 minutos.
7. Lectura en luminómetro. Obtención de resultados expresados en RLU.

Se llevó a cabo un análisis de la ratio señal/fondo derivado de la señal aportada por las muestras negativas y positivas y/o por la condición con antígeno y el fondo de reacción. Para ello se puso en práctica la fórmula anteriormente citada:

$$\text{Ratio S/F} = \frac{\text{Promedio RLU positivos o concentración de antígeno}}{\text{Promedio RLU negativos o blanco}}$$

Además, en aquellos casos donde se evaluaron muestras reales, se realizó el cálculo de cut off teórico con el objetivo de obtener un valor que se empleó para normalizar los valores RLU obtenidos en la técnica CLIA manual.

$$CO \text{ teórico} = \text{Promedio RLU muestras negativas} + (3 \times \sigma \text{ RLU muestras negativas})$$

σ : desviación estándar

Cada valor RLU se dividió entre el CO teórico y el conjunto de estos resultados fue el que se sometió al análisis estadístico.

$$\text{Señal/CO} = \frac{\text{RLU muestra negativa o positiva}}{\text{Valor CO teórico}}$$

Se empleó el test de Wilcoxon el cual aporta información acerca de la significancia estadística. Dicho test se aplicó sobre los valores de ratio Señal/CO obtenidos para el conjunto de muestras.

En cuanto a la representación gráfica, se usaron diagramas de líneas para analizar la tendencia de cada una de las condiciones evaluadas y, mediante diagramas de cajas y bigotes, la distribución de los datos.

Una vez obtenido el mejor tampón para diluir el mAB conjugado con peroxidasa, se realizó un ensayo de estabilidad forzada con el objetivo de garantizar que dicho anticuerpo fuese capaz de mantener su estructura y/o funcionalidad en el transcurso del tiempo.

El ensayo de estabilidad forzada busca imitar la vida útil del kit. Este consistió en diluir el mAB conjugado en el tampón seleccionado y mantenerlo a 37°C y 4°C durante 12 días. La conservación a 4°C, durante el mismo periodo de tiempo, fue la condición tomada como referencia.

Las condiciones objeto de estudio fueron ensayadas en un ensayo directo donde se analizó la reacción del mAB conjugado frente a una placa sensibilizada con antígeno de bajo peso molecular. Este ensayo aporta menor variabilidad que un ensayo de captura tipo sandwich por la simplicidad de sus pasos y garantiza un mejor análisis de la pérdida de señal de la condición sometida a 37°C durante 12 días respecto a la de 4°C durante el mismo periodo de tiempo¹⁸⁶.

Los pasos de la técnica fueron:

1. Se dispuso la placa sensibilizada con el antígeno de bajo peso molecular purificado, <13 kDa, a una concentración de 0,5 µg/ml.
2. Incubación mAB purificado conjugado con peroxidasa a un título de 1/5000 dispuesto en el diluyente de conjugado seleccionado. La incubación se realizó a 37°C durante 20 minutos.
3. Proceso de lavado: 4 ciclos con solución PBS pH 7,2 con Tween 20 al 0,05% (v/v).
4. Incubación sustrato CLIA a 37°C durante 10 minutos.
5. Lectura en luminómetro. Obtención de resultados expresados en RLU.

El cálculo de dicho porcentaje de caída de señal se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ caída señal} = 100 - \frac{100 \times RLU \text{ 37}^\circ\text{C 12 días}}{RLU \text{ 4}^\circ\text{C 12 días}}$$

La especificación establecida para la aceptación en este tipo de ensayos se basa en obtener un porcentaje de caída de señal igual o inferior al 20%.

21.2.3. DISEÑO Y DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LOS CONTROLES DE LA TÉCNICA.

Todo kit de diagnóstico requiere de la presencia de una serie de controles por dos motivos fundamentales: en primer lugar, actuar como testigo del adecuado funcionamiento del sistema y, por otro lado, mediante uno de ellos, el denominado calibrador, se calcula el valor de índice para cada muestra. Mediante este valor se obtiene la interpretación cualitativa de la misma. Platelia *Aspergillus* Ag (Bio-Rad) presenta 3 controles, un control negativo, un control positivo y un control cut off el cual debe testarse por duplicado. Dichos controles se someten al mismo tratamiento que el empleado para las muestras. Por cada una de las mismas se precisa del montaje de los tres controles con un gasto total de 4 pocillos.

El sistema VirClia está diseñado de tal forma que cada monodosis presenta 3 pocillos, uno de ellos alberga la muestra, otro el control calibrador y otro el control negativo. No se requiere un gasto extra de monodosis cada vez que se realice el montaje de una muestra. Gracias al valor RLU del control calibrador y al valor RLU de la muestra se obtiene el valor índice para cada una de ellas, el cálculo se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Índice} = \frac{\text{Valor RLU de la muestra}}{\text{Valor RLU control calibrador}}$$

Para dicho control calibrador se fija una especificación que debe cumplirse en el montaje de la técnica para que sea posible el cálculo del índice. Este debe presentar un valor RLU comprendido entre 2-7.

El control negativo no se usa para ningún cálculo ni se emplea para la interpretación diagnóstica de la muestra, pero sí es útil para indicar si la técnica se ha llevado a cabo de manera correcta, así como si el sistema automatizado empleado para el desarrollo de la misma está en condiciones óptimas de limpieza. Este control también presenta una especificación establecida, el valor RLU obtenido debe ser inferior a 2.

En el caso de los kits de VirClia y en este caso particular, los controles van incluidos en la monodosis y están listos para su uso.

La principal materia prima empleada para la constitución de los controles del kit fue antígeno de bajo peso molecular diluido en un tampón que se definió en los ensayos que se detallan a continuación.

El objeto del estudio consistió en titular el antígeno de bajo peso molecular en diferentes diluyentes. La concentración de antígeno con la que se obtuvo un valor de RLU dentro de la especificación establecida, es decir RLU entre 2 y 7, fue la tomada para la elaboración del calibrador del equipo. Se realizó un ensayo de estabilidad forzada a la concentración establecida en cada uno de los tampones/diluyentes empleados que consistió, tal y como se había estudiado previamente, en dividir el volumen de cada condición para disponer una parte a 37°C durante 12 días y otra a 4°C durante el mismo periodo de tiempo¹⁸⁶. Esta última fue la condición tomada como referencia.

El cálculo del porcentaje de caída de señal de la condición sometida a 37°C con respecto a la de 4°C se realizó a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ caída señal} = 100 - \frac{100 \times RLU \text{ 37}^\circ\text{C 12 días}}{RLU \text{ 4}^\circ\text{C 12 días}}$$

Los tampones y soluciones empleadas para diluir el antígeno de bajo peso molecular fueron el tampón fosfato (PB), el tampón fosfato sódico (PBS) y un suero negativo contaminado artificialmente con dicho antígeno a una determinada concentración.

Como conservantes se emplearon Neolone[®], o metilisotiazolinona, que tiene efecto microbicida, al 0,04% (v/v); y Bronidox[®], o 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano, que es un compuesto que actúa como bactericida y fungicida, empleándose también al 0,04% (v/v).

21.2.4. ANÁLISIS DE PERIODOS DE INCUBACIÓN EN EL ENSAYO DE CAPTURA TIPO SANDWICH.

El proceso del ensayo y los periodos de incubación habituales de las técnicas comercializadas de VirClia para la detección de anticuerpos IgG e IgM, ya sean ensayos de captura o indirectos, está definido en tres etapas consistentes en 20 minutos + 20 minutos + 10 minutos. Al ser técnicas automatizables, se busca que todas las referencias desarrolladas de *novo* cumplan con estos periodos de incubación o que, si al menos no cumplen el mismo patrón, los periodos presenten incrementos o disminuciones de tiempo de 20 en 20 minutos. Esto se hace con el objetivo de poder acoplar unos parámetros a otros a la hora de la automatización del proceso. Es primordial conseguir que el nuevo diseño cuente con un proceso totalmente compatible con el resto de referencias comercializadas, no sería útil conseguir un producto que presente limitaciones en cuanto a la automatización de la técnica ya que uno de los principales objetivos de su desarrollo es poder disponer de total disponibilidad a la hora de su montaje para obtener un resultado en corto periodo de tiempo.

Para ello, se estudiaron diferentes tiempos de incubación en lo que respecta a la muestra y mAB conjugado con peroxidasa con el objetivo de facilitar la captura y detección del antígeno y conseguir una óptima discriminación entre el analito y el fondo de reacción.

La técnica de captura consta de las mismas etapas detalladas con anterioridad. Lo que diferenció cada condición fue la duración del primer y segundo periodo de incubación.

Como objeto de estudio se dispuso el antígeno de bajo peso molecular, a dos concentraciones, en tampón PBS pH 7,2 con BSA al 1% (p/v). De igual modo, los distintos periodos de incubación se analizaron con muestras reales de suero. El mAB conjugado se añadió a 1/5000.

El periodo de incubación que no sufre modificaciones es el último, el del sustrato enzimático quimioluminiscente. Tal y como se mencionó con anterioridad, apoyándonos en la experiencia de su uso en el resto de referencias de la línea VirClic, se requiere que este sea en torno a 10 minutos ya que pasados estos la luz generada comienza a agotarse. Si el tiempo es menor, además de contar con una señal poco estable, el sistema automatizado no dispone de tiempo suficiente para realizar la lectura una vez que se acopla el tiempo de reacción para todas las monodosis que se procesan por cada ensayo.

Como ensayo complementario al anterior y basándose en el sistema de captura que presenta Bio-Rad, se analizó otra condición en paralelo consistente en incubar la muestra con el mAB conjugado con peroxidasa en un único paso.

Para el análisis de los diferentes periodos de tiempo, se usó el mAB definido como óptimo para actuar como elemento de captura y detector del sistema y como muestra, antígeno de bajo peso molecular y muestras reales de suero.

En la condición que consistió en un único paso, la muestra se incubó junto con el mAB peroxidado durante 40 minutos. Para el ensayo de dos pasos, la muestra se incubó durante 20 minutos y a continuación el mAB conjugado durante otros 20 minutos. El periodo de incubación para el sustrato de CLIA fue común para ambos casos.

Esquema de la técnica consistente en 1 paso:

1. Se dispuso la placa sensibilizada con el mAB purificado en PBS pH 7,2.
2. Incubación de antígeno y/o muestras junto con el mAB purificado conjugado con peroxidasa durante 40 minutos a 37°C.
3. Proceso de lavado: 4 ciclos con solución PBS pH 7,2 con Tween 20 al 0,05% (v/v).
4. Incubación sustrato CLIA durante 10 minutos a 37°C.
5. Lectura en luminómetro. Obtención de resultados expresados en RLU.

Esquema de la técnica consistente en 2 pasos:

1. Se dispuso la placa sensibilizada con el mAB purificado a una determinada concentración.
2. Incubación de antígeno y/o muestras a 37°C. Los tiempos de incubación se estudiaron para elegir el óptimo.
3. Proceso de lavado: 4 ciclos con solución PBS pH 7,2 con Tween 20 al 0,05% (v/v).

4. Incubación mAB purificado conjugado con peroxidasa a una determinada concentración. Los tiempos de incubación se estudiaron para elegir el óptimo.
5. Proceso de lavado: 4 ciclos con solución PBS pH 7,2 con Tween 20 al 0,05% (v/v).
6. Incubación sustrato CLIA durante 10 minutos a 37°C.
7. Lectura en luminómetro. Obtención de resultados expresados en RLU.

El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante el cálculo de ratio señal/fondo:

$$\text{Ratio S/F} = \frac{\text{Promedio RLU concentración de antígeno}}{\text{Promedio RLU blanco}}$$

Y se calculó el cut off teórico con el objetivo de obtener un valor que se emplee para normalizar los valores RLU obtenidos en la técnica CLIA manual.

$$\text{CO teórico} = \text{Promedio RLU muestras negativas} + (3 \times \sigma \text{ RLU muestras negativas})$$

σ : desviación estándar

Cada valor RLU se dividió entre el CO teórico y el conjunto de estos resultados fue el que se sometió al análisis estadístico.

$$\text{Señal/CO} = \frac{\text{RLU muestra negativa o positiva}}{\text{Valor CO teórico}}$$

Se empleó el test de Wilcoxon sobre los valores de ratio Señal/CO para el análisis de la significancia estadística. Se seleccionó como óptima aquella que presentó una mayor tasa de discriminación entre el fondo del sistema y la señal aportada y esta se comparó con el resto.

Al igual que en casos anteriores, los resultados se muestran mediante diagramas de líneas, para analizar la tendencia de las condiciones evaluadas, y a través de diagramas de cajas y bigotes, para analizar la dispersión de los datos.

21.2.5. MUESTRAS A EVALUAR Y TRATAMIENTO DE LAS MISMAS.

21.2.5.1. TIPOS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.

El GM, biomarcador elegido para el diagnóstico de AI, fue detectado en muestras de suero y LBA. La toma de muestras de suero y LBA se llevó a cabo siguiendo los procedimientos habituales de laboratorio donde se aplicaron todas las medidas oportunas para garantizar que las muestras estuvieran libres de cualquier contaminación del medio ambiente.

Las muestras de sangre, se recogieron en cada centro en un tubo de extracción de bioquímica sin anticoagulante, pasados 45 minutos aproximadamente, los tubos se centrifugaron a 1500 x g durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido corresponde al suero y fue el que se empleó en la determinación¹⁹⁰.

El otro tipo de muestra, LBA, se obtiene de una manera invasiva y hay que ponderar su toma en pacientes que se encuentren en estado crítico. Dicha muestra se obtiene mediante la técnica de broncoscopia. El procedimiento consiste en introducir solución salina estéril en las vías respiratorias y su posterior aspiración. Aunque no hay un protocolo estandarizado, se suele usar la instilación de unos 120 ml de solución en alícuotas de 20 a 50 ml. El volumen recuperado debe ser al menos un 15% del instilado¹⁹¹.

Un aspecto a tener en cuenta, es la conservación y almacenamiento de las muestras antes de su procesamiento. Platelia, en las instrucciones de su producto, recomienda su conservación en un rango de 2-8°C durante 5 días para aquellos tubos que aún permanecen cerrados y que no han estado expuestos al aire. Después de la primera apertura, en el caso de suero, recomiendan el procesamiento de las mismas antes de 48 horas si se conservan a 2-8°C. En el caso de LBA el periodo de tiempo se reduce a 24 horas si se conservan a 2-8°C. Si la prueba va a demorarse más, se recomienda su almacenamiento a -70/-80°C en el caso de suero y a -20°C en el caso de LBA. Una vez que la muestra ha sido procesada con la solución de tratamiento, el sobrenadante puede conservarse a 2-8°C durante 48 horas, después de dicho periodo de tiempo, el fabricante no garantiza la conservación del componente antigénico. En las instrucciones del kit de ELISA de Platelia, se afirma que las muestra puede someterse a 4 ciclos de congelación-descongelación¹¹³.

En nuestro caso, se realizaron varios estudios donde se analizó la estabilidad de las muestras mediante un ensayo de estabilidad forzada para determinar el número de ciclos de congelación-descongelación a los que pueden someterse y, por otro lado, otro basado en la estabilidad real de un conjunto de muestras reales negativas y positivas, presentando estas últimas diferentes niveles de positividad.

- Estudio estabilidad forzada ciclos congelación-descongelación.

Se emplearon 4 muestras positivas y el volumen completo de las mismas, 1,5 ml, se homogeneizó bien con ayuda de un agitador vórtex antes de comenzar la prueba. Antes de iniciar el primer ciclo de congelación, se sacó una alícuota de 300 µl de cada una de ellas en tubos roscados de 2 ml. Esa

alícuota se dispuso a 2-8°C hasta que se llevó a cabo su evaluación. Esta primera alícuota, que no sufrió ningún ciclo de congelación-descongelación, constituye el tiempo 0 y/o muestra de referencia frente a la que se comparan el resto de condiciones.

A continuación, el resto de volumen de los tubos se sometió a -80°C durante 30 minutos, transcurrido este tiempo, las alícuotas se sacaron del congelador y se dispusieron a temperatura ambiente durante 30 minutos hasta su descongelación. Una vez descongeladas, se homogeneizó el contenido de cada una con ayuda de un agitador vórtex y volvió a sacarse otra alícuota del mismo volumen que la primera, la cual constituye el tiempo/ciclo 1. Esta alícuota nueva obtenida se llevó a 2-8°C y se almacenó allí junto con la primera alícuota. Este procedimiento se repitió 3 veces más de tal forma que finalmente se consiguieron 5 alícuotas de cada una de las muestras, una que no había sido sometida a ninguna congelación y otras 4 originadas tras cada ciclo de congelación-descongelación, es decir:

1. Condición 1: Referencia, ningún ciclo congelación-descongelación.
2. Condición 2: 1 ciclo de congelación-descongelación.
3. Condición 3: 2 ciclos de congelación-descongelación.
4. Condición 4: 3 ciclos de congelación-descongelación.
5. Condición 5: 4 ciclos de congelación-descongelación.

El conjunto de alícuotas fue tratado y evaluado en paralelo en el mismo montaje para evitar así variabilidad interensayo. Una vez obtenidos los valores RLU para cada una de las muestras, se calculó el porcentaje de caída de señal que había experimentado cada una de ellas tras ser sometida a los diferentes ciclos de congelación-descongelación. La condición tomada como referencia fue la que no se había visto sometida a ningún ciclo. El cálculo del porcentaje de caída de señal se llevó a cabo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ caída señal} = 100 - \frac{100 \times RLU \text{ Condición 2}}{RLU \text{ Condición 1}}$$

$$\% \text{ caída señal} = 100 - \frac{100 \times RLU \text{ Condición 3}}{RLU \text{ Condición 1}}$$

$$\% \text{ caída señal} = 100 - \frac{100 \times RLU \text{ Condición 4}}{RLU \text{ Condición 1}}$$

$$\% \text{ caída señal} = 100 - \frac{100 \times RLU \text{ Condición 5}}{RLU \text{ Condición 1}}$$

- Estudio estabilidad real.

En este caso, muestras seleccionadas y caracterizadas previamente como positivas, se dispusieron repartidas cada una de ellas en 2 alícuotas de 300 µl y se sometieron a un almacenamiento a -80°C

durante 2 años. Una de las alícuotas se evaluó el mismo día del reparto constituyendo el tiempo 0, el resto se congelaron. Trascurridos 2 años, se descongeló la alícuota hermana de cada una de ellas y se evaluó. Los valores RLU del último montaje se compararon con los obtenidos en el montaje a tiempo 0.

Una vez obtenidos los valores RLU, se llevó a cabo el cálculo de la caída de señal expresado en porcentaje mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ caída señal} = 100 - \frac{100 \times RLU \text{ Condición} - 80^{\circ}\text{C}}{RLU \text{ Condición inicial}}$$

21.2.5.2. TRATAMIENTO.

Basándonos en las propiedades termoestables aportadas por el antígeno de galactomanano¹⁹² se realizó un tratamiento con un agente quelante aplicando calor con lo que se garantizaba la precipitación de proteínas contenidas en la mezcla y la disociación de inmunocomplejos.

El tratamiento empleado para las muestras, independientemente de su naturaleza, fue el descrito por Reiss y colaboradores¹⁹³ en su trabajo de extracción de antígeno de manano de *Candida tropicalis*. Este procedimiento fue empleado por Bio-Rad y por numerosas técnicas de diagnóstico como, por ejemplo, las de flujo lateral. En todas ellas se definen los mismos pasos para proceder usando una solución de tratamiento con EDTA, ácido etilendiaminetetraacético. La solución de tratamiento está lista para uso y el protocolo definido es el siguiente:

1. A muestras de suero, plasma y LBA se les añadió la solución de EDTA en proporción ¼, es decir, por cada 300 µl de muestra, se empleó 100 µl de solución de tratamiento.
2. Una vez obtenida la mezcla se procedió a su homogeneización en vórtex.
3. Las muestras homogeneizadas se dispusieron en un termobloque durante 6 minutos a 120°C o durante 5 minutos en baño termostatzado a 100°C.
4. Pasado el tiempo de incubación, las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 10000 x g.
5. El sobrenadante obtenido tras el tratamiento fue el que se evaluó en la técnica.

A pesar del protocolo definido y manteniendo este como referencia, se planteó obtener un tratamiento de la muestra donde se prescindiera del paso de ebullición, de centrifugación o de ambos y se obtuvieran resultados similares. Esto se hizo con el objetivo de facilitar su aplicación práctica en el laboratorio.

Por un lado, se aplicó tripsina de forma individual y EDTA sobre las muestras. El EDTA, con fórmula molecular C₁₀H₆N₂O₈, es un agente quelante que se usa en laboratorios para desactivar metaloproteínas, proteínas o polisacáridos. La tripsina es una enzima que rompe enlaces peptídicos con el objetivo de obtener péptidos de menor tamaño, y cuya temperatura óptima de actuación es 37°C. Por otro lado, se ensayaron agentes como mercaptoetanol y un tampón compuesto de citrato y tampón fosfato. El 2-Mercaptoetanol, con fórmula molecular HOCH₂CH₂SH, se emplea para reducir

puentes disulfuro y se caracteriza por su naturaleza antioxidante. En cuanto al tampón citrato y fosfato, el primero es una mezcla de ácido cítrico, sales y citrato de sodio y el segundo, contiene hidrógeno fosfato (HPO_4^{2-}) y dihidrógeno fosfato (H_2PO_4^-). Los dos últimos, junto con la solución que presenta EDTA, fueron estudiados sobre las muestras bajo el efecto del proceso de ebullición y centrifugación y sin ellos. Los tampones con la composición mencionada se aplicaron sobre muestras reales caracterizadas previamente a través del kit de Bio-Rad como negativas y positivas.

Las condiciones evaluadas fueron:

1: Tripsina + EDTA, ambos empleados en proporción 1:1 y dispuestos sobre la muestra a proporción $\frac{1}{4}$. La mezcla se sometió a 37°C durante 20 minutos.

2: Tripsina + EDTA, ambos empleados en proporción 1:1 y dispuestos sobre la muestra a proporción $\frac{1}{4}$. La mezcla se sometió a temperatura ambiente durante 20 minutos.

3: Tripsina dispuesta sobre la muestra a proporción $\frac{1}{4}$. La mezcla se sometió a 37°C durante 20 minutos.

4: Tripsina dispuesta sobre la muestra a proporción $\frac{1}{4}$. La mezcla se sometió a temperatura ambiente durante 20 minutos.

5: Tampón neutro con EDTA al 4% (p/v) al cual se añadió 2-Mercaptoetanol en proporción 1:1, la mezcla se añadió sobre las muestras a proporción $\frac{1}{4}$, incubación a 37°C durante 20 minutos.

6: 2-Mercaptoetanol añadido sobre las muestras en proporción $\frac{1}{4}$, incubación a 37°C durante 20 minutos.

7: Mezcla de tampón citrato y tampón fosfato a pH 2,3, se añadió a proporción $\frac{1}{4}$ sobre las muestras y se mantuvo a 37°C durante 20 minutos.

8: Tampón neutro con EDTA al 4% (p/v) al cual se añadió 2-Mercaptoetanol en proporción 1:1, la mezcla se añadió sobre las muestras a proporción $\frac{1}{4}$, incubación 120°C durante 6 minutos y centrifugación a $10000 \times g$ durante 10 minutos.

9: 2-Mercaptoetanol añadido sobre las muestras en proporción $\frac{1}{4}$, incubación 120°C durante 6 minutos y centrifugación a $10000 \times g$ durante 10 minutos.

10: Mezcla de tampón citrato y tampón fosfato a pH 2,3, se añadió a proporción $\frac{1}{4}$ sobre las muestras, incubación 120°C durante 6 minutos y centrifugación a $10000 \times g$ durante 10 minutos.

11: Tampón neutro con EDTA al 4% (p/v), la cual se añadió sobre las muestras a proporción $\frac{1}{4}$. La mezcla se sometió a 37°C durante 20 minutos.

12: Referencia: tampón neutro con EDTA al 4% (p/v) que se añadió a proporción $\frac{1}{4}$ sobre las muestras, incubación 120°C durante 6 minutos y centrifugación a $10000 \times g$ durante 10 minutos.

Una vez tratadas las muestras, se sometieron y evaluaron en un ensayo de captura tipo sandwich siguiendo los siguientes pasos:

1. Se dispuso la placa sensibilizada con el mAB purificado a una concentración de 2 µg/ml.
2. Incubación de las muestras tratadas a 37°C durante 20 minutos.
3. Proceso de lavado: 4 ciclos con solución PBS pH 7,2 con Tween 20 al 0,05% (v/v).
4. Incubación mAB purificado conjugado con peroxidasa. La incubación se realizó a 37°C durante 20 minutos.
5. Proceso de lavado: 4 ciclos con solución PBS pH 7,2 con Tween 20 al 0,05% (v/v).
6. Incubación sustrato CLIA a 37°C durante 10 minutos.
7. Lectura en luminómetro. Obtención de resultados expresados en RLU.

Obtenidos los resultados RLU de cada condición, se analizó el porcentaje de caída de señal de las muestras positivas y la ratio señal/fondo obtenida por cada condición frente a la condición tomada como referencia.

$$\text{Ratio } S/F = \frac{\text{Promedio RLU positivos o concentración de antígeno}}{\text{Promedio RLU negativos o blanco}}$$

$$\% \text{ caída señal muestra positivas} = 100 - \frac{100 \times \text{Promedio RLU condición a evaluar}}{\text{Promedio RLU condición de referencia}}$$

Los valores RLU se sometieron a su normalización mediante el valor de cut off teórico obtenido:

$$CO \text{ teórico} = \text{Promedio RLU muestras negativas} + (3 \times \sigma \text{ RLU muestras negativas})$$

σ : desviación estándar

En este caso, al contar con un número de muestras reducido (N=8), no fue posible el cálculo del p-valor de manera exacta. Por esta razón, se analizó la ratio señal/fondo obtenida de todas las condiciones evaluadas y el porcentaje de caída de señal en las muestras positivas con respecto a la condición de referencia. La condición 12 se denomina "Referencia" ya que el proceso de pretratamiento, así como la composición de la solución, son los descritos y usados en el kit de Bio-Rad. El estudio comparativo se realizó para cada una de las condiciones frente a la misma. Los resultados normalizados se muestran en un gráfico de líneas y la comparativa de la distribución se expresa en un diagrama de caja y bigotes.

Por otro lado, con el fin de preservar la solución de tratamiento una vez se comercialice, se estudió la adición de aditivos conservantes. La solución de tratamiento habitual consiste, como se ha mencionado anteriormente, en EDTA al 4% (p/v)¹⁹⁴ diluido en tampón neutro. Añadido a esto, se analizó una mezcla de Neolone® y Bronidox®, conservantes usados ampliamente en los kits de ELISA y VirClia comercializados por VIRCELL S.L., a una concentración de 0,04% (p/v). Por otro lado, se

empleó azida sódica a la concentración de 0,049% (p/v), concentración que no es considerada tóxica y perjudicial.

La aplicación de ambos tipos de conservantes se evaluó en un ensayo con muestras reales donde además de observar la apariencia del precipitado formado, se analizó el funcionamiento de ambas formulaciones de la solución de tratamiento.

Muestras caracterizadas previamente como negativas y positivas se trataron con ambas soluciones y se evaluaron mediante un ensayo de captura:

1. Se dispuso la placa sensibilizada con el mAB purificado a una concentración de 2 µg/ml.
2. Incubación de las muestras tratadas a 37°C durante 20 minutos.
3. Proceso de lavado: 4 ciclos con solución PBS pH 7,2 con Tween 20 al 0,05% (v/v).
4. Incubación mAB purificado conjugado con peroxidasa. La incubación será a 37°C durante 20 minutos.
5. Proceso de lavado: 4 ciclos con solución PBS pH 7,2 con Tween 20 al 0,05% (v/v).
6. Incubación sustrato CLIA a 37°C durante 10 minutos.
7. Lectura en luminómetro. Obtención de resultados expresados en RLU.

El estudio llevado a cabo se basó en el análisis del coeficiente de correlación de Pearson entre los resultados RLU obtenidos de la solución de tratamiento con la mezcla de Neolone® y Bronidox® y la solución con azida sódica.

Definida la composición de la solución de tratamiento, se llevó a cabo un ensayo con una muestra negativa y una muestra positiva donde se analizó la estabilidad del sobrenadante obtenido de las mismas una vez que habían sido tratadas. En este caso se incluyó una muestra negativa para analizar más fácilmente si, durante la conservación, hay riesgo de contaminación fúngica tras la previa manipulación de las mismas. Un volumen de 1 ml de muestra de suero se sometió al tratamiento definido anteriormente, el sobrenadante resultante se dispuso en un tubo limpio roscado de 2 ml.

Dicho sobrenadante fue evaluado a distintos tiempos:

- Condición 1: tiempo 0, evaluación de sobrenadante media hora después de ser obtenido.
- Condición 2: tras una conservación a 2-8°C durante 48 horas.
- Condición 3: tras una conservación a 2-8°C durante 1 semana.
- Condición 4: tras una conservación a 2-8°C durante 2 semanas.
- Condición 5: tras una conservación a -80°C durante 1 semana.
- Condición 6: tras una conservación a -80°C durante 2 semanas.

Una vez analizadas las muestras mediante ensayo de captura tipo sandwich, se observó que no existía un cambio en la significación cualitativa de la muestra negativa y, se notificó el porcentaje de caída de señal de la muestra positiva respecto a la condición tomada como referencia, es decir, el tiempo 0.

El cálculo se llevó a cabo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ caída señal} = 100 - \frac{100 \times RLU \text{ Condición 2}}{RLU \text{ Condición 1}}$$

$$\% \text{ caída señal} = 100 - \frac{100 \times RLU \text{ Condición 3}}{RLU \text{ Condición 1}}$$

$$\% \text{ caída señal} = 100 - \frac{100 \times RLU \text{ Condición 4}}{RLU \text{ Condición 1}}$$

$$\% \text{ caída señal} = 100 - \frac{100 \times RLU \text{ Condición 5}}{RLU \text{ Condición 1}}$$

$$\% \text{ caída señal} = 100 - \frac{100 \times RLU \text{ Condición 6}}{RLU \text{ Condición 1}}$$

Relacionada con el procedimiento de tratamiento de las muestras, está la etapa de centrifugación. Este es el mecanismo mediante el cual se separan sólidos de líquidos gracias a su diferencia de densidad gracias a una fuerza giratoria. Esto puede ser dependiente del radio de la centrifuga que se emplee influyendo en el proceso de extracción del antígeno de galactomanano. Para ello, se estudiaron dos tipos de centrífugas, una con radio máximo $6,2 \pm 0,5$ cm, denominada A, y otra con radio máximo de $4,2 \pm 0,5$ cm, denominada B; y varias velocidades de centrifugación. Se consideró que la centrífuga más común encontrada en un hospital sería similar a la de radio máximo de $4,2 \pm 0,5$ cm.

Se contó con tubos de 2 ml de capacidad de polipropileno y se prepararon 20 alícuotas de 300 μ l del mismo suero. Sobre las mismas se añadió 100 μ l de solución de tratamiento y a continuación se dispusieron de la siguiente manera:

1. 4 tubos en centrífuga A: 13000 rpm - 11735 x g - 10min
2. 4 tubos en centrífuga B: 13000 rpm - 9960 x g - 10min
3. 4 tubos en centrífuga B: 10000 rpm - 5890 x g - 10min
4. 4 tubos en centrífuga B: 8000 rpm - 3770 x g - 10min
5. 4 tubos en centrífuga B: 4000 rpm - 940 x g - 10min

El sobrenadante de cada tubo se recogió en un tubo limpio. Finalmente se realizó una medida del peso de cada tubo, también se pesó un tubo vacío y un tubo con 300 μ l de muestra + 100 μ l de solución de tratamiento. Se analizó, por peso, la cantidad de sobrenadante resultante tras el proceso de tratamiento y extracción de antígeno.

22. ANÁLISIS DEL SISTEMA DE CAPTURA TIPO SANDWICH.

Una vez definidas las condiciones óptimas a las cuales deben estar representados cada uno de los elementos que componen el sistema, se pasó a su evaluación con muestras reales. Estas fueron caracterizadas por el kit de ELISA Platelia *Aspergillus* Ag.

Consideramos de vital importancia que la evaluación de las muestras por la técnica en diseño y por la técnica de referencia se realizara de forma paralela. Se trabajó con la misma alícuota pretratada para eliminar así la variabilidad que aporta este proceso y, además, se garantice que las muestras hubieran sufrido las mismas condiciones de almacenamiento antes de someterse al estudio. Como se describió anteriormente, las condiciones de conservación de las muestras merecen ser estudiadas y si, como es el caso, se quiere realizar un estudio comparativo de dos técnicas, conviene que sean testadas de forma simultánea para eliminar factores que puedan llevar a obtener resultados falsos positivos y/o falsos negativos ocasionados por la mala conservación.

Las muestras fueron evaluadas en el kit de Platelia siguiendo los pasos reflejados en las instrucciones del fabricante. Estos se resumen a continuación:

- Tratamiento de muestras y controles siguiendo la relación:
300 µl de muestra o control + 100 µl de solución de tratamiento

El protocolo de tratamiento consistió en:

- a) Homogeneización de la muestra con la solución de tratamiento ayudándose de vórtex.
 - b) Calentamiento en bloque térmico, 6 minutos a 120°C; o en baño maría, 3 minutos a 100°C.
 - c) Centrifugación a 10000 x g durante 10 minutos.
- El sobrenadante resultante del tratamiento, fue el que se empleó en el montaje una vez aatemperado el kit al menos 15 minutos antes de su uso.
 - Adición de 50 µl de solución de conjugado en los pocillos que se usaran para las muestras y para los controles. A continuación, se añadió 50 µl del sobrenadante de muestras y controles.
 - Incubación de la placa en un incubador de microplacas durante 90 ± 5 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
 - Lavado de la placa con solución de lavado preparada a través de la dilución 1/20 en agua destilada a partir de la solución de lavado concentrada que suministra el kit. El proceso de lavado consistió en 5 ciclos añadiendo un volumen de 370 µl en cada uno de ellos. Una vez que se completó, la placa fue sacudida en papel secante para eliminar los restos de líquido.
 - Adición de 200 µl de sustrato cromógeno a cada uno de los pocillos.
 - Incubación de la microplaca a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 ± 5 minutos.
 - Adición de 100 µl de solución de parada a cada uno de los pocillos.
 - Lectura de la DO a 450 nm usando un filtro de referencia de 620-630 nm en un espectrofotómetro.

La interpretación de los resultados se llevó a cabo a través del valor índice obtenido para cada una de las muestras evaluadas. Este valor índice se obtuvo de la siguiente fórmula:

$$\text{Índice} = \frac{DO \text{ muestra}}{\text{Promedio DO de las dos réplicas del control cut off}}$$

Los sueros con índice <0,5 se consideraron negativos; los sueros con índices $\geq 0,5$ se consideraron positivos. Si se sospecha que hay infección y el resultado obtenido es negativo, se recomienda repetir el montaje y si es posible usar otra toma de muestra; esto mismo ocurre en el caso de obtener un resultado positivo, se recomienda un nuevo análisis con el objetivo de analizar seguimiento del paciente.

En cuanto a la técnica de CLIA, se estudiaron los valores RLU obtenidos para cada una de las muestras y se estableció el punto de corte óptimo mediante el análisis de curva ROC. Este se llevó a cabo con el conjunto de valores RLU y la clasificación cualitativa aportada por la técnica de Bio-Rad.

El procedimiento del ensayo de la técnica CLIA consistió en los siguientes pasos:

- Tratamiento de muestras y controles siguiendo la relación:
300 μ l de muestra o control + 100 μ l de solución de tratamiento

El protocolo de tratamiento consistió en:

- d) Homogeneización de la muestra con la solución de tratamiento ayudándose de vórtex.
- e) Calentamiento en bloque térmico, 6 minutos a 120°C; o en baño maría, 3 minutos a 100°C.
- f) Centrifugación a 10000 x g durante 10 minutos.
- El sobrenadante resultante del tratamiento, se empleó en el montaje una vez se atemperaron todos los componentes.
- Se añadieron 100 μ l de sobrenadante de cada una de las muestras al pocillo de la microplaca.
- Se incubó la microplaca en un incubador de microplacas durante 20 ± 5 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Se lavó la placa con solución de lavado preparada a través de la dilución 1/20 en agua destilada a partir de solución de lavado concentrada 20X. El proceso de lavado consistió en 4 ciclos añadiendo un volumen de 280 μ l a cada uno de ellos. Una vez que se completa, la placa fue sacudida en papel secante para eliminar los restos de líquido.
- Se añadieron 50 μ l de solución de lavado 1X en cada uno de los pocillos y a continuación, 50 μ l de solución de conjugado.
- Se incubó la microplaca en un incubador de microplacas durante 20 ± 5 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Se repitió de nuevo el protocolo de lavado expuesto anteriormente.
- Se añadió 50 μ l de componente A de sustrato quimioluminiscente y acto seguido, 50 μ l de componente B de sustrato quimioluminiscente, a cada uno de los pocillos.
- Se incubó la microplaca a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad durante 10 minutos.
- Se leyó las señales de luz emitidas por cada uno de los pocillos mediante un luminómetro.

Se estudiaron 30 muestras en total, siendo todas ellas muestras de suero. 17 fueron clasificadas como positivas y 13 fueron clasificadas como negativas por la técnica de referencia. Un aspecto importante a tener en cuenta antes de procesar las muestras, fue la presencia de azida sódica a una concentración <0,05% (p/v) en la solución de tratamiento de la técnica CLIA. Dicho compuesto tiene la capacidad de inactivar la peroxidasa por lo que no es posible su uso en la técnica de ELISA de Bio-Rad ya que, la incubación de la muestra y el conjugado se hacen de manera conjunta. Como, según lo analizado anteriormente, ambas soluciones de tratamiento consistieron en los mismos componentes a excepción del aditivo preservante, se empleó la solución de tratamiento de Bio-Rad para el tratamiento de las muestras. Se consideró así ya que en este momento el objetivo era la evaluación del sistema y no el análisis del tratamiento de la muestra.

Cada muestra, representada en una única alícuota, fue pretratada con la solución de tratamiento de Bio-Rad en la proporción definida anteriormente y siguiendo el protocolo establecido. El sobrenadante obtenido fue evaluado en ambas técnicas.

Los valores RLU obtenidos a partir de la técnica CLIA y la clasificación cualitativa del kit de Bio-Rad se sometieron a un análisis ROC donde se estableció el punto de corte óptimo de la técnica. Además, tomando el punto de corte sobre el valor RLU aportado por la curva ROC para CLIA y la clasificación de Bio-Rad, se elaboró una tabla de contingencia y se calculó el coeficiente kappa de Cohen que refleja el grado de acuerdo entre ambas técnicas (Tabla 19). La clasificación según el valor obtenido para el coeficiente kappa fue la definida por Landis y Koch (1977)¹⁹⁵:

Tabla 19. Clasificación para el análisis del coeficiente kappa de Cohen.

Coeficiente kappa	Grado de concordancia
0,00	Pobre
0,01 - 0,20	Leve
0,21 - 0,40	Aceptable
0,41 - 0,60	Moderada
0,61 - 0,80	Sustancial
0,81- 1,00	Casi perfecta

23. FORMATO MONOTEST Y AUTOMATIZACIÓN DE LA TÉCNICA.

23.1. MONODOSIS.

Una vez definidos cada uno de los integrantes del sistema, se buscó automatizar el proceso con el objetivo de presentar un formato más simple que ayudara al diagnóstico de AI garantizando un procesamiento rápido de la muestra y la aplicación de un tratamiento precoz.

El formato de tira indivisible de ELISA que presenta Bio-Rad es el responsable de una de las limitaciones que puede presentar el kit ya que, según la experiencia, numerosos hospitales consumen un tiempo de espera para el montaje de esta técnica y pueden llevar a realizar, con suerte, únicamente 2-3 montajes a la semana. Además de este inconveniente, en cada montaje se requiere la representación de los 3 controles, control negativo, control positivo y el montaje por duplicado del control cut off. La tira indivisible está formada por 8 pocillos de reacción y para cada paciente tendríamos que sumar los 4 pocillos destinados a controles. Si únicamente se dispone de un paciente, se gastarían en total 5 pocillos para un único montaje. La filosofía de trabajo seguida consiste en acumular pacientes hasta conseguir el gasto de los 8 pocillos de reacción de una tira. De este modo, intentan rentabilizar el gasto de pocillos de reacción y controles.

El formato de kit de VirClia consiste en 24 tiras monodosis compuestas por 3 pocillos de reacción y 5 pocillos que albergan todos los reactivos que son necesarios para que se lleve a cabo la reacción inmunoenzimática (Figura 39). Este formato ofrece la posibilidad de montaje en el momento de recepción de la muestra ya que cada monodosis presenta todos los elementos necesarios de tal forma que los controles y la muestra son evaluados de forma simultánea. De la mano del formato individualizado, al basarse en la técnica de CLIA, se garantiza la obtención de resultados con mayor rapidez al emplear periodos de incubación más cortos, manteniendo o mejorando los niveles de sensibilidad y especificidad que los aportados por la técnica ELISA.

En el esquema que aparece a continuación se muestran cada uno de los componentes que forman parte de la monodosis:



Figura 39. Composición monodosis VirClia¹⁹⁶.

Pocillos de reacción “Calibrador”, “Muestra” y “Control”: son los pocillos donde se lleva a cabo la reacción inmunológica, están recubiertos con mAB.

Pocillo de reactivo “Conjugado”: contiene la dilución definida de mAB conjugado con peroxidasa, y Neolone® y Bronidox® como conservantes.

Pocillo de reactivo “Calibrador”: contiene antígeno de galactomanano inactivado diluido en tampón neutro a una determinada concentración, y Neolone® y Bronidox® como conservantes.

Pocillo de reactivo “Control”: contiene antígeno de galactomanano inactivado diluido en tampón neutro a una determinada concentración. Este pocillo actúa como control negativo en el sistema y, al igual que el anterior, presenta Neolone® y Bronidox® como conservantes.

Pocillo de reactivo “Sustrato B”: contiene peróxido de hidrógeno.

Pocillo de reactivo “Sustrato A”: contiene luminol.

Además de los componentes de la monodosis, este kit requiere de la presencia de un bote de reactivo extra donde se disponga la solución de tratamiento de muestras basada en tampón fosfato con EDTA y azida sódica como conservante.

Todos y cada uno de los reactivos se encuentran listos para su uso.

Cada monodosis incluye un calibrador, una dilución de ese calibrador que constituye el control negativo y la muestra. El uso de los controles, calibrador y control negativo, garantiza la validación de la prueba y los resultados de los mismos son analizados por el sistema automatizado antes de emitir el resultado de la muestra. Si ha ocurrido alguna anomalía en el proceso, aparecerá notificado y, por tanto, los resultados obtenidos no podrán considerarse válidos.

La interpretación de los resultados se realiza mediante el análisis de los valores de índice obtenidos, estos son calculados mediante la fórmula:

$$\text{Índice} = \frac{\text{Valor RLU de la muestra}}{\text{Valor RLU Calibrador}}$$

23.2. AUTOMATIZACIÓN.

La adaptación de este formato monodosis a sistemas automatizados es fundamental para facilitar el montaje de las muestras de una manera más eficaz y precisa. Con la automatización del proceso se ven reducidos los márgenes de error aportados por la variabilidad inter-operador e inter-laboratorio. VIRCELL S.L. dispone de 3 sistemas automatizados adaptados a la técnica CLIA los cuales fueron estudiados para el kit de detección de galactomanano. Cada uno de los sistemas presenta unas características concretas en cuanto a capacidad y forma de trabajo que son las que se tienen en cuenta según las necesidades de cada centro hospitalario.

Los tres sistemas automatizados son:

VIRCLIA®

Este sistema automatizado ofrece 2 posiciones donde van dispuestas las placas pudiendo presentar 12 tiras monodosis en cada una de ellas. Otra posición se destina para una placa de predilución. En la base de las dos primeras posiciones está presente la placa incubadora y el agitador orbital. Tiene tres gradillas para muestras y una para reactivos dispuestas en una bandeja retráctil. El responsable del pipeteo es un único brazo que presenta 2 puntas, una encargada de la aspiración y otra de la dispensación. Presenta un lector de código de barras integrado para muestras y monodosis y un lector dual con capacidad fotométrica y de luminiscencia (Figura 40). Ofrece 24 resultados tras 150 minutos aproximadamente.



Figura 40. Sistema automatizado VIRCLIA®¹⁹⁶.

VIRCLIA® PLUS

Consiste en un procesador de CLIA con capacidad para 216 monodosis y 96 muestras. Las tiras monodosis se presentan fijas en placas (hasta 12 por cada una de ellas). Presenta un lector de código de barras integrado para el reconocimiento automático de las muestras, 6 gradillas con 16 posiciones y un brazo de pipeteo de 8 canales. La incubación tiene lugar en un incubador de 37°C con capacidad para 6 placas y, por otro lado, presenta dos torres a temperatura ambiente con 18 posiciones. En estas últimas es donde permanecen las placas antes y tras ser procesadas. Además de la zona de pipeteo, presenta un lector de CLIA y un brazo robot que desplaza las placas a cada uno de los módulos descritos (Figura 41). Este sistema es capaz de generar 96 resultados en 3 horas aproximadamente.

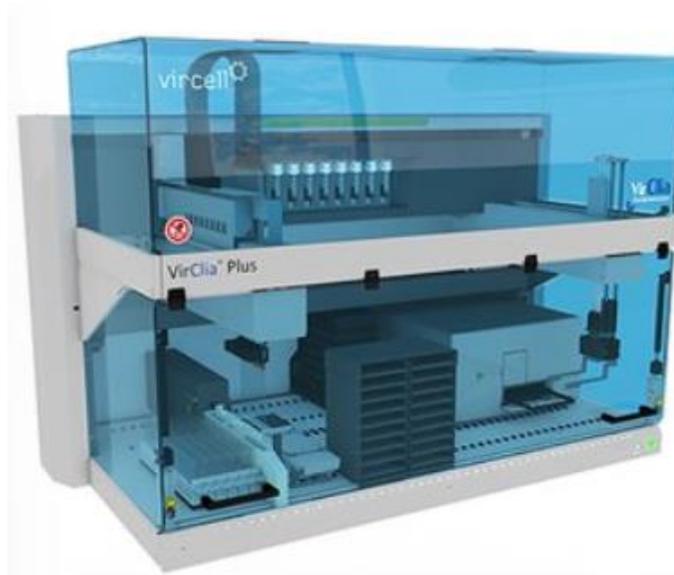


Figura 41. Sistema automatizado VIRCLIA® PLUS¹⁹⁶.

VIRCLIA® LOTUS

Analizador caracterizado por presentar la opción de carga continua basado y adaptado para la técnica de CLIA. Es capaz de aceptar cualquier combinación de muestras y test, independientemente del estado del instrumento, incluso cuando está en pleno funcionamiento. Consta de tres rotos, dos estaciones de pipeteo de reactivos, una estación de lavado y un lector de CLIA. Un rotor se destina para las muestras clínicas. Este presenta 50 posiciones disponibles para tubos primarios de muestra, otras 50 posiciones para tubos de dilución (en el caso de ser requeridos por el test) y 6 posiciones para botes de diluyente de muestra. El tamaño de los tubos se puede regular mediante software para cada tipo de muestra. Por otro lado, presenta un rotor de carga de monodosis con 39 posiciones. Y, por último, un tercer rotor de reacción, con placa incubadora, con 40 posiciones. Tres brazos móviles son encargados del pipeteo de muestras, controles y reactivos y también del proceso de lavado de la monodosis. Además, presenta identificación de muestras, de monodosis y de reactivos a través de lectores de código de barras (Figura 42).

Una de las características destacables, es la opción de gestión de muestras urgentes. El resultado de la primera muestra está disponible a los 70 minutos aproximadamente y el resto se ofrecen cada 35 segundos.



Figura 42. Sistema automatizado VIRCLIA® LOTUS¹⁹⁶.

24. VALIDACIÓN DEL KIT DE DIAGNÓSTICO POR LOS DIFERENTES SISTEMAS AUTOMATIZADOS.

Una vez definido el protocolo del ensayo de captura, así como los volúmenes empleados en cada paso, tuvo lugar la adaptación de la técnica de CLIA al formato VirClia. Para ello, se realizó la programación mediada por software del procedimiento seguido en los tres sistemas automatizados.

En cuanto a las diferencias funcionales, merece ser destacada la propiedad de agitación durante el proceso en el sistema VIRCLIA®, la cual está ausente en VIRCLIA® PLUS y VIRCLIA® LOTUS. La experiencia con kits de diagnóstico basados en la detección de anticuerpos ha puesto de manifiesto que determinados microorganismos son más susceptibles al efecto de dicha agitación existiendo fenómenos de deriva o contraderiva a raíz de la misma. Por otro lado, con el objetivo de optimizar el tiempo destinado para cada una de las tareas del proceso y conseguir el acoplamiento de todas las acciones, VIRCLIA® LOTUS vio incrementados ligeramente los periodos de tiempo de las etapas de la técnica. Este requirió de 23,3 minutos para la primera y segunda etapa y de 12,07 minutos para la tercera frente al patrón común basado en 20+20+10 minutos de la técnica llevada a cabo de forma manual y por los otros dos instrumentos. Por último, otro aspecto es la incubación del sustrato quimioluminiscente. Esta se lleva a cabo a temperatura ambiente en el sistema VIRCLIA® PLUS y a 37°C en VIRCLIA® y VIRCLIA® LOTUS. La causa de esto está relacionada con el motivo que ha llevado al incremento de tiempo en el sistema VIRCLIA® LOTUS, es decir, se basa en el acoplamiento de los periodos de tiempo con el objetivo de procesar el mayor número de monodosis posibles en el menor periodo de tiempo sin que esto afecte de forma negativa a los resultados obtenidos. Con VIRCLIA® PLUS, que consta de elementos modulares, se busca que, si el incubador de 37°C está ocupado, las placas que se encuentren en la etapa final del proceso puedan ser mantenidas en otro módulo

durante los 10 minutos mínimos requeridos para la última incubación. Los otros dos instrumentos, en cambio, cuentan con una placa calefactora con una temperatura definida en 37°C y sobre esta permanecen las monodosis durante todo el proceso.

El primer sistema que llegó a VIRCELL S.L. fue VIRCLIA®, a continuación, VIRCLIA® PLUS y, por último, VIRCLIA® LOTUS. Se comenzó con el ajuste de la técnica en el sistema VIRCLIA® y posteriormente los otros dos instrumentos se compararon frente a él. Una vez que se llevó a cabo el análisis del método definido para cada uno de los sistemas empleando los controles que dispone el kit y un número determinado de muestras, se realizó un estudio comparativo entre ellos con ayuda de un panel de muestras.

Los ensayos llevados a cabo fueron los siguientes:

- a) Análisis del método en el sistema VIRCLIA®

Definición del método óptimo en el sistema donde se analizó el orden de dispensación de los reactivos y el protocolo de lavado de la punta no desechable.

- b) Análisis del método normal y el método sin agitación en sistema VIRCLIA®

Se analizó el comportamiento de los controles y de una muestra negativa y otra positiva dispuestas de manera intercalada cubriendo el rango de posiciones de la 1 a la 24. Posteriormente, se realizó un estudio comparativo con un mayor número de muestras donde se evaluaron ambos métodos en paralelo. En este último estudio, las mismas muestras se montaron por ambos métodos en el mismo instrumento y en la misma posición para evitar así variabilidad intraensayo e interensayo.

- c) Análisis del método en el sistema VIRCLIA® PLUS con respecto a VIRCLIA®

Una vez definido el método para el instrumento VIRCLIA®, este se comparó, con un número determinado de muestras, con el sistema VIRCLIA® PLUS.

- d) Análisis del método en el sistema VIRCLIA® LOTUS con respecto a VIRCLIA®

Una vez definido el método para el instrumento VIRCLIA®, este se comparó, con un número determinado de muestras, con el sistema VIRCLIA® LOTUS.

- e) Comparación de los tres sistemas en paralelo

Un panel que consistía en 12 muestras negativas y 12 muestras positivas, intercaladas, se evaluaron por los tres instrumentos. El patrón de distribución de las muestras fue diseñado de este modo con el objetivo de analizar el método de lavado que se aplica sobre las puntas no desechables en cada sistema y si existían fenómenos de arrastre en la dispensación de alguno de los reactivos.

Para todos se estudió el coeficiente de variación generado en cada condición para el control calibrador del sistema mediante la fórmula:

$$CV (\%) = \frac{\sigma \text{ valores RLU}}{\text{Promedio valores RLU}} \times 100$$

El requerimiento en cuanto a repetitividad aportado por el calibrador, fue de un $CV \leq 20\%$.

Además, se analizó mediante gráfico de líneas la tendencia que presentaba cada control y, mediante correlación, la comparación entre los valores índices obtenidos por los diferentes sistemas ya que estos son los valores normalizados. Se aplicó también, al igual que en casos anteriores, el test Wilcoxon para analizar la significancia estadística entre los tres sistemas.

25. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO Y FUNCIONAMIENTO ANALÍTICO.

Los ensayos descritos a continuación fueron realizados en base a la legislación y normativa vigente con el objetivo de la obtención del marcado CE como producto IVD.

- Reglamento (UE) 2017/746 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre los productos sanitarios para el diagnóstico in vitro.
- UNE-EN 13612 Evaluación del funcionamiento de los productos sanitarios para diagnóstico in vitro.
- Guías CLSI y actualizaciones aplicables.
- UNE-EN ISO 23640 Dispositivos médicos para diagnóstico in vitro – Evaluación de la estabilidad de reactivos para diagnóstico in vitro.

25.1. RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO.

El estudio comparativo entre la técnica en evaluación y la técnica de referencia, se basó en la guía CLSI EP12-A2 Sección 9 y 10, la cual establece que el tamaño muestral debe ser igual o superior a 50 muestras negativas y 50 muestras positivas según la clasificación aportada por el kit de referencia.

El análisis comparativo entre ambas técnicas para establecer el punto de corte óptimo se realizó a través de un análisis de curva ROC mediante la cual se representa gráficamente la sensibilidad y especificidad según varíe el umbral de discriminación.

Uno de los parámetros analizado es el denominado área bajo la curva (AUC). Esta presenta un valor comprendido entre 0,5-1 (o 50-100%) donde 1 (o 100%) significa un valor diagnóstico perfecto y 0,5 (o 50%) aquellas pruebas que carecen de discriminación diagnóstica. Una curva ROC que forma una

línea diagonal entre los ejes X e Y de la gráfica, indica una precisión baja, es decir, existe la misma probabilidad de obtener verdaderos positivos y falsos positivos. Si, por el contrario, la curva ROC se traza en el margen superior izquierdo de la gráfica y la misma se aleja de la línea diagonal que se puede trazar entre ambos ejes, cuanto más se aleje y más cercana esté al valor 1, mayor precisión diagnóstica ofrecerá. A la línea trazada desde el punto 0,0 al punto 1,1 se le denomina diagonal de referencia o línea de no-discriminación. En el eje X de la gráfica se representa la proporción de falsos positivos y en el eje Y (1 – especificidad), la proporción de verdaderos positivos (sensibilidad), es decir, se describe y define el valor de sensibilidad y especificidad para cada punto de corte. El punto de corte óptimo es aquel que se encuentre más cercano al margen superior izquierdo de la gráfica, calculado según la fórmula definida para el índice de Youden (sensibilidad + especificidad – 1).

Otra representación gráfica obtenida fue el diagrama de puntos interactivo. En este se muestran puntos en dos ejes verticales, en uno de ellos se representaron los valores RLU de las muestras positivas y en el otro, los valores RLU de las muestras negativas. Una línea horizontal indica el punto de corte óptimo donde se garantiza la obtención del menor número de falsos negativos y falsos positivos entre ambos grupos muestrales. Los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos para dicha línea horizontal, es decir, para el punto de corte concreto, se muestran en el margen derecho de la gráfica.

Se definen a continuación cada uno de los parámetros que se aportaron en el análisis:

- Sensibilidad: define la probabilidad de que el resultado de la técnica sea positivo cuando existe enfermedad.

$$\text{Sensibilidad (\%)} = \frac{N^{\circ} \text{ verdaderos positivos}}{N^{\circ} \text{ verdaderos positivos} + N^{\circ} \text{ falsos negativos}} \times 100$$

- Especificidad: consiste en la probabilidad de obtener un resultado negativo cuando la enfermedad no existe.

$$\text{Especificidad (\%)} = \frac{N^{\circ} \text{ verdaderos negativos}}{N^{\circ} \text{ verdaderos negativos} + N^{\circ} \text{ falsos positivos}} \times 100$$

- Razón de verosimilitud negativa (-LR): relación entre la probabilidad de obtener un resultado negativo existiendo enfermedad y la probabilidad de obtener un resultado negativo no existiendo enfermedad:

$$-LR = \frac{100 - \text{Sensibilidad (\%)}}{\text{Especificidad (\%)}}$$

- Razón de verosimilitud positiva (+LR): relación entre la probabilidad de obtener un resultado positivo existiendo enfermedad y la probabilidad de obtener un resultado positivo no existiendo enfermedad:

$$+ LR = \frac{\text{Sensibilidad (\%)}}{100 - \text{Especificidad (\%)}}$$

- Valor predictivo positivo (PPV): probabilidad de enfermedad presente cuando la prueba es positiva.

$$PPV (\%) = 100 \times \frac{N^{\circ} \text{ verdaderos positivos}}{N^{\circ} \text{ verdaderos positivos} + N^{\circ} \text{ falsos positivos}}$$

- Valor predictivo negativo (NPV): probabilidad de ausencia de enfermedad cuando la prueba es negativa.

$$NPV (\%) = 100 \times \frac{N^{\circ} \text{ verdaderos negativos}}{N^{\circ} \text{ verdaderos negativos} + N^{\circ} \text{ falsos negativos}}$$

Una vez obtenido el punto de corte óptimo según el análisis ROC, se usó el mismo para darle clasificación cualitativa a las muestras para la técnica de CLIA y se realizó un análisis del coeficiente kappa de Cohen con el objetivo de medir la concordancia entre ambas técnicas. Para dicho análisis se empleó una tabla de contingencia donde se reflejan los resultados positivos y negativos coincidentes y no coincidentes para ambas técnicas.

Se realizó un estudio interno con muestras de diferentes orígenes y naturaleza, todas ellas evaluadas y caracterizadas por el kit tomado como referencia: Platelia *Aspergillus* Ag EIA (Bio-Rad) Ref. 62794.

Se analizaron un total de 518 muestras de las cuales: 206 fueron LBA, 289 fueron suero y 23, plasma.

Los resultados brutos de la evaluación del kit empleado como referencia y del kit objeto de estudio se expresaron en DO y en RLU, respectivamente. Ambos kits mostraron valores de índice para cada una de las muestras y estos fueron calculados con el objetivo de normalizar cada una de las lecturas con el valor de control cut off o calibrador usado en cada microplaca en el caso de Platelia, y en cada monodosis en el caso de VirClia.

El criterio de interpretación empleado para Platelia *Aspergillus* Ag EIA fue el que se recomienda en las instrucciones del fabricante, muestras con índice >0,5 se consideraron positivas y muestras con índice <0,5, negativas. No existe zona gris por lo que no hay muestras clasificadas como “dudosas”.

Una vez obtenidos los resultados en valores de DO (Bio-Rad) y RLU (VirClia), se calculó el índice para cada una de las muestras gracias a las siguientes fórmulas:

$$\text{Índice Bio - Rad} = \frac{DO \text{ muestra}}{\text{Promedio DO control cut off}}$$

$$\text{Índice VirClia} = \frac{RLU \text{ muestra}}{RLU \text{ control calibrador}}$$

Se llevó a cabo una curva ROC empleando los valores índices de VirClia, comparándolos con la clasificación cualitativa del kit de Platelia. Este análisis nos dio el punto óptimo de corte para el kit en evaluación y mediante el mismo, se pudo definir el criterio de interpretación y asignación de la clasificación cualitativa.

Teniendo ambas clasificaciones cualitativas, se realizó el análisis consenso de ambas técnicas o “correlación” de la siguiente manera:

- VP o verdaderos positivos: aquellas muestras en las cuales se obtuvieron valores de índice positivos en ambas técnicas.
- VN o verdaderos negativos: aquellas muestras en las cuales se obtuvieron valores de índice negativos en ambas técnicas.
- FP o falsos positivos: aquellas muestras en las cuales se obtuvieron valores de índice positivos en el kit en evaluación frente al resultado negativo obtenido por el kit tomado como referencia.
- FN o falsos negativos: aquellas muestras en las cuales se obtuvieron valores de índice negativos en el kit en evaluación frente al resultado positivo obtenido por el kit tomado como referencia.

Mediante dicho consenso, se analizó la proporción de VP, VN, FP y FN dando lugar a un valor de sensibilidad y especificidad para la técnica CLIA frente a Bio-Rad.

Además, se llevó a cabo un análisis del grado de acuerdo entre ambas técnicas mediante el coeficiente kappa de Cohen, la correlación entre ambas a través del test de Spearman y se analizó la significancia estadística por medio del test de McNemar el cual, mediante el p-valor obtenido, indica, con un nivel de confianza del 95%, si existen diferencias significativas o no entre la frecuencia de falsos positivos y falsos negativos.

Además de la curva ROC y el diagrama interactivo de puntos, se representaron los valores de índice a través de diagramas de violín. Estos permiten visualizar la distribución de los datos, así como su densidad de probabilidad. Mientras que un diagrama de caja solo muestra los valores estadísticos resumidos (mediana y RIC), el diagrama de violín aporta también información acerca de la distribución completa de los datos.

Una vez realizado el análisis global, se llevó a cabo el estudio de los mismos parámetros diagnósticos para muestras de LBA y para muestras de suero de forma individualizada. Para las muestras de plasma que se han incluido en el estudio no se realizó análisis ya que solo contamos con muestras negativas para este tipo de muestra. A pesar de contar solo con negativas, y siendo esto una limitación, se quisieron evaluar para investigar si este tipo de matriz aportaba alguna interferencia en cuanto a inespecificidad en la técnica.

Numerosos estudios apoyan la iniciativa de fijar un punto de corte en 1 en lugar de 0,5 para la clasificación de muestras LBA por el kit *Aspergillus* Ag EIA Platelia y recomiendan analizar el tipo de población (factor de riesgo) de donde proceden. Se halló un aumento sustancial de especificidad manteniendo la sensibilidad al aumentar el punto de corte^{47,48,76,80}. Por otro lado, también se ha

declarado en la bibliografía, una mayor sensibilidad para muestras LBA frente al tipo suero^{123,158}. Es por esto, que además de estudiar los diferentes parámetros analíticos, se llevó a cabo un análisis ROC de cada tipo de muestra con el objetivo de definir el punto óptimo de corte para cada una de ellas.

Por otro lado, se realizó un estudio comparativo multicéntrico donde se analizaron muestras de suero y de LBA. Estas muestras fueron clasificadas mediante la técnica de ELISA de referencia, Platelia *Aspergillus* Ag. Los resultados se cotejaron con los obtenidos por el kit basado en la técnica de CLIA¹⁹⁷.

Tres centros españoles, ubicados en Madrid, participaron en el estudio: Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz (FJD), Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGM) y Hospital Universitario La Paz (HLA PAZ) (Tabla 20).

HGM proporcionó muestras retrospectivas de pacientes con AI probada o probable según los criterios EORTC/MSG de 2019, las cuales fueron almacenadas a -80°C hasta su evaluación. Por otro lado, los otros dos centros, incluyeron muestras de forma prospectiva previa solicitud clínica para la determinación de galactomanano.

Tabla 20. Clasificación muestras de estudio externo según su naturaleza y origen.
FJD: Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Madrid; HGM: Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid; HLA PAZ: Hospital Universitario La Paz, Madrid.

Centro	Total	Suero	LBA
FJD	113	53	60
HGM	120	108	12
HLA PAZ	94	88	6
Total	327	249	78

Todas las muestras fueron de pacientes adultos y de cada uno de ellos se evaluó una única muestra. Los técnicos de cada centro fueron los responsables del montaje de ambas técnicas en paralelo siguiendo las instrucciones de uso de cada fabricante.

Los resultados de ambas técnicas se compararon mediante el coeficiente kappa de Cohen y mediante el coeficiente de correlación de Spearman. También se aplicó el test de McNemar para analizar la significancia estadística.

El rendimiento diagnóstico se analizó a través de una curva ROC que se llevó a cabo de forma general tomando como referencia el kit de ELISA y, por otro lado, se analizó cada una de las técnicas tomando como referencia el criterio “gold standard” definido por EORTC/MSG para el conjunto de muestras retrospectivas aportadas por HGM.

La distribución de los datos para cada una de las técnicas se reflejó en diversos diagramas de violín donde se analizaron las muestras negativas y positivas de forma individualizada y, por otro lado, el conjunto global de los datos.

25.2. FUNCIONAMIENTO ANALÍTICO.

25.2.1. REPETITIVIDAD Y REPRODUCIBILIDAD.

El estudio llevado a cabo según la guía CLSI EP15-A2, Sección 7, y EP5-A2, Sección 10, consistió en evaluar al menos 2 muestras de diferente reactividad por duplicado durante 20 días y en dos instrumentos al tratarse, en nuestro caso, de una técnica automatizada.

Se ensayaron 4 muestras, dos negativas, una muestra positiva con valor RLU de control cut off o calibrador y otra muestra positiva “alta” con mayor valor RLU. Por un lado, se analizó la repetitividad del test dentro del mismo ensayo; y, por otro lado, se estudió la reproducibilidad interensayo, en el mismo y diferentes días de montaje, y la variabilidad aportada por ambos instrumentos.

El cálculo final obtenido fue el coeficiente de variación expresado en porcentaje y las fórmulas destinadas a la obtención del mismo fueron las siguientes:

En primer lugar, se realizó el promedio de las dos señales RLU obtenidas para cada una de las réplicas que se ensayaron por cada muestra en cada uno de los instrumentos. A continuación, se calculó el cuadrado de la diferencia de señal RLU entre las dos réplicas dentro de cada instrumento mediante la fórmula = (Resultado RLU 1 – Resultado RLU 2)², obteniendo dos valores, uno por cada instrumento; y el cuadrado de la diferencia de los promedios de los valores RLU obtenidos por ambos instrumentos mediante la fórmula = (Promedio RLU instrumento 1 – Promedio RLU instrumento 2)².

Una vez realizados dichos cálculos, se obtuvo un valor de promedio global y tres valores que son resultantes de la suma de cada una de las fórmulas citadas en el párrafo anterior.

Estos valores son requeridos para poder aplicar cada una de las fórmulas destinadas al cálculo de la precisión intraensayo e interensayo.

- Repetitividad (S_r):

$$S_r = \sqrt{\frac{(1) + (2)}{4I}}$$

(1): Suma de (Resultado RLU 1 – Resultado RLU 2)² del Instrumento 1

(2): Suma de (Resultado RLU 1 – Resultado RLU 2)² del Instrumento 2

I: Número de días empleados en el estudio: 20 días

- Reproducibilidad:

Para la determinación de la precisión entre ensayos y entre instrumentos, se requiere el cálculo previo de dos factores que se han denominado A y B, y cuyas fórmulas se describen a continuación:

$$A = \sqrt{\frac{(3)}{2I}} \quad (3): \text{ Suma de (Promedio RLU Instrumento 1 – Promedio RLU Instrumento 2)}^2$$

I: Número de días empleados en el estudio: 20 días

$$B = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

X: Promedio del conjunto muestral
N: Tamaño muestral

- a) Precisión entre ensayos (S_{rr}):

$$S_{rr}^2 = A^2 - \frac{S_r^2}{2}$$

Al valor obtenido en esta fórmula se le aplica el criterio de valor absoluto y es este el que se emplea para el cálculo de S_{rr} .

$$S_{rr} = \sqrt{S_{rr}^2}$$

- b) Precisión entre días (S_{dd}):

$$S_{dd}^2 = B^2 - \frac{A^2}{2}$$

Al valor obtenido en esta fórmula se le aplica el criterio de valor absoluto y es este el que se emplea para el cálculo de S_{dd} .

$$S_{dd} = \sqrt{S_{dd}^2}$$

- c) Precisión entre instrumentos (S_T):

$$S_T = \sqrt{S_{dd}^2 + S_{rr}^2 + S_r^2}$$

Se emplearon las desviaciones estándar obtenidas por cada una de las fórmulas anteriores para cada tipo de precisión, junto con el valor promedio global diario. El cálculo del coeficiente de variación, expresado en porcentaje, se llevó a cabo a través de las siguientes fórmulas:

- Precisión intraensayo:

$$CV (\%) = \frac{\sigma S_r}{Promedio\ global} \times 100$$

- Precisión interensayo:

- a) Entre ensayos:

$$CV (\%) = \frac{\sigma S_{rr}}{Promedio\ global} \times 100$$

- b) Entre días:

$$CV (\%) = \frac{\sigma S_{dd}}{Promedio\ global} \times 100$$

- c) Entre instrumentos:

$$CV (\%) = \frac{\sigma S_T}{Promedio\ global} \times 100$$

La especificación establecida para las muestras positivas se basó en obtener un coeficiente de variación igual o inferior al 20% en todos los análisis. Por otro lado, para las muestras negativas, se analizó el criterio de interpretación cualitativa ya que mínimas oscilaciones experimentadas en señales bajas de RLU, hacen que se disparen los valores CV (%). Por ello, para este tipo de muestra, se pidió que no existiera un cambio en la interpretación cualitativa.

25.2.2. REACCIÓN CRUZADA E INTERFERENCIAS.

Los inmunoensayos enzimáticos pueden aportar resultados falsos negativos o falsos positivos debidos a la influencia de sustancias o elementos que presentan una reacción inespecífica hacia alguno de los componentes que forman parte del sistema. Relacionado con el diseño establecido y con el biomarcador elegido para el diagnóstico, merecen ser estudiadas diferentes especies de hongos por presentar galactomanano como un componente más de su pared celular y productos derivados de los mismos, como son los antibióticos. Por otro lado, y basándonos en el análisis del funcionamiento analítico de Bio-Rad, se estudiaron también otras posibles fuentes de interferencia debidas a infecciones no relacionadas con AI.

Vinculado al origen del mAB empleado en la técnica, es de interés el estudio de la posible influencia de anticuerpos anti-murinos humanos (HAMA). Estos están presentes en los seres humanos y tienen la capacidad de reaccionar con inmunoglobulinas murinas. El tratamiento con mAB se ha usado ampliamente para tratar diferentes tipos de cáncer o trastornos inmunitarios, de esta manera, los enfermos tratados pueden producir anticuerpos frente a las inmunoglobulinas de la especie en la que se obtuvo el mAB. Estas inmunoglobulinas son proteínas extrañas reconocidas como antígeno por el sistema inmune humano. A pesar de que en el tratamiento se emplean habitualmente mAB obtenidos de ratón, se decidió realizar este estudio por la alta probabilidad de reactividad cruzada entre ambos.

Por último, relacionado con las propiedades de la muestra, se estudió el efecto que pueden desencadenar las sustancias endógenas a concentraciones superiores de las que se presentan normalmente en las muestras biológicas.

La guía CLSI en la cual se basan los estudios de interferencias endógenas y exógenas, así como reacciones cruzadas, es la EP7-A2.

25.2.2.1. Hongos.

Según lo aportado por la bibliografía, se analizó la posibilidad de obtención de falsos positivos debidos a otras especies de hongos los cuales presentan galactomanano en su pared celular. Las que guardan más relación con el agente patógeno *Aspergillus fumigatus*, son las especies del mismo género, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*¹¹³. Además, se estudió el género *Penicillium* spp.^{8,198}, el género *Cladosporium* spp.¹⁹⁹, el género *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*)¹²², las especies *Paecilomyces variotii*⁸, *Trichophyton interdigitale*²⁰⁰, *Trichoderma virens*⁸, *Histoplasma capsulatum*¹¹⁹ y, por último, la especie *Candida albicans*¹⁶ como representante del otro género que causa IFI con mayor frecuencia.

El cultivo de estos hongos se llevó a cabo en placa agar dextrosa Sabouraud el cual es un medio no selectivo para hongos patógenos y no patógenos. Se extendió en la superficie de la placa 0,01 ml con ayuda de un asa y se incubó durante 48 horas a 37°C. Posteriormente, un pequeño inóculo de biomasa se pasó a medio líquido Sabouraud donde se incubó 48 horas a 37°C con agitación a 20 rpm en el caso de *Candida albicans* y para el resto, durante 96 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 2000 x g durante 5 minutos y el sobrenadante obtenido se filtró por 0,45 µm. Por último, para su evaluación, el sobrenadante se diluyó en agua destilada a título 1/1000⁸.

Una vez obtenido y diluido el sobrenadante, tuvo lugar su evaluación por el kit desarrollado mediante sistema automatizado donde se aplicó el criterio de positividad que se había definido en el estudio del funcionamiento analítico, es decir, se consideraron positivas las muestras con un índice $\geq 0,2$.

25.2.2.2. Fármacos.

La obtención de resultados falsos positivos debido al tratamiento con piperacilina-tazobactam y otros antibióticos betalactámicos semisintéticos es fuente de preocupación ya que, como consecuencia, tienen lugar exploraciones de tomografía computarizada y aplicación de tratamiento antifúngico innecesarios. Para ello, se analizó la reacción cruzada con estos antibióticos, así como con ciclofosfamida, ya que esta constituye el fármaco antineoplásico e inmunodepresor de uso común para determinados tipos de cáncer.

Se evaluaron concentraciones terapéuticas de cada uno de ellos:

- Piperacilina: 600 µg/ml²⁰¹
- Tazobactam: 600 µg/ml²⁰¹
- Amoxicilina y amoxicilina-clavulánico: 100 µg/ml^{202,203}
- Ciclofosfamida: 100 µg/ml^{204,205}

Las diluciones de cada uno de los fármacos, adquiridos externamente, se llevaron a cabo sobre matriz de suero humano y matriz de LBA. Las matrices usadas para la dilución fueron evaluadas también en paralelo sin la adición de ningún agente para descartar que exista una posible interferencia debida a este tipo de diluyente.

Obtenidas las diferentes condiciones, se evaluaron por el kit de VirClia mediante sistema automatizado. Sobre los resultados de índice obtenidos se aplicaron los criterios de interpretación definidos considerándose falsos positivos aquellas muestras con un índice $\geq 0,2$.

25.2.2.3. Otras infecciones.

Basándonos en las instrucciones de uso de Bio-Rad, se estudiaron otras infecciones no relacionadas con AI que pudieran ser potencialmente interferentes en el presente ensayo (Tabla 21). Muestras de suero clasificadas como positivas según los kits de diagnóstico de VirClia o según otro proveedor externo, se ensayaron sobre el kit de detección de galactomanano.

Tabla 21. Muestras para análisis de reacción cruzada no relacionada con AI.
Colección Vircell: muestras desfibrinadas procedentes del Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Granada (CRTS), Granada; BIOMNIS: Eurofins Biomnis, Francia.

Microorganismo/Patología	Número de muestras	Origen
Micoplasma	15	Colección VIRCELL
Citomegalovirus	14	Colección VIRCELL
Toxoplasma	17	Colección VIRCELL
Rubeola	13	Colección VIRCELL
Sífilis	15	Colección VIRCELL
Hepatitis C	9	Adquiridas externamente - BIOMNIS

Microorganismo/Patología	Número de muestras	Origen
Hepatitis E	8	Colección VIRCELL
Factor reumatoide	8	Colección VIRCELL
Anticuerpos antinucleares (ANA)	5	Adquiridas externamente - BIOMINIS

Las muestras se analizaron mediante sistema automatizado y se clasificaron según los criterios de interpretación establecidos.

25.2.2.4. HAMA.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el uso terapéutico de mAB producidos en murinos es cada vez más frecuente y debido a esto, se vienen detectando anticuerpos humanos anti-murinos (HAMA) capaces de unirse a las inmunoglobulinas murinas presentes en ciertos inmunoensayos enzimáticos. Esto puede ser una fuente de resultados falsos positivos en ensayos de captura tipo sandwich y resultados falsos negativos en ensayos basados en competición.

En este caso, muestras validadas y clasificadas como positivas mediante el kit de diagnóstico de ELISA "Human anti-mouse Ig (HAMA)" comercializado por BioLegend, Inc., fueron evaluadas por el kit desarrollado de VirClia. Se consideró falsa positiva aquella muestra que presentó un índice $\geq 0,2$.

25.2.2.5. Interferencias endógenas.

La presencia de concentraciones anormales de sustancias endógenas en suero puede interferir en los inmunoensayos enzimáticos dando lugar a resultados falsos positivos o falsos negativos. Para ello, se contó con tres muestras de suero, una negativa y dos con distinto nivel de positividad, sobre las cuales se adicionó cada uno de los interferentes a una concentración superior a la que puede presentarse habitualmente. De este modo, se puede concluir que, si no existe interferencia bajo esa condición forzada, no existirá interferencia con concentraciones inferiores.

Las sustancias endógenas, adquiridas externamente, y las concentraciones empleadas de las mismas fueron las siguientes:

- Hemoglobina: 8,5 g/l
- Bilirrubina: 6 g/l
- Colesterol: 5,8 g/l
- Triglicéridos (Tributirina): 5,5 g/l
- Albúmina: 60 g/l
- Gamma globulina: 60 g/l

Cada sustancia endógena se administró sobre cada suero evaluado, dejando una alícuota de cada uno de ellos sin aditivo. Esta última actuó como condición de referencia.

El protocolo del ensayo consistió en evaluar 3 réplicas de cada condición, una vez obtenidos los valores RLU se obtuvo un promedio de los mismos y con este se realizó la diferencia de señal entre la condición evaluada y la condición control o de referencia. También se mostró el grado de interferencia en cada caso expresado en porcentaje.

El cálculo se llevó a cabo empleando las siguientes fórmulas:

$$\text{Diferencia señal RLU} = \text{Promedio señal RLU EV.} - \text{Promedio señal RLU Ref.}$$

EV. = condición evaluada

Ref. = condición de referencia

$$\% \text{ Interferencia} = 100 \times \frac{\text{Diferencia señal RLU}}{\text{Promedio señal RLU condición de referencia}}$$

Los resultados obtenidos se consideraron en valor absoluto ya que puede producirse que la condición evaluada presente un promedio de señal RLU menor que la condición tomada como referencia.

Según las especificaciones definidas en el método analítico para este ensayo, se consideró presencia de interferencia cuando el porcentaje obtenido, en valor absoluto, es $\leq 25\%$, para muestras positivas. En el caso de la muestra negativa, el criterio definido fue no obtener cambio en la clasificación cualitativa de la misma.

25.2.2.6. Lidocaína en muestras LBA.

La lidocaína es un fármaco del grupo de las amino amidas cuyo empleo común es como anestésico local. En la técnica de broncoscopia, empleada para obtener la muestra de LBA, se suministra este fármaco por ser un agente seguro para las vías respiratorias por su bajo riesgo de reacciones adversas, a no ser que esté contraindicado para determinados pacientes.

Los técnicos que llevan a cabo la broncoscopia son los responsables de administrar una dosis apropiada al paciente que establezca el equilibrio entre la prevención de tos excesiva y la reducción de la toxicidad debida al fármaco. La administración puede llevarse a cabo mediante gel, spray o solución. En este último formato, empleado sobre el canal del broncoscopio, suele usarse a concentraciones entre 1-4% (p/v)²⁰⁶.

Por todo ello, se estudiaron distintas concentraciones de lidocaína comercial sobre el kit de VirClia, la cual fue diluida en solución salina. Una vez preparadas las diluciones, que oscilaron en un rango de 0,15 a 5% (p/v), se dispusieron en el sistema automatizado para su montaje por el kit. Los resultados se expresaron en valores RLU e índices y se declaró como interferencia aquella concentración que aportó un valor de índice $\geq 0,2$.

25.3. ESTABILIDAD.

Además de la estabilidad estudiada para las muestras, y de cada uno de los componentes del sistema de forma individual, se realizó un estudio de estabilidad forzada y real del kit en su conjunto donde, bajo las condiciones reales de empaquetado, se consiguió estimar la estabilidad de sus componentes. Esto se realizó bajo las bases reglamentarias 2017/746, UNE-EN ISO 23640:2013, ISO 23640:2011 y la guía CLS EP25.

El estudio de estabilidad forzada o acelerada consistió en:

- Condición 1: Monodosis en blíster dispuestas a 37°C durante 7 y 12 días.
- Condición 2: Monodosis en blíster dispuestas a -80°C durante 24 horas, posteriormente se pasaron a temperatura ambiente durante 2 horas aproximadamente y, a continuación, se introdujeron a 37°C durante 5 y 7 días.
- Condición 3: Monodosis dispuesta con el blíster abierto a temperatura ambiente durante 12 horas.
- Condición 4: Monodosis en blíster dispuesta entre 2-8°C durante 12 días.

Según lo declarado en la bibliografía, basada en la industria del diagnóstico, diferentes condiciones forzadas pueden aproximarse a la vida útil de un producto, como por ejemplo, la equivalencia entre una permanencia de 7 días a 37°C y 1 año entre 2-8°C¹⁸⁶. La condición 1 se basó en una estabilidad acelerada que buscaba ser traducida en un periodo determinado de tiempo cuya conservación hubiera sido entre 2-8°C. En cuanto a la condición 2, se buscaba imitar las oscilaciones de temperatura que puede sufrir un producto una vez que se transporta, de tal manera que con la temperatura por debajo de los 0°C se intentaba imitar, bajo una condición extrema, los rangos que pueden alcanzarse en la bodega de un avión y, por otro lado, con la temperatura por encima de los 30°C, los grados de un transporte terrestre.

Se recomienda que una vez que la monodosis que se vaya a usar, esté atemperada, se saque del blíster que la contiene y se proceda a su montaje. En cambio, puede que esto no ocurra en un periodo de tiempo razonable, por ello, se lleva a cabo el análisis de la condición 3. Esta se basó en analizar la estabilidad de la monodosis una vez que el blíster se ha abierto. Se estableció un periodo de tiempo máximo de 12 horas a temperatura ambiente.

Las monodosis, que vienen de su almacén a 2-8°C, fueron expuestas a las condiciones detalladas anteriormente y, una vez transcurrido ese tiempo, se evaluaron en paralelo en el mismo ensayo para evitar variabilidad interensayo. La viabilidad de los reactivos fue estudiada frente a los dos controles incluidos en el kit, los cuales habían sido sometidos a las diferentes condiciones, y frente a una muestra positiva. La inclusión en el estudio de una muestra positiva se hizo con el fin de poder analizar el comportamiento y/o degradación que hubiera podido sufrir el mAB conjugado ya que, si este experimenta alguna alteración y solo se evalúa frente a los controles, no se podría llegar a la conclusión de qué componente es el que presentaba inestabilidad, si los controles o el conjugado.

La estabilidad mostrada en el ensayo correspondió a 20 meses de vida útil, aunque el kit se comercializa con 15 meses de caducidad tal y como se aplica para todos los kits de VirClia.

Los estudios acelerados y sus datos pueden extrapolarse a tiempo real para dar una conclusión de la vida útil del kit, pero se les debe aplicar un seguimiento a través de su estabilidad real. Para ello, se llevó a cabo un análisis donde los kits se habían mantenido bajo una conservación constante entre 2-8°C. La evaluación tuvo lugar a tiempo 0, a los 7, 12 y 18 meses.

Los estudios de estabilidad acelerada y real se llevaron a cabo con 3 lotes y el de transporte y monodosis abierta con 1 lote. El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante el cálculo de la caída de señal RLU (expresado en porcentaje) de cada muestra y control:

$$\% \text{ caída señal} = 100 - \frac{100 \times RLU \text{ Muestra o control condición 1 o 2 o 3}}{RLU \text{ Condición 4}}$$

La especificación establecida para este método fue obtener un porcentaje de caída de señal $\leq 20\%$ en muestras positivas y en control cut off o calibrador. En cuanto al control negativo, se estableció que no cambiase su clasificación cualitativa.

26. COMPARACIÓN DE DIFERENTES KITS DE DIAGNÓSTICO.

a) Inmunocromatografía.

Se ha podido contar con dos kits de inmunocromatografía, IMMY söna *Aspergillus* galactomannan y *Aspergillus* Lateral Flow Device (LFD) AspLFD (OLM Diagnostics). Estos se evaluaron en paralelo junto con el kit de VirClia.

En primer lugar, se llevó a cabo la titulación del antígeno de galactomanano purificado para el caso de IMMY y antígeno de glicoproteína en el caso de AspLFD. Se realizó de este modo debido a que el kit comercializado por OLM tiene la capacidad de detección de mananoproteína y si se evalúa solo con galactomanano podría estar en desventaja.

En segundo lugar, tuvo lugar su evaluación con un grupo reducido de muestras reales de suero, caracterizadas previamente como negativas y positivas.

Los resultados se reflejaron mediante imágenes ya que la lectura de las tiras se realizó de forma visual. Para el kit de VirClia, los resultados se mostraron en valores RLU e índice. El análisis llevado a cabo consistió, por un lado, en determinar el límite de detección de cada técnica y, por otro lado, en establecer la concordancia entre las dos técnicas de inmunocromatografía y la técnica de CLIA.

b) Inmunoensayos enzimáticos.

Un panel de 24 muestras, la mitad negativas y la mitad positivas, fue evaluado en paralelo por Platelia *Aspergillus* Ag (Bio-Rad), *Aspergillus* antigen (Euroimmun) y VirClia. El procedimiento seguido fue el declarado y recomendado en las instrucciones de uso del fabricante.

Los resultados se muestran en valores DO e índices para Bio-Rad e Euroimmun y en valores RLU e índices para VirClia. Aunque el kit de Euroimmun presentara la opción de cuantificar los resultados mediante los 6 puntos de la recta de calibración, basándonos en el criterio cualitativo del kit de referencia, los resultados fueron analizados según el índice cualitativo.

Se analizó el grado de concordancia, mediante índice kappa de Cohen, y la correlación, mediante el coeficiente de Pearson.

27. ESTRATEGIAS PARA LA CONCENTRACIÓN DE MUESTRAS.

Se evaluaron dos estrategias y estas se llevaron a cabo en colaboración con el Departamento de Proteómica de VIRCELL S.L. Ambas se basaron en cromatografía de afinidad a un anticuerpo o a una resina. Por un lado, se llevó a cabo la conjugación del anticuerpo monoclonal, usado en el ensayo de captura, a una resina de sefarosa preactivada (Figura 43.A) y a partículas magnéticas (Figura 43.B); y, por otro lado, la unión del antígeno, dada su naturaleza glucídica, a lectinas (Figura 43.C).

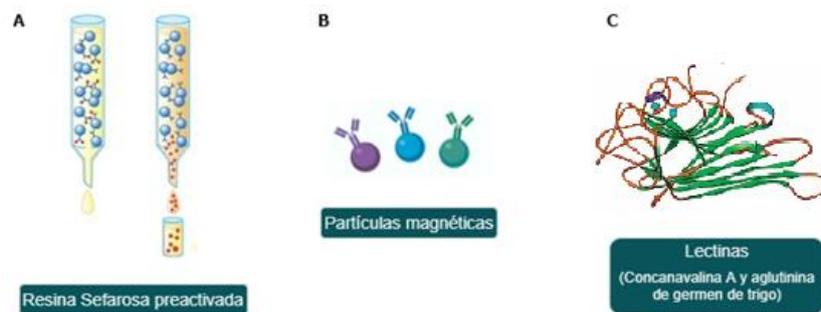


Figura 43. Estrategias puestas en práctica para la concentración de muestras^{178,207}.

Todas ellas siguieron los pasos generales de un proceso de cromatografía consistente en el equilibrado de la resina, la adición de la muestra, el lavado de la misma para eliminar todos los restos no unidos y, por último, la elución (Figura 44).



Figura 44. Pasos generales seguidos en el proceso de cromatografía¹⁷⁸.

- **Unión de anticuerpo monoclonal a resina de Sefarosa.**

a) El anticuerpo monoclonal se dializó en tampón NaHCO_3 100 mM pH 8 con NaCl a 500 mM durante 4 horas, con cambios de tampón cada dos horas, a 4°C. Una vez dializado, se midió la absorbancia del mismo a 280 nm para tenerlo a una concentración de 1-2 mg/ml. Por otro lado, se adquirió una resina de Sefarosa preactivada sobre la cual se aplicó un tampón HCl 1 mM (5 volúmenes por volumen de resina) y se mantuvo en agitación durante 2 horas a 4°C. Tal y como indica el fabricante, respecto al anticuerpo monoclonal, es importante eliminar cualquier traza que presente de tampón Tris ya que este reacciona con la resina.

Para eliminar los restos del tampón aplicado a la resina, se centrifugó a 1000 x g durante 5 minutos. Una vez que se llevó a cabo la mezcla resina-anticuerpo, se mantuvo durante una noche en agitación a 4°C. Según recomienda el fabricante, se requiere de 2 mg de anticuerpo para cada ml de resina. Transcurrida esa etapa, la resina se centrifugó a 1000 x g durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 5 volúmenes de tampón NaHCO_3 100 mM pH 8 con NaCl a 500 mM y se mantuvo la mezcla en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, para eliminar de nuevo los residuos, se centrifugó a 1000 x g durante 5 minutos. Una vez retirados, se añadieron 5-10 volúmenes de tampón Tris-HCl a 100 mM a pH 8 y se incubó con agitación de 2 a 3 horas a temperatura ambiente. Esto se llevó a cabo con el objetivo de ocupar, con dicha solución, todos aquellos grupos funcionales en los que no se había instalado el anticuerpo monoclonal. Pasado este tiempo, se eliminaron los restos de la mezcla bajo centrifugación, compartiendo las características descritas en los pasos previos.

Por último, tuvo lugar un proceso de lavado de la resina para eliminar todos los restos de anticuerpo monoclonal que no se había unido a la misma. Para ello, se procedió a la aplicación de ciclos alternos de pH ácido, NaOAc 100 mM a pH 4 con NaCl 500 mM (10 volúmenes) y pH básico, Tris-HCl 100 mM a pH 8 con NaCl 500 mM (10 volúmenes).

Finalmente, para su almacenamiento, se aplicó tampón con pH neutro, compuesto de NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaH₂PO₄ 10 mM y K₂HPO₄ 2 mM, y suplemento de azida sódica para garantizar su conservación.

- b) Una vez obtenida la resina unida al anticuerpo, se equilibró la columna con tampón PBS con 300 mM de NaCl.
- c) A continuación, se incubó 1ml de antígeno diluido a la concentración definida, el cual había sido dializado previamente en tampón PBS con 300 mM de NaCl, junto con 100 µl de resina conjugada. La incubación se llevó a cabo en agitación, 1400 rpm, durante 1 hora a temperatura ambiente.
- d) Trascurrido ese periodo de tiempo se continuó con un lavado con tampón PBS con 300 mM de NaCl y posterior centrifugación durante 1 minuto a 1000 x g, para eliminar todo el antígeno no unido.
- e) Una vez realizado el lavado, se aplicó el tampón de elución correspondiente y se mantuvo durante 5 minutos a temperatura ambiente en agitador orbital. Los diferentes tampones de elución fueron:
 - a) Citrato de sodio 0,1 M pH 3,5
 - b) Glicina 0,1 M pH 2,7
 - c) Urea 8 M
- f) Una vez pasado este tiempo, se centrifugó durante 5 minutos a 1000 x g para obtener las sucesivas eluciones, las cuales se neutralizaron con tampón Tris 1M pH 9 a medida que se obtenían. El volumen recogido por elución fue 10 veces menor que el volumen de partida.
- g) Obtenidas las 6 eluciones, fueron evaluadas mediante la técnica de captura tipo sandwich.

Además del análisis de cada elución mediante el sistema de captura, se realizó un estudio de la posible pérdida de anticuerpo monoclonal conjugado una vez que había tenido lugar el proceso de elución. Para ello, las eluciones se dispusieron sensibilizando una placa de CLIA y sobre la misma se añadió la globulina anti-rata IgG+IgM.

- **Unión de anticuerpo monoclonal a partículas magnéticas.**

- a) Para la activación de las partículas magnéticas, previa a su unión con el anticuerpo monoclonal, se requirió de tampón PBS pH 7,4 con 300 mM de NaCl. Según recomienda el fabricante, se debe emplear el anticuerpo monoclonal a una concentración final de 1 mg/ml diluido en agua destilada. Se resuspendieron las partículas mediante vórtex durante 30 segundos y se pipeteó 1 ml de las mismas en un tubo. De dicho tubo, mediante imán, se retiró el sobrenadante y se dejaron las partículas magnéticas. Se añadieron 315 µl de tampón PBS pH 7,4 con 300 mM de NaCl y el mismo volumen de anticuerpo. La mezcla se agitó con ayuda de vórtex. A continuación, se añadió EDAC, 6,3 mg, para que tuviera lugar la unión partículas-anticuerpo, la cual se llevó a cabo durante una noche a temperatura ambiente.

Pasado este tiempo, mediante imán, se retiró el sobrenadante y la mezcla se sometió a una solución bloqueante que consistió en tampón Tris-HCl a 100 mM a pH 8 para evitar reacciones inespecíficas hacia sitios funcionales que no habían sido ocupados por el

anticuerpo monoclonal. Por último, fueron lavadas, con ayuda de imán, empleando 2 ciclos de tampón PBS pH 7,4.

El fabricante declara que las partículas unidas al anticuerpo son viables a 4°C durante varias semanas sin perder la capacidad de unión al antígeno, aunque en nuestro caso, fueron preparadas y usadas acto seguido.

- b) Se incubó 1 ml de antígeno diluido a la concentración definida, junto con diferente proporción de partículas magnéticas (100-200-300 μ l), durante una hora a temperatura ambiente con agitación a 1400 rpm.
- c) A continuación, tuvo lugar el lavado con tampón PBS con 300 mM de NaCl para eliminar todos los residuos no unidos.
- d) Una vez lavada, se aplicó el tampón de elución, consistente en glicina a pH 2,4, tras los resultados obtenidos mediante la evaluación previa con la resina de Sefarosa. Se mantuvo durante 5 minutos a temperatura ambiente con agitación 700-1400 rpm.
- e) Por último, mediante imán, se recogieron 6 eluciones, las cuales se neutralizaron con tampón Tris 1 M pH 9. Estas presentaban un volumen 10 veces inferior al volumen de partida.
- f) Obtenidas las mismas, se ensayaron a través del sistema de captura tipo sandwich.

Al igual que en el caso anterior, se estudió la posible pérdida del anticuerpo monoclonal conjugado a las partículas, mediante reactividad por ensayo CLIA indirecto entre la fracción eluída y globulina anti-IgG+IgM de rata.

- Unión a lectinas.

En primer lugar, se ensayaron, mediante técnica CLIA indirecta, diferentes lectinas biotinadas sobre placa con antígeno de bajo peso molecular de galactomanano. De las más reactivas, se analizó, por parte del Dpto. de Proteómica, la disponibilidad comercial de resinas que presentaban dichas lectinas como ligando. Se consiguió la adquisición comercial de sefarosa de Concanavalina A y de aglutinina de germen de trigo.

- a) La sefarosa ya venía conjugada de fábrica por lo que, en este caso, no necesitó ser activada.
- b) Antes de pasar el antígeno por la resina, tuvo lugar el proceso de equilibrado de la misma mediante tampón PBS pH 7,4 con 1 mM de cloruro de calcio, 1 mM de cloruro de magnesio y 1 mM de cloruro de manganeso. Los restos del tampón de equilibrado se eliminaron mediante centrifugación a 1000 x g durante 5 minutos.
- c) Una vez equilibrada, tuvo lugar la unión del antígeno a la resina. Este se diluyó en el mismo tampón de equilibrado, se añadió a la misma y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.
- d) Para la eliminación de los restos de antígeno no unido, se aplicaron dos lavados con el mismo tampón empleado para el proceso de equilibrado.

- e) A continuación, se aplicó el tampón de elución, que consistió en N-acetil-β-D-glucosamina (GlcNAC) a 500 mM y NaCl a 500 mM. Este azúcar, es el mismo por el que el sistema presenta elevada afinidad. Se usó a una concentración más elevada para que dicho azúcar compitiera con el galactomanano unido a la columna dando lugar a su desplazamiento. Además, el tampón presentaba 500 mM de NaCl, esto fomentó también la separación del antígeno. La mezcla se incubó durante 5 minutos en agitador orbital a temperatura ambiente.
- f) Mediante la centrifugación de la mezcla se obtuvo la elución 1, en este caso no se aplicó tampón ácido para separar, sino que la rotura tuvo lugar por desplazamiento por parte del competidor, que es el azúcar. La condición empleada fue 1000 x g durante 5 minutos. Posteriormente, obtenida la primera elución, se volvió a aplicar tampón de elución, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se repitió el paso de centrifugación para obtener la siguiente elución. El proceso se repitió hasta conseguir el conjunto de las 6 eluciones, las cuales presentaban un volumen 10 veces inferior al de partida.

Una vez puesto en práctica este último mecanismo de concentración basado en el uso de lectinas, se encontró reactividad cruzada por parte del tampón de elución empleado en el sistema de captura. Tras esta observación, se ensayaron distintos tipos de tampones de unión y elución con el objetivo de optimizar el proceso y hacer que el ruido de fondo de la reacción fueran lo más bajo posible para conseguir así una óptima discriminación entre la señal aportada por las fracciones eluidas y su blanco.

Las condiciones evaluadas fueron:

- Ácido acético 0,1 M pH 4
- PBS pH 7,4 con 1 mM de cloruro de calcio, 1 mM de cloruro de magnesio y 1 mM de cloruro de manganeso
- Tampón borato 0,1 M a pH 6,5

Se analizó el grado de concentración a través del cálculo de diferencia de señal RLU de cada elución respecto a la condición de partida (identificada como “– columna”) previa al contacto con las resinas o partículas magnéticas.

$$\text{Diferencia señal tras concentración} = (\text{RLU Elución}) - (\text{RLU} - \text{Columna})$$

28. COVID-19: DESARROLLO DE ASPERGILOSIS PULMONAR INVASIVA COMO COMPLICACIÓN SECUNDARIA.

Debido a la imposibilidad de recibir muestras biológicas procedentes de centros sanitarios como consecuencia de los requerimientos de cada Comité de Ética Institucional y, por otro lado, debido a la falta de disponibilidad en otro tipo de entidades externas, se pasó a realizar un estudio bibliográfico del kit de detección de galactomanano de VirClia. Como consecuencia de la pandemia, los centros externos se han centrado en el análisis de muestras derivadas de pacientes COVID-19

positivos viéndose reemplazado el estudio de muestras procedentes de pacientes con infección vírica por Influenza.

En el apartado Discusión se muestran los datos obtenidos de varios estudios llevados a cabo por distintos centros que han sido publicados en congresos a nivel nacional e internacional y en revistas científicas.

29. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

El análisis ROC, el cálculo del coeficiente kappa de Cohen y el índice de Spearman se llevó a cabo a través del programa estadístico MedCalc (Versión 5.00.017). El test no paramétrico Wilcoxon, así como las representaciones gráficas que muestran la tendencia, distribución y correlación de los datos, tuvo lugar a través de RStudio (versión 3.5.3; “xlsx” versión 0.6.3; “ggplot2” versión 3.3.6; “reshape2” versión 1.4.4; “grid” versión 3.5.3; “gridExtra” versión 2.3; “vioplot” versión 0.3.6).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. EVALUACIÓN DE ANTÍGENO DE GALACTOMANANO PURIFICADO.

Mediante el kit de ELISA Platelia *Aspergillus* Ag (Bio-Rad) Ref. 62794, se realizó la evaluación de diluciones seriadas de antígenos purificados de diferente peso molecular una vez cuantificada su concentración de azúcares mediante el método fenol-sulfúrico.

El procedimiento empleado en el ensayo ha sido el indicado por el fabricante en las instrucciones de uso, así como la interpretación de los resultados. Se consideraron positivos índices superiores a 0,5.

El valor promedio de DO obtenido del control cut off fue 0,734. Cada valor de DO de cada muestra se dividió entre el promedio del cut off, se obtuvo así el valor índice para cada muestra/concentración de antígeno.

A continuación, se muestran los resultados, expresados en DO e índice según se indica en las columnas para cada tipo de fragmento evaluado (Tabla 22). En la parte superior se indica el tipo de antígeno y en la columna de la izquierda la concentración a la que se ha dispuesto cada uno de ellos.

Los índices señalados en rojo fueron los considerados positivos según el cálculo:

$$\text{Índice Bio - Rad} = \frac{\text{DO muestra}}{\text{Promedio DO control cut off}}$$

Tabla 22. Evaluación antígeno purificado sobre kit de Bio-Rad.

Concentración Ag	Ag >440 kDa		Glicoproteína		Parte proteica		Ag <13 kDa	
	DO	Índice	DO	Índice	DO	Índice	DO	Índice
0,1 µg/ml	3,295	4,489	3,369	4,59	0,08	0,109	3,078	4,193
0,05 µg/ml	1,822	2,482	4,449	6,061	0,049	0,067	1,372	1,869
0,025 µg/ml	0,939	1,279	2,066	2,815	0,043	0,059	0,536	0,73
0,0125 µg/ml	0,429	0,584	0,864	1,177	0,045	0,061	0,241	0,328
0,00625 µg/ml	0,235	0,32	0,442	0,602	0,046	0,063	0,118	0,161
0,0031 µg/ml	0,151	0,206	0,21	0,286	0,037	0,05	0,083	0,113
0,001 µg/ml	0,097	0,132	0,129	0,176	0,043	0,059	0,071	0,097

El punto de corte establecido por el kit en índice $\geq 0,5$, reflejado como una línea discontinua (Figura 45), muestra hasta qué concentración se consideró positiva cada una de las fracciones antigénicas. La tendencia de los índices muestra una caída gradual conforme disminuye la concentración del antígeno evaluado a excepción del antígeno de glicoproteína donde los valores de DO se muestran en rango de saturación en las dos primeras concentraciones evaluadas y eso hace que se aprecie un incremento en la segunda concentración respecto a la primera. El antígeno de glicoproteína fue el

que soportó mayor dilución estando su límite en 0,00625 µg/ml. Por otro lado, no se obtuvo ninguna reactividad por el antígeno formado exclusivamente por la parte proteica.

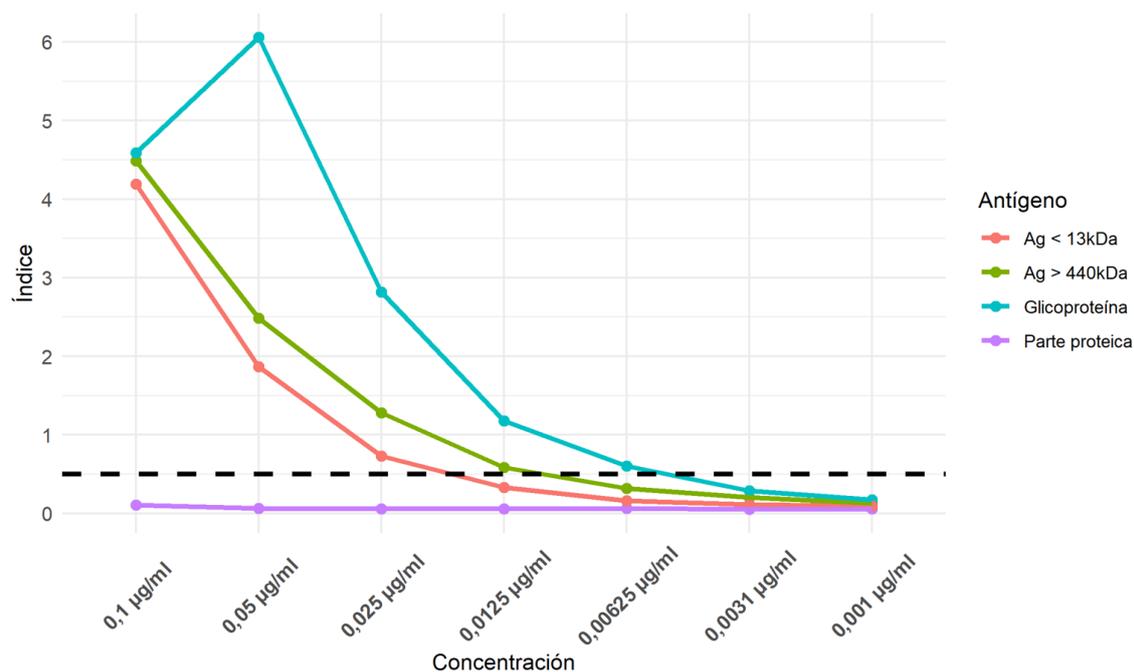


Figura 45. Gráfica de líneas que ilustra la tendencia de los valores índice obtenidos por el kit de Bio-Rad para cada tipo de antígeno.

2. ANÁLISIS DE LOS HIBRIDOMAS OBTENIDOS.

2.1. ISOTIPADO DE HIBRIDOMAS.

Mediante la técnica ELISA comercial Ig Isotyping Rat Instant ELISA™ Kit (Invitrogen, Ref. 88-50650-22) se realizó el isotipado de los hibridomas obtenidos en rata. Esta característica es imprescindible para su posterior purificación ya que, dependiendo del isotipo, se requieren distintas estrategias.

A continuación, se muestra el resultado cualitativo de la técnica, es decir, el isotipo de inmunoglobulina presente en cada uno de los hibridomas (Tabla 23).

Tabla 23. Isotipo de cada uno de los hibridomas.

HIBRIDOMA	ISOTIPO	HIBRIDOMA	ISOTIPO
CL1	IgM	CL33	IgG2C
CL2	IgM	CL34	IgG2C
CL3	IgM	CL35	IgG2C
CL4	IgM	CL36	IgG2C

HIBRIDOMA	ISOTIPO	HIBRIDOMA	ISOTIPO
CL5	IgM	CL37	IgG2C
CL7	IgM	CL38	IgG2C
CL8	IgM	CL39	IgG2C
CL9	IgM	CL40	IgG2C
CL10	IgM	CL41	IgG2C
CL11	IgM	CL42	IgG2C
CL12	IgM	CL43	IgG2a
CL13	IgM	CL44	IgG2C
CL14	IgM	CL45	IgG2C
CL15	IgM	CL46	IgG2b
CL16	IgM	CL48	IgG2C
CL17	IgM	CL49	IgG2C
CL18	IgM	CL50	IgG1
CL19	IgM	CL51	IgG2a
CL20	IgM	CL52	IgG2a
CL21	IgM	CL53	IgG1
CL22	IgM	CL54	IgM
CL25	IgM	CL55	IgG2a
CL26	IgM	CL56	IgG2C
CL27	IgM	CL57	IgM
CL28	IgM	CL58	IgM
CL29	IgM	CL59	IgG2a
CL30	IgM	CL60	IgG2C
CL31	IgG2C	CL61	IgG1
CL32	IgG2a	CL63	IgM

Se encontró una mayor proporción de hibridomas con isotipo IgM, por encima de la mitad, seguido de IgG2c, IgG2a, IgG1 e IgG2b (Figura 46).

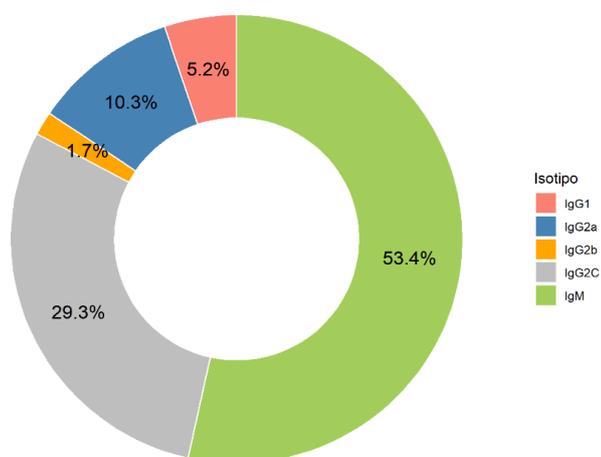


Figura 46. Gráfica en anillo que muestra la proporción de cada isotipo sobre el total.

2.2. REACTIVIDAD DE LOS HIBRIDOMAS FRENTE AL ANTÍGENO PURIFICADO DE GALACTOMANANO DE DISTINTO PESO MOLECULAR.

Una vez sensibilizada la placa con los diferentes tipos de antígeno purificado dispuestos todos a la misma concentración, se analizó, mediante la técnica de CLIA indirecta, la reactividad de cada uno de los hibridomas frente a cada una de las fracciones.

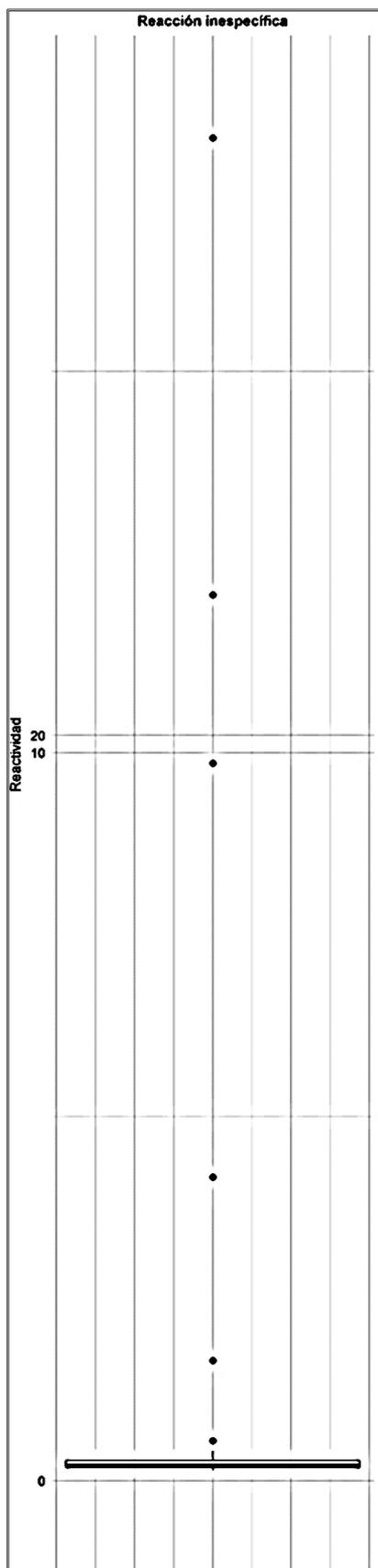
Los resultados se expresaron en RLU (Tabla 24). En la primera columna se dispone el número con el cual conocemos a cada hibridoma, en la segunda el isotipo del mismo y en las sucesivas la reacción que presentó cada uno de ellos frente a cada antígeno inmovilizado en placa. En la última columna aparecen los resultados frente a una placa que actuó como “blanco” denominada en la tabla como “Reacción inespecífica”. Dicha placa fue procesada siguiendo los mismos pasos que en la sensibilización de placa con antígeno a excepción de que la misma no presentaba antígeno. Se ensayó como una condición más en paralelo con el objetivo de analizar posibles reacciones inespecíficas de los hibridomas frente al tipo de placa, tipo de bloqueante/conservante o una mezcla de ambos.

Tabla 24. Reactividad de los hibridomas sobre placa con y sin antígeno.
Resultados expresados en RLU.

Hibridoma	Isotipo	Ag >440kDa 0,5µg/ml	Glicoproteína 0,5µg/ml	Proteína 0,5µg/ml	Ag 440- 75kDa 0,5µg/ml	Ag 75- 29kDa 0,5µg/ml	Ag <13kDa 0,5µg/ml	Reacción inespecífica
CL1	IgM	7,095	10,708	1,895	1,967	5,81	1,795	0,211
CL2	IgM	5,134	14,484	0,253	0,649	0,626	0,342	0,167
CL3	IgM	8,06	22,141	1,249	1,122	1,123	0,552	0,279
CL4	IgM	8,118	28,069	0,359	1,168	1,417	0,484	0,282
CL5	IgM	8,813	28,7	2,252	2,764	7,252	2,277	0,235
CL7	IgM	6,615	20,434	0,536	1,03	0,989	0,395	0,252
CL8	IgM	0,26	0,251	0,194	0,195	0,199	0,149	0,224
CL9	IgM	12,853	6,863	6,709	11,33	11,132	8,109	9,858
CL10	IgM	6,431	25,575	0,255	1,051	1,239	0,416	0,157
CL11	IgM	0,223	0,271	0,271	0,208	0,195	0,173	0,201
CL12	IgM	0,246	0,306	0,365	0,228	0,189	0,175	0,33
CL13	IgM	22,986	56,675	1,419	6,036	10,084	2,597	0,267
CL14	IgM	12,578	34,654	0,775	2,051	1,757	0,673	0,249
CL15	IgM	4,291	0,305	0,224	1,107	1,535	2,248	0,192
CL16	IgM	32,325	61,246	3,834	8,731	14,222	3,824	0,252
CL17	IgM	10,336	26,094	1,052	1,539	1,499	0,608	0,347
CL18	IgM	7,839	22,948	0,363	1,216	1,413	0,563	0,196
CL19	IgM	10,42	27,912	1,088	3,569	11,975	4,585	0,344
CL20	IgM	0,187	0,339	0,22	0,253	0,159	0,189	0,222
CL21	IgM	18,767	52,196	4,25	8,772	31,594	11,077	0,269
CL22	IgM	4,51	10,428	0,382	1,052	1,62	0,667	0,304
CL25	IgM	12,439	36,562	0,363	2,401	3,134	0,944	0,198
CL26	IgM	4,764	18,091	0,207	0,867	1,566	0,414	0,2
CL27	IgM	5,934	14,925	0,485	1,203	1,899	0,733	0,255
CL28	IgM	1,993	3,91	0,228	0,332	0,295	0,265	0,283
CL29	IgM	8,292	28,346	0,358	1,087	1,341	0,519	0,268
CL30	IgM	2,833	0,647	0,64	0,986	1,711	1,969	0,2
CL31	IgG2C	3,513	13,822	0,513	0,449	0,481	0,246	0,211

RESULTADOS

Hibridoma	Isotipo	Ag >440kDa 0,5µg/ml	Glicoproteína 0,5µg/ml	Proteína 0,5µg/ml	Ag 440- 75kDa 0,5µg/ml	Ag 75- 29kDa 0,5µg/ml	Ag <13kDa 0,5µg/ml	Reacción inespecífica
CL32	IgG2a	0,213	0,214	0,239	0,176	0,144	0,134	0,173
CL33	IgG2C	1,589	11,524	0,158	0,319	0,304	0,177	0,147
CL34	IgG2C	0,46	0,225	0,24	0,19	0,22	0,264	0,153
CL35	IgG2C	8,554	26,706	0,324	2,306	3,598	1,329	0,228
CL36	IgG2C	1,683	0,354	0,277	0,649	1,005	1,124	0,237
CL37	IgG2C	1,199	0,28	0,279	0,476	0,709	0,823	0,3
CL38	IgG2C	3,736	15,503	0,306	0,805	1,218	0,47	0,201
CL39	IgG2C	2,013	5,153	0,291	0,518	0,888	0,413	0,214
CL40	IgG2C	9,974	29,002	0,331	2,543	4,129	1,302	0,176
CL41	IgG2C	8,507	24,595	0,39	2,442	3,485	1,341	0,406
CL42	IgG2C	1,616	0,348	0,346	0,374	0,54	0,531	0,174
CL43	IgG2a	0,192	0,249	0,191	0,17	0,173	0,164	0,201
CL44	IgG2C	0,833	0,199	0,165	0,344	0,433	0,485	0,18
CL45	IgG2C	4,932	16,323	0,319	0,915	1,228	0,381	0,204
CL46	IgG2b	1,091	1,804	8,653	0,773	1,059	0,758	1,65
CL48	IgG2C	0,839	1,809	0,194	0,286	0,205	0,128	0,18
CL49	IgG2C	1,013	5,463	0,222	0,258	0,257	0,156	0,191
CL50	IgG1	0,893	2,569	0,232	0,188	0,158	0,121	0,152
CL51	IgG2a	0,209	0,308	0,251	0,199	0,144	0,146	0,172
CL52	IgG2a	27,59	16,622	21,934	25,726	24,13	18,631	21,929
CL53	IgG1	0,256	0,875	0,275	0,224	0,315	0,214	0,247
CL54	IgM	0,223	0,168	0,193	0,221	0,237	0,137	0,174
CL55	IgG2a	3,54	4,557	3,823	3,537	3,275	2,221	4,169
CL56	IgG2C	0,254	0,168	1,475	0,164	0,134	0,112	0,161
CL57	IgM	0,731	0,39	0,52	0,515	0,419	0,187	0,192
CL58	IgM	0,167	0,251	0,141	0,169	0,134	0,103	0,137
CL59	IgG2a	25,587	16,77	18,56	28,608	24,097	17,234	28,209
CL60	IgG2C	0,19	0,187	1,801	0,184	0,215	0,195	0,145
CL61	IgG1	0,171	0,42	0,199	0,267	0,251	0,203	0,178
CL63	IgM	0,728	0,892	12,693	0,547	0,583	0,354	0,548



La reacción inespecífica aportada por cada uno de los hibridomas (Tabla 24) se representa mediante un diagrama de caja y bigotes donde se analiza la distribución de los datos (Figura 47). Los límites de la caja se indican mediante el primer y tercer cuartil ($Q1 = 0,18$ y $Q3 = 0,2765$) y la mediana a través de la línea que divide dicha caja ($Q2 = 0,2125$). Los bigotes que se prolongan a raíz de la misma corresponden a los valores extremos, obtenidos mediante $Q1-1,5RIC$ y $Q3+1,5RIC$ (siendo el valor de $RIC = 0,0965$). De este modo, el conjunto de valores típicos quedaría comprendido entre ambos puntos, $[Q1-1,5RIC, Q3+1,5RIC]$.

El análisis muestra 6 puntos, es decir, 6 hibridomas, que son considerados como valores atípicos o *outliers*. Estos hibridomas son: CL9 (reacción inespecífica RLU 9,858), CL46 (reacción inespecífica RLU 1,65), CL52 (reacción inespecífica RLU 21,929), CL55 (reacción inespecífica RLU 4,169), CL59 (reacción inespecífica RLU 28,209) y CL63 (reacción inespecífica RLU 0,548).

Los hibridomas considerados como *outliers* no fueron incluidos en los ensayos de caracterización que se llevaron a cabo posteriormente.

Figura 47. Diagrama de caja y bigotes de la reacción inespecífica aportada por los hibridomas.

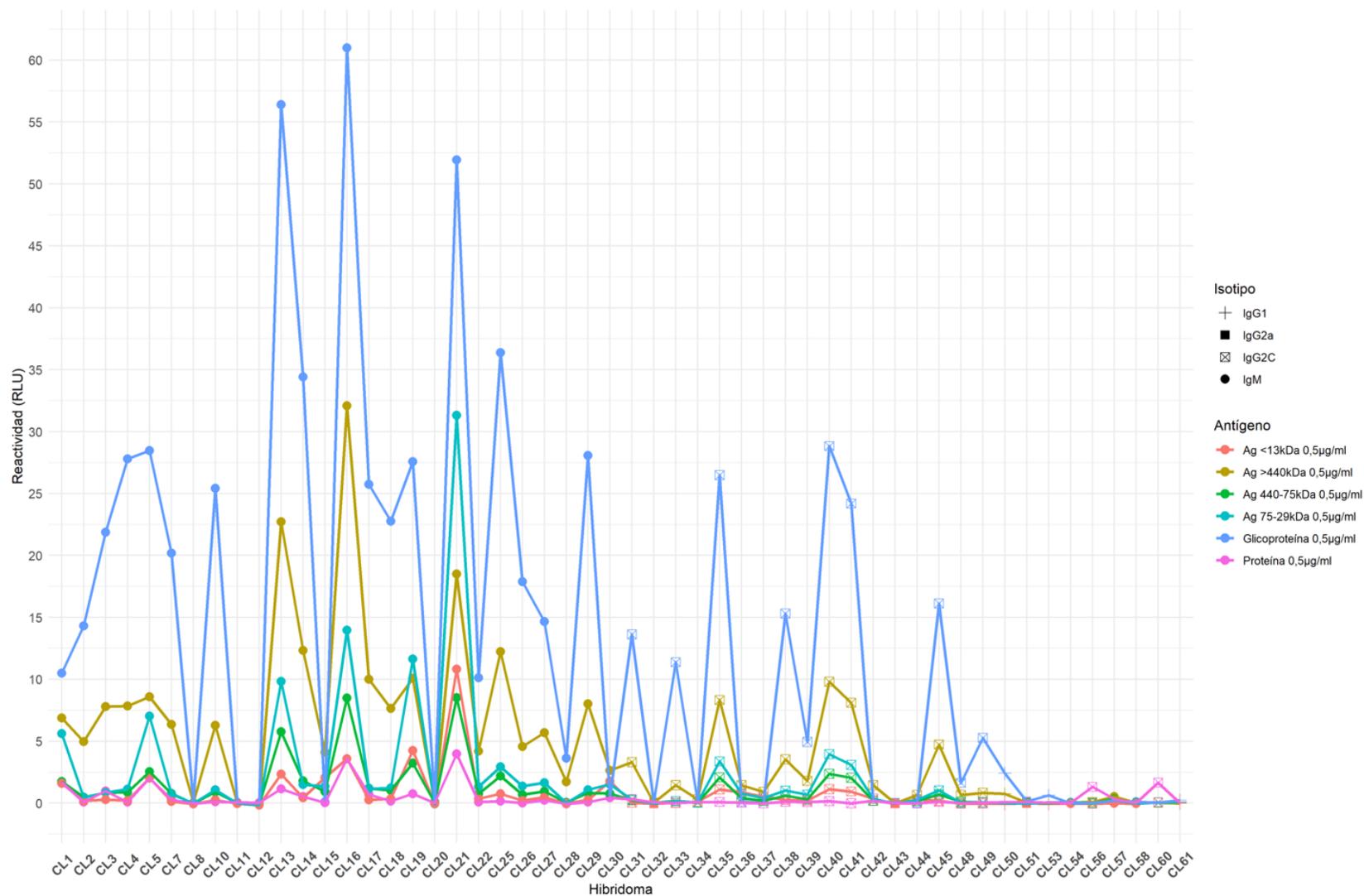


Figura 48. Gráfica de líneas que muestra la reactividad de cada uno de los hibridomas sobre cada uno de los antígenos.

Cada fracción antigénica viene representada por un color y cada punto, que refleja los valores RLU obtenidos por cada hibridoma, el isotipo de cada uno de ellos (Figura 48). Se observaron señales RLU más elevadas frente al antígeno de alto peso molecular y al antígeno de glicoproteína en la mayoría de los hibridomas a excepción de 4: los clones 15 y 30, presentaron mayor reactividad frente al antígeno de alto peso molecular seguido del antígeno de bajo peso molecular, 75-29 kDa y <13 kDa; el clon 19, con reactividad superior para los antígenos de glicoproteína seguida de 79-25 kDa y el antígeno de alto peso molecular; y el clon 21 donde el patrón consistió, de mayor a menor, en: glicoproteína, 79-25 kDa, alto peso molecular y <13 kDa.

2.3. INHIBICIÓN DE HIBRIDOMAS FRENTE AL MONOCLONAL EB-A2.

Los hibridomas ensayados en el presente estudio fueron aquellos con los que se obtuvo reactividad. Los no reactivos y los que presentaron reacción inespecífica se han eliminado del mismo.

El antígeno seleccionado para este ensayo fue la fracción glicoproteína. Esta se dispuso sensibilizando la placa y mediante ensayo CLIA indirecto se analizó la reacción frente al mismo o los mismos epítomos por parte de cada hibridoma, teniendo como referencia la reacción aportada por el mAB EB-A2 conjugado del kit de Bio-Rad. Los hibridomas, dispuestos en una primera etapa de incubación, bloquearon los sitios de unión e impidieron que el mAB tomado como referencia, se uniera a esas mismas regiones. Aquel hibridoma que inhibiera en mayor grado la reactividad del mAB de Bio-Rad, sería el que más se asemejara al mismo en cuanto a reactividad frente a este tipo de antígeno.

El cálculo del porcentaje de inhibición para cada uno de los hibridomas (Tabla 25) se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \frac{100 \times \text{RLU Hibridoma} + \text{mAB BioRad}^*}{\text{RLU mAB BioRad}^*}$$

* mAB BioRad: mAB conjugado kit ELISA Platelia *Aspergillus* Ag (BioRad)

Tabla 25. Porcentaje de inhibición de cada uno de los hibridomas frente a antígeno de glicoproteína.

Hibridoma	Isotipo	RLU	% Inhibición
CL1	IgM	0,663	89%
CL2	IgM	1,409	76%
CL3	IgM	0,589	90%
CL4	IgM	0,473	92%
CL5	IgM	0,132	98%
CL7	IgM	0,912	84%
CL10	IgM	0,322	94%
CL13	IgM	0,049	99%
CL14	IgM	0,176	97%
CL15	IgM	4,382	25%

Hibridoma	Isotipo	RLU	% Inhibición
CL16	IgM	0,046	99%
CL17	IgM	0,62	89%
CL18	IgM	0,453	92%
CL19	IgM	0,264	95%
CL21	IgM	0,032	99%
CL22	IgM	0,583	90%
CL25	IgM	0,103	98%
CL26	IgM	0,347	94%
CL27	IgM	0,677	88%
CL28	IgM	2,64	55%
CL29	IgM	0,412	93%
CL30	IgM	4,515	22%
CL31	IgG2C	3,634	38%
CL33	IgG2C	4,445	24%
CL35	IgG2C	1,218	79%
CL36	IgG2C	4,439	24%
CL37	IgG2C	4,442	24%
CL38	IgG2C	3,093	47%
CL39	IgG2C	3,29	43%
CL40	IgG2C	1,104	81%
CL41	IgG2C	1,345	77%
CL42	IgG2C	4,859	17%
CL44	IgG2C	11,258	25%
CL45	IgG2C	2,47	58%
CL48	IgG2C	4,178	28%
CL49	IgG2C	4,362	25%
CL50	IgG1	4,269	27%
CL57	IgM	4,321	26%

El valor RLU aportado por el mAB de Bio-Rad en cada ensayo de inhibición se usó para el cálculo de aquellos hibridomas que se ensayaron en paralelo junto a él. Se señala en escala de color el grado de inhibición aportado por cada uno de ellos desde el rojo, ausencia de inhibición, al verde intenso, elevada inhibición.

Fueron un total de 14 hibridomas (CL3, CL4, CL5, CL10, CL13, CL14, CL16, CL18, CL19, CL21, CL22, CL25, CL26 y CL29) los que presentaron una inhibición superior al 90% y de estos 14, los denominados CL13, CL16 y CL21 mostraron un porcentaje de inhibición del 99%. Estos tres hibridomas expusieron un grado de similitud elevado en cuanto a reactividad frente al mismo epítipo o epítipos que el mAB presente en el conjugado del kit de Bio-Rad (Tabla 25).

En la Figura 49, se señala según la escala de color anteriormente descrita el grado de inhibición de cada uno de ellos señalando en rojo aquellos con inhibición $\leq 20\%$, en naranja los que presentaron una inhibición entre 20-90% y, en verde, los de $\geq 90\%$. De forma conjunta, se representa el índice de avidez y la reactividad de cada uno de los hibridomas ensayados.

2.4. ESTUDIO AVIDEZ DE HIBRIDOMAS.

El análisis mediante la técnica de avidéz nos proporcionó información acerca de la fuerza de unión que presentaban cada uno de los hibridomas frente al antígeno objeto de estudio.

Se eligió para el estudio el antígeno de glicoproteína (GP) por ser frente al que se obtuvo reactividad por parte de todos los hibridomas elegidos para este análisis. Además de los hibridomas seleccionados, se analizó el mAB conjugado EB-A2 cuyo valor e interpretación fue tomado como referencia.

El cálculo del índice de avidéz se llevó a cabo a través del cociente entre el valor del hibridoma sometido a la solución de urea y el valor de referencia sin urea (Tabla 26):

$$\text{Índice avidéz} = \frac{\text{RLU Hibridoma sometido a solución de urea}}{\text{RLU Hibridoma sometido a solución neutra}}$$

Si el valor obtenido fue superior a 0,5, se caracterizó como alta avidéz, es decir, alta capacidad de unión del anticuerpo por el antígeno; si, por el contrario, el resultado fue menor a 0,5, la unión es débil y se definió como baja avidéz.

Tabla 26. Índice de avidéz de cada uno de los hibridomas frente a antígeno de glicoproteína.

Hibridoma	Isotipo	Ag GP 0,5µg/ml		Índice avidéz	Interpretación avidéz (Alta avidéz >0,5-Baja avidéz<0,5)
		RLU Avidéz	RLU Ref.		
CL1	IgM	3,07	8,354	0,37	Baja avidéz
CL2	IgM	0,676	5,016	0,13	Baja avidéz
CL3	IgM	2,01	8,606	0,23	Baja avidéz
CL4	IgM	1,258	7,192	0,17	Baja avidéz
CL5	IgM	3,108	8,332	0,37	Baja avidéz
CL7	IgM	1,046	5,79	0,18	Baja avidéz
CL10	IgM	1,016	7,182	0,14	Baja avidéz
CL13	IgM	6,608	32,566	0,2	Baja avidéz
CL14	IgM	1,616	16,556	0,1	Baja avidéz
CL15	IgM	4,164	5,15	0,81	Alta avidéz
CL16	IgM	5,288	44,234	0,12	Baja avidéz
CL17	IgM	3,152	15,002	0,21	Baja avidéz
CL18	IgM	1,848	7,982	0,23	Baja avidéz
CL19	IgM	4,074	10,866	0,37	Baja avidéz
CL21	IgM	12,88	18,824	0,68	Alta avidéz
CL22	IgM	2,39	5,37	0,45	Baja avidéz
CL25	IgM	2,194	11,492	0,19	Baja avidéz
CL26	IgM	1,072	5,318	0,2	Baja avidéz
CL27	IgM	1,946	6,85	0,28	Baja avidéz
CL28	IgM	0,344	1,714	0,2	Baja avidéz
CL29	IgM	1,084	9,722	0,11	Baja avidéz
CL30	IgM	0,312	2,75	0,11	Baja avidéz

Hibridoma	Isotipo	Ag GP 0,5µg/ml		Índice avidez	Interpretación avidez (Alta avidez >0,5-Baja avidez<0,5)
		RLU Avidez	RLU Ref.		
CL31	IgG2C	1,406	4,986	0,28	Baja avidez
CL33	IgG2C	0,784	2,426	0,32	Baja avidez
CL35	IgG2C	9,194	15,166	0,61	Alta avidez
CL36	IgG2C	1,214	1,992	0,61	Alta avidez
CL37	IgG2C	0,258	1,197	0,22	Baja avidez
CL38	IgG2C	3,248	6,36	0,51	Alta avidez
CL39	IgG2C	0,554	2,246	0,25	Baja avidez
CL40	IgG2C	9,79	17,154	0,57	Alta avidez
CL41	IgG2C	10,3	17,21	0,6	Alta avidez
CL42	IgG2C	1,02	1,784	0,57	Alta avidez
CL44	IgG2C	0,525	0,997	0,53	Alta avidez
CL45	IgG2C	5,462	9,272	0,59	Alta avidez
CL48	IgG2C	0,228	1,269	0,18	Baja avidez
CL49	IgG2C	0,324	1,069	0,3	Baja avidez
CL50	IgG1	0,569	1,117	0,51	Alta avidez
CL57	IgM	0,892	0,899	0,99	Alta avidez
mAB Bio-rad	IgM	25,512	30,874	0,83	Alta avidez

De los 38 hibridomas seleccionados para el ensayo, todos presentaron baja avidez excepto 12, los denominados CL15, CL21, CL35, CL36, CL38, CL40, CL41, CL42, CL44, CL45, CL49, CL50 y CL57. Estos, al igual que el mAB empleado en el kit de Bio-Rad, presentaron alta avidez, es decir, alta fuerza de unión antígeno-anticuerpo (Tabla 26).

En la Figura 49, separado por línea discontinua, se encuentra el punto de corte definido para la técnica de avidez, es decir, índice 0,5. Todos aquellos hibridomas que estén por encima de la línea se consideran alta avidez, lo que se traduce en alta fuerza de unión antígeno-anticuerpo. Por otro lado, y para mostrar una representación conjunta de los datos, se muestra según escala de color el porcentaje de inhibición de cada uno de ellos; el grado de reactividad, basado en una escala según las señales aportadas de RLU, se representa por el tamaño del símbolo; finalmente, la forma de este aporta la información del isotipo.

El hibridoma con las características más similares al anticuerpo EB-A2 fue el denominado CL21 por aportar reactividad frente al antígeno de glicoproteína (escala RLU 10-20), por presentar alta avidéz (índice 0,68) y un elevado grado de inhibición (99%). Además, presentó isotipo IgM.

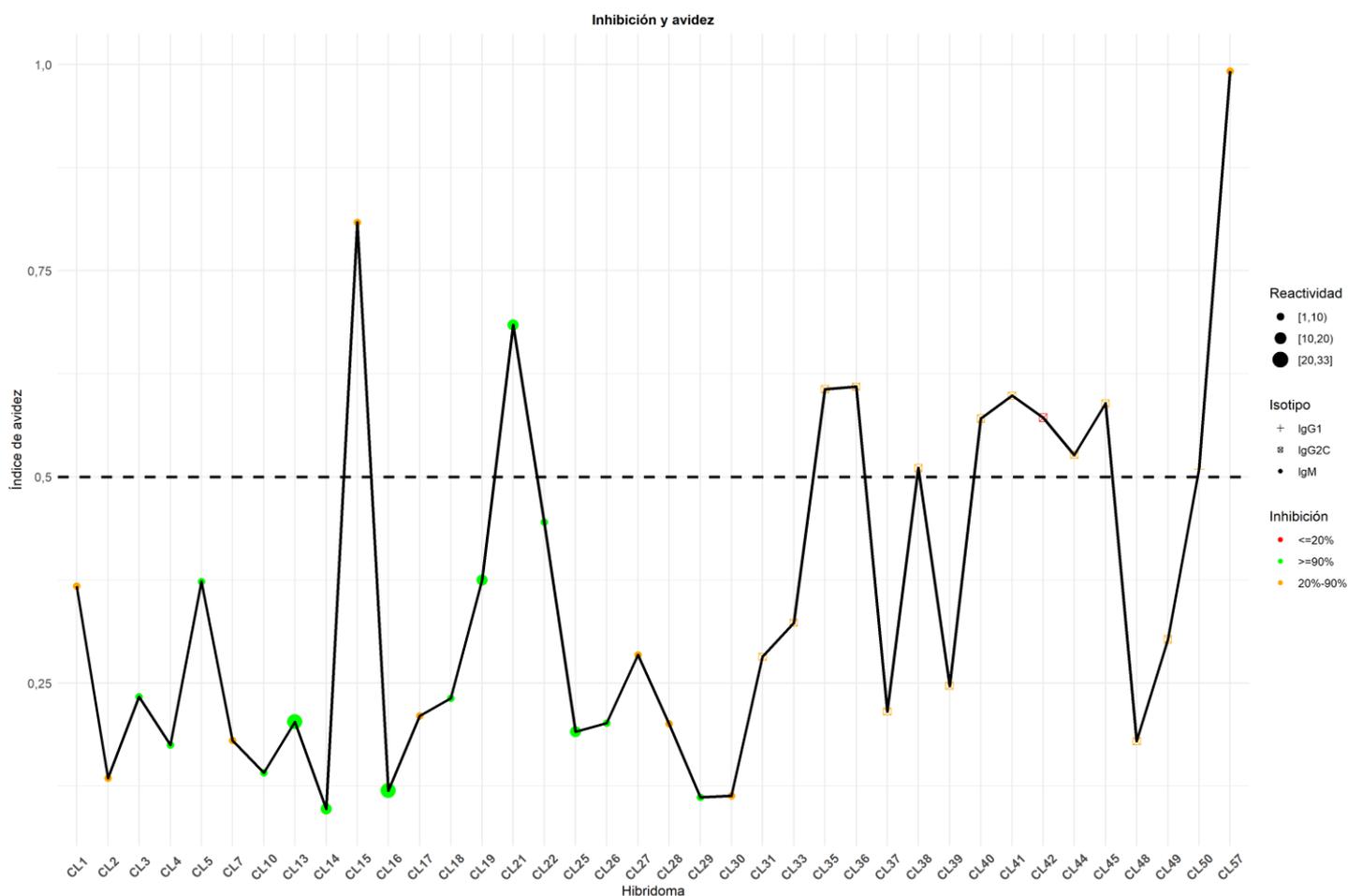


Figura 49. Gráfica de líneas que muestra el índice de avidéz, el grado de inhibición y la reactividad de cada uno de los hibridomas ensayados.

3. ANTICUERPOS MONOCLONALES PURIFICADOS.

Los 12 hibridomas elegidos para la purificación, así como sus características principales, se detallan y resumen a continuación:

CL2: isotipo IgM, reactividad frente a antígeno de alto peso molecular, >440 kDa, y glicoproteína. Con baja avidéz y un grado de inhibición del 76%.

CL3: isotipo IgM, reactividad frente a todas las fracciones antigénicas en mayor o menor medida siendo esta superior en antígeno de alto peso molecular, >440 kDa, y glicoproteína. Con baja avidéz y un grado de inhibición del 90%.

CL4: isotipo IgM, reacción frente a todas las fracciones antigénicas excepto frente a la parte proteica y el antígeno de bajo peso molecular (<13 kDa). Con baja avidéz y 92% de inhibición.

CL5: isotipo IgM, reacción frente a todas las fracciones antigénicas siendo esta mayor frente a antígeno de alto peso molecular, glicoproteína y bajo peso molecular, el tipo 75-29 kDa. Con baja avidéz y 98% de inhibición.

CL13: isotipo IgM, presentó reactividad frente a todas las fracciones antigénicas en mayor o menor medida, siendo esta superior en glicoproteína, alto peso molecular, seguidas de medio peso molecular, 440-75 kDa, y bajo peso molecular, el tipo 75-29 kDa. Con baja avidéz y un 99% de inhibición.

CL15: isotipo IgM, con menor reactividad que los citados anteriores, en mayor grado frente al antígeno de alto peso molecular y bajo peso molecular. Con alta avidéz y con un grado de similitud muy bajo frente al mAB EB-A2, ya que presentó solo un 25% de inhibición.

CL17: isotipo IgM, con mayor reactividad frente a los antígenos de alto peso molecular y glicoproteína, presentó reacción en menor medida con el resto de fracciones. Con baja avidéz y un 89% de inhibición.

CL21: isotipo IgM, con reactividad frente a todas las fracciones antigénicas, destacado por ser el único con notable reactividad sobre los antígenos de medio y bajo peso molecular, cubriendo el rango 440-13 kDa. Con alta avidéz y con un 99% de inhibición.

CL35: isotipo IgG2c, reacción en mayor medida con los antígenos de alto peso molecular y glicoproteína frente a su reacción con antígeno de medio y bajo peso molecular. Con alta avidéz y 79% de inhibición.

CL36: isotipo IgG2c, reducida reactividad si comparamos con el anterior del mismo isotipo, siendo esta mayor en antígeno de alto y bajo peso molecular. Con alta avidéz y un grado de inhibición en el 24%.

CL56: isotipo IgG2c, elegido por su exclusiva reactividad frente a antígeno de proteína.

CL60: isotipo IgG2c, elegido por su exclusiva reactividad frente a antígeno de proteína.

En los ensayos de caracterización, no se incluyó en el de inhibición los denominados CL56 ni CL60 ya que, debido a su exclusiva reacción frente a la fracción proteica, no pudo analizarse su comportamiento ni similitud con respecto al mAB EB-A2 ni con respecto al resto de clones. Estos dos clones se seleccionaron para su purificación con el objetivo de analizar si en ensayo de captura pudieran aportar algo al menos frente a la fracción proteica y si esto ocurriera, evaluar la combinación de estos clones con otros óptimos en la detección del resto de fracciones.

4. OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA INMUNOENZIMÁTICO DE CAPTURA TIPO SANDWICH.

4.1. CARACTERIZACIÓN ANTICUERPOS MONOCLONALES PURIFICADOS.

En primer lugar, mediante ensayo CLIA indirecto, se analizó la reactividad de cada uno de los clones purificados frente al complejo glicoproteína. El antígeno se dispuso a una concentración de 0,5 µg/ml inmovilizado en placa y los diferentes clones purificados se evaluaron a concentraciones seriadas (Tabla 27).

Tabla 27. Ensayo indirecto: titulación de clones purificados frente a antígeno GP.

([] Clon purificado: concentración a la que se disponen los clones purificados; Columna 2 a 12: Valores RLU de cada clon purificado)

[] Clon purificado	CL2	CL3	CL4	CL5	CL13	CL15	CL17	CL21	CL35	CL36	CL56	CL60
1 µg/ml	5,344	6,955	11,38	9,499	2,545	0,253	7,718	4,875	0,245	0,172	0,08	0,134
0,5 µg/ml	3,365	4,205	6,871	5,155	1,469	0,169	4,929	2,227	0,169	0,155	0,088	0,094
0,25 µg/ml	1,649	2,086	3,626	2,501	1,013	0,105	2,548	0,941	0,082	0,099	0,046	0,071
0,125 µg/ml	0,708	0,882	1,574	1,064	0,574	0,079	1,065	0,363	0,054	0,078	0,064	0,059
0,0625 µg/ml	0,378	0,479	0,717	0,494	0,357	0,083	0,482	0,199	0,061	0,077	0,062	0,066
0,03125 µg/ml	0,286	0,227	0,316	0,295	0,294	0,18	0,331	0,112	0,081	0,074	0,322	0,407
0,0156 µg/ml	0,153	0,118	0,134	0,154	0,16	0,096	0,131	0,08	0,057	0,057	0,061	0,075
Blanco	0,099	0,081	0,069	0,071	0,062	0,066	0,059	0,065	0,06	0,058	0,068	0,053

Aquellos en los que no se obtiene reacción, se evaluaron por la fracción antigénica frente a la que presentaron mayor reactividad en su formato de hibridoma. En el caso de CL15, CL35 y CL36, se ensayaron frente a antígeno de alto peso molecular y en el caso de CL56 y CL60, frente a antígeno de proteína (Tabla 28).

Tabla 28. Ensayo indirecto: titulación de clones purificados frente a antígeno >440kDa o proteína.

([] Clon purificado: concentración a la que se disponen los clones purificados; Columna 2 a 6: Valores RLU de cada clon purificado)

[] Clon purificado	>440kDa			Proteína	
	CL 15	CL 35	CL 36	CL 56	CL 60
1 µg/ml	8,629	2,508	4,388	1,914	2,24
0,5 µg/ml	7,775	1,108	3,659	1,019	1,116
0,25 µg/ml	6,63	0,516	3,017	0,616	0,739
0,125 µg/ml	5,412	0,247	2,76	0,287	0,391
0,0625 µg/ml	4,354	0,186	2,261	0,235	0,271
0,03125 µg/ml	4,13	0,297	1,931	0,32	0,336
0,0156 µg/ml	2,485	0,167	0,995	0,194	0,187
Blanco	0,15	0,14	0,095	0,116	0,146

El inmunoensayo enzimático tipo indirecto mostró que CL4 fue el clon purificado que presentaba mayor reacción frente a antígeno de glicoproteína. Por otro lado, de los 3 evaluados con el antígeno de alto peso molecular, CL15 fue el que lo hizo en mayor medida, y por último, respecto a la fracción

proteica, ambos clones purificados presentaron valores similares de RLU, siendo CL60 el que aventajó muy ligeramente (Figura 50).

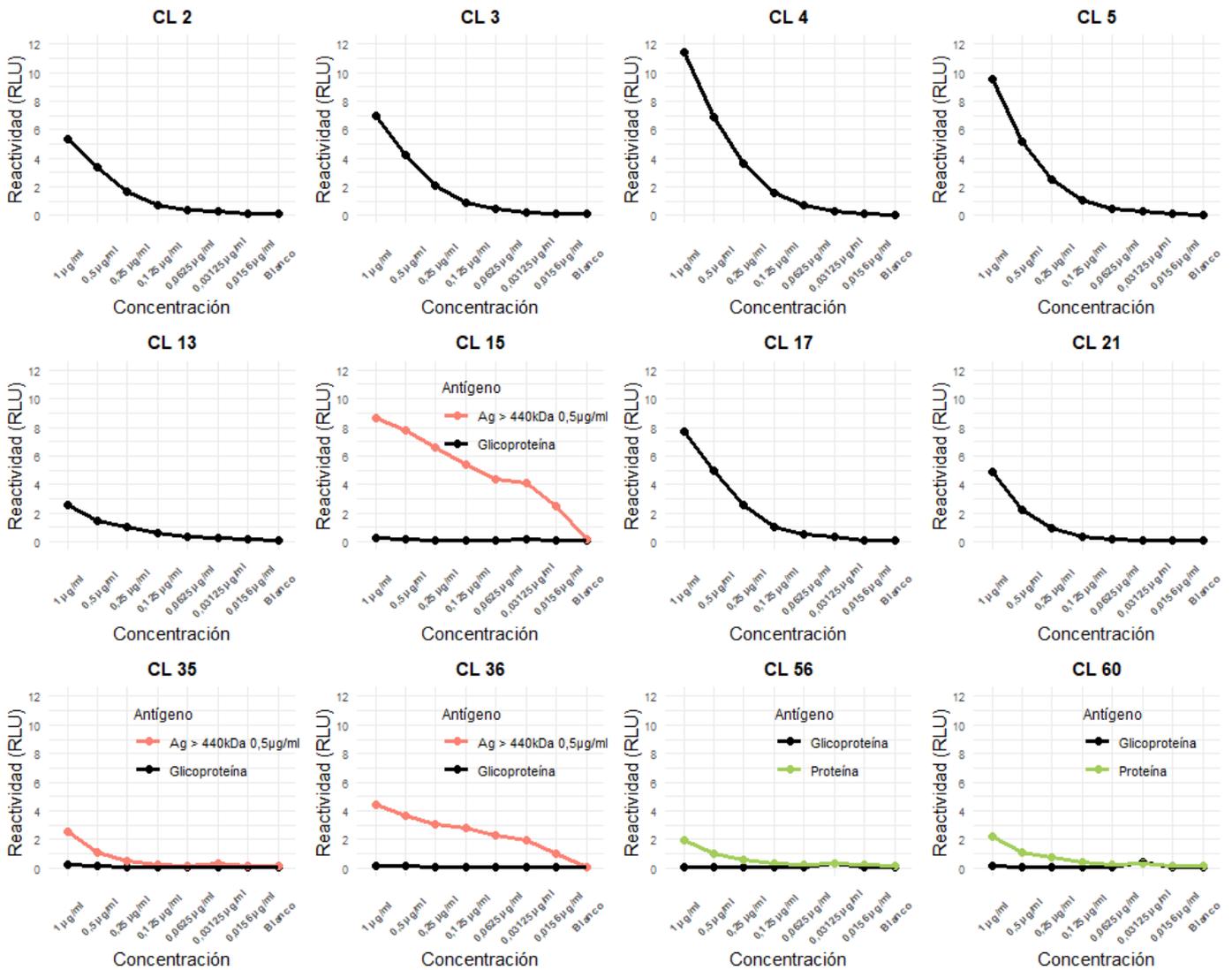


Figura 50. Reactividad de clones purificados frente a antígeno de distinta naturaleza.

(Línea negra corresponde a antígeno de glicoproteína; línea salmón corresponde a antígeno de >440 kDa; línea verde, a antígeno de proteína)

Tras la realización de este ensayo donde se comprobó que no se había perdido reactividad por parte de los mAB purificados, se continuó con la relación de ensayos destinados a la elección del mAB o los mAB que conformaran el sistema de captura tipo sandwich.

Ya se había analizado el grado de similitud de los hibridomas tomando como referencia el mAB EB-A2 mediante ensayo de inhibición. En ese momento, se analizó también, una vez que el mAB había

sido purificado, disponiéndose cada tipo de antígeno inmovilizado en placa a una concentración de 0,5 µg/ml (cada uno reflejado por un color en la Figura 51), mediante ensayo indirecto, se dispuso en una primera etapa de incubación cada uno de los mAB a una concentración fija (primera columna Tabla 29) y en una segunda etapa, el mAB EB-A2 conjugado con peroxidasa, siendo este el que aporte la señal en función de su unión a los epítomos que hayan quedado libres tras la primera incubación con los clones purificados.

El porcentaje de inhibición a través de las señales RLU obtenidas (Tabla 29) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \frac{100 \times RLU \text{ Hibridoma} + mAB \text{ EB} - A2^*}{RLU \text{ mAB EB} - A2^*}$$

EB-A2*: mAB conjugado kit ELISA Platelia *Aspergillus* Ag (BioRad)

Tabla 29. Inhibición de cada clon purificado frente a distinto tipo de antígeno con respecto al mAB EB-A2.

([] mAB: concentración mAB; Tipo Ag: tipo de antígeno; Columna 2 a 4: Valores RLU de cada clon purificado)

[] mAB / Tipo Ag	<13 kDa	GP	>440 kDa	% INHIB <13 kDa	% INHIB GP	% INHIB >440 kDa
CL2 10 µg/ml	10,09	6,872	4,78	5%	27%	25%
CL3 10 µg/ml	10,542	7,132	4,672	1%	24%	27%
CL4 10 µg/ml	9,589	1,478	2,17	10%	84%	66%
CL5 10 µg/ml	9,571	4,136	3,541	10%	56%	45%
CL13 10 µg/ml	10,808	5,676	5,741	-1%	40%	10%
CL15 10 µg/ml	10,914	7,609	6,031	-2%	19%	6%
CL17 10 µg/ml	10,955	7,144	5,457	-3%	24%	15%
CL21 10 µg/ml	7,8	0,373	1,886	27%	96%	71%
CL35 10 µg/ml	9,758	5,102	4,179	8%	46%	35%
CL36 10 µg/ml	10,204	7,102	5,445	4%	25%	15%
CL56 10 µg/ml	10,886	8,552	5,25	-2%	9%	18%
CL60 10 µg/ml	10,324	5,962	4,946	3%	37%	23%
Control mAB EB-A2	10,658	9,424	6,399	-	-	-

Aquellos porcentajes iguales o superiores al 25% han sido señalados en rojo (Tabla 29). Existió mayor cantidad de mAB purificados que presentaban reacción frente al mismo epítomo o conjunto de epítomos que el monoclonal EB-A2 en el caso del antígeno compuesto por la suma de galactomanano y proteína. Fueron menos los casos con el antígeno de alto peso molecular y con respecto al antígeno de bajo peso molecular, solo fue el CL21 el que presentó un 27% de inhibición. El CL21 es el que presentó el porcentaje de inhibición superior al resto de clones purificados para los tres tipos de antígenos evaluados (Figura 51), lo cual puede traducirse en su grado de similitud con respecto al mAB de Bio-Rad en cuanto a afinidad por el o los mismos tipos de epítomos.

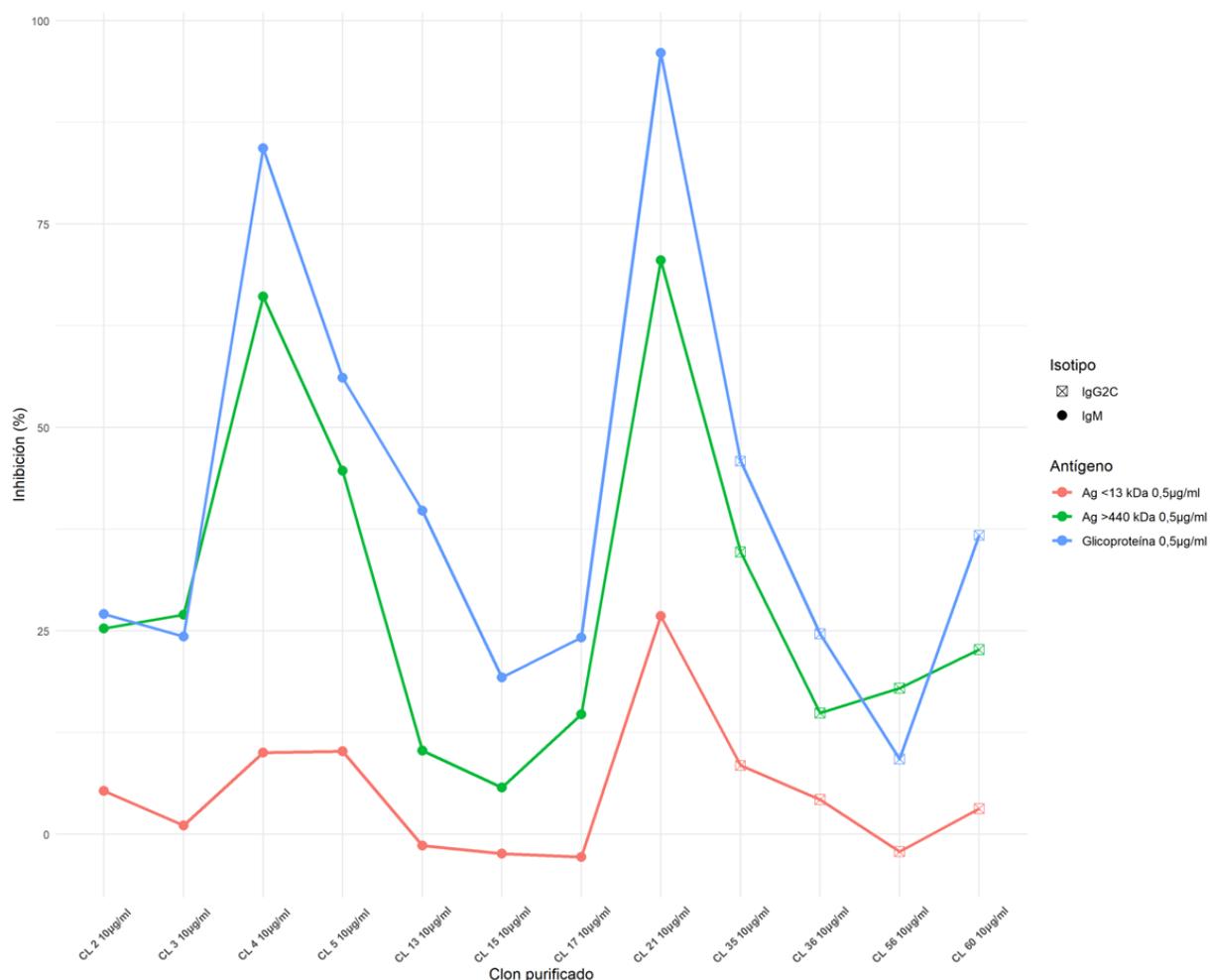


Figura 51. Inhibición de clones purificados frente a distintas fracciones antigénicas con respecto al mAB EB-A2.

Por otro lado, mediante un ensayo de inhibición basado en el procedimiento seguido anteriormente, se analizó la similitud entre todos los clones purificados. Consistió en comparar cada uno de ellos frente a todos los demás, con un total de 100 combinaciones posibles. El antígeno usado para este ensayo fue el de alto peso molecular, es decir >440 kDa. Se decidió usar este tipo de antígeno ya que fue aquel sobre el que se obtuvo reactividad por parte del formato hibridoma por parte de cada clon purificado.

Se muestra la tabla con los resultados obtenidos a continuación, el mAB primario aparece reflejado en la columna de la izquierda a 10 µg/ml y el mAB secundario conjugado con peroxidasa se muestra en el encabezado de cada columna y aparece marcado como “CL X - H”, el cual fue usado a 1 µg/ml, según el dato de su concentración de base. En la última fila, se muestra un pocillo denominado “control”, en él se muestra la señal RLU de cada uno de los clones conjugados con peroxidasa sin presencia previamente de otro mAB purificado. Este pocillo, en la primera incubación, se dispuso con

tampón neutro con suplemento de BSA al 1% (p/v) con el objetivo de que en ese periodo de tiempo la placa no estuviera sometida a 37°C durante 20 minutos en seco (Tabla 30.1).

El porcentaje de inhibición a través de las señales RLU obtenidas (Tabla 30.2) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición CL2 - H} = 100 - \frac{100 \times RLU \text{ CL2} + \text{CL2} - H}{RLU \text{ CL2} - H}$$

$$\% \text{ Inhibición CL2 - H} = 100 - \frac{100 \times RLU \text{ CL3} + \text{CL2} - H}{RLU \text{ CL2} - H}$$

$$\% \text{ Inhibición CL2 - H} = 100 - \frac{100 \times RLU \text{ CL4} + \text{CL2} - H}{RLU \text{ CL2} - H}$$

Y así sucesivamente para cada una de las condiciones.

Tabla 30. Valores RLU y valores en % de inhibición de todos los clones purificados.
30.1. Valores RLU de ensayo de inhibición de todos los clones purificados.

	CL2-H	CL3-H	CL4-H	CL5-H	CL13-H	CL15-H	CL17-H	CL21-H	CL35-H	CL36-H
CL2	4,248	2,974	3,556	3,344	5,744	5,317	2,257	4,965	0,609	2,023
CL3	1,509	0,778	1,456	1,322	3,797	3,432	1,524	2,870	0,593	2,246
CL4	4,283	3,015	3,687	3,180	4,911	4,128	2,657	5,047	0,674	2,632
CL5	1,362	0,989	1,333	0,826	3,647	3,711	1,808	2,317	0,691	2,529
CL13	1,587	1,152	1,752	1,223	4,072	3,381	1,732	4,311	0,559	1,958
CL15	6,202	4,297	4,396	3,832	6,486	2,591	2,888	6,009	0,716	2,007
CL17	4,765	3,072	4,408	2,599	5,597	2,835	2,261	4,941	0,698	2,089
CL21	1,255	0,483	0,747	0,542	4,201	4,057	1,855	0,460	0,636	1,978
CL35	8,847	8,017	9,206	6,859	7,760	5,947	4,311	7,600	0,706	1,978
CL36	7,755	6,828	7,818	6,438	7,984	4,963	4,690	7,675	0,786	2,976
Control	10,097	9,291	11,566	9,437	9,953	5,784	5,397	8,508	1,061	1,863

30.2. Valores % de inhibición de todos los clones purificados.

	CL2-H	CL3-H	CL4-H	CL5-H	CL13-H	CL15-H	CL17-H	CL21-H	CL35-H	CL36-H
CL2	58%	68%	69%	65%	42%	8%	58%	42%	43%	-9%
CL3	85%	92%	87%	86%	62%	41%	72%	66%	44%	-21%
CL4	58%	68%	68%	66%	51%	29%	51%	41%	36%	-41%
CL5	87%	89%	88%	91%	63%	36%	66%	73%	35%	-36%
CL13	84%	88%	85%	87%	59%	42%	68%	49%	47%	-5%
CL15	39%	54%	62%	59%	35%	55%	46%	29%	33%	-8%
CL17	53%	67%	62%	72%	44%	51%	58%	42%	34%	-12%
CL21	88%	95%	94%	94%	58%	30%	66%	95%	40%	-6%
CL35	12%	14%	20%	27%	22%	-3%	20%	11%	33%	-6%
CL36	23%	27%	32%	32%	20%	14%	13%	10%	26%	-60%

Las celdas señaladas en verde, reflejan el porcentaje de inhibición en el que el mAB purificado, que actuaba como elemento inhibidor o anticuerpo primario del sistema, era el mismo que el anticuerpo que actuaba como elemento secundario del sistema, el cual se usó conjugado con peroxidasa. Se considera que el proceso de inhibición es satisfactorio, y sus resultados así lo muestran, cuando el porcentaje mayor de inhibición se presenta de un monoclonal concreto frente a él mismo. Realizando una lectura por columnas (Tabla 30.2.), en todos los casos, excepto para CL15, CL21 y CL36, otras combinaciones de anticuerpos (señaladas en azul) presentaban mayor porcentaje de inhibición que la condición ideal que sería la de cada uno consigo mismo.

4.2. DISEÑO DEL SISTEMA DE CAPTURA BASADO EN QUIMIOLUMINISCENCIA.

Mediante un ensayo de captura tipo sandwich se analizó la capacidad de captura de los diferentes mAB purificados frente a cada uno de los antígenos sobre los cuales se había obtenido reactividad en el ensayo indirecto anterior.

Los diferentes mAB se dispusieron a una concentración de 1 µg/ml tapizando la microplaca. El tipo de antígeno, detallado en la tabla de resultados, se dispuso a varias concentraciones, y como elemento detector del sistema se usó el mAB conjugado con peroxidasa suministrado por el kit de Bio-Rad. Por cada condición, además de los valores aportados por cada concentración de antígeno, se obtuvo un valor de ruido de fondo aportado por el mAB de Bio-Rad sobre la placa revestida por cada uno de los mAB (Tabla 31).

Tabla 31. Valores RLU de ensayo de captura tipo sandwich con clones purificados como elementos de captura y mAB de Bio-Rad como elemento detector.
(Concentraciones de la primera columna corresponden al antígeno)

Antígeno	GP	GP	GP	GP	GP	>440kDa	GP	GP	>440kDa	>440kDa	Proteína	Proteína
mAB placa	CL 2	CL3	CL 4	CL 5	CL 13	CL 15	CL 17	CL 21	CL 35	CL 36	CL 56	CL 60
0,2 µg/ml	4,252	2,948	6,086	5,872	0,785	2,964	4,956	5,9	2,305	1,444	0,129	1,73
0,1 µg/ml	2,723	2,467	3,808	4,129	0,585	1,615	2,999	4,151	1,523	1,141	0,1	1,079
0,05 µg/ml	1,923	1,764	3,018	2,934	0,458	1,239	2,323	3,275	1,758	0,962	0,11	0,849
Blanco	1,225	1,53	1,99	2,325	0,356	0,81	1,574	2,441	1,002	0,817	0,088	0,524

A continuación, se calculó la ratio señal/fondo con el objetivo de normalizar las señales obtenidas para cada condición en función del ruido de fondo aportado por cada una de las parejas de mAB (Tabla 32).

Tabla 32. Valores ratio señal/fondo de ensayo de captura tipo sandwich con clones purificados como elementos de captura y mAB de Bio-Rad como elemento detector.
(Concentraciones de la primera columna corresponden al antígeno)

Antígeno	GP	GP	GP	GP	GP	>440kDa	GP	GP	>440kDa	>440kDa	Proteína	Proteína
mAB placa	CL 2	CL3	CL 4	CL 5	CL 13	CL 15	CL 17	CL 21	CL 35	CL 36	CL 56	CL 60
0,2 µg/ml	3,47	1,93	3,06	2,53	2,21	3,66	3,15	2,42	2,3	1,77	1,47	3,3
0,1 µg/ml	2,22	1,61	1,91	1,78	1,64	1,99	1,91	1,7	1,52	1,4	1,14	2,06
0,05 µg/ml	1,57	1,15	1,52	1,26	1,29	1,53	1,48	1,34	1,75	1,18	1,25	1,62
Blanco	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Cuanto mayor sea la diferencia con respecto al valor de ratio 1 aportado por el pocillo “blanco”, mayor será la discriminación entre la señal aportada en la captura del antígeno y el fondo de reacción. El denominado CL2 como elemento de captura junto con el monoclonal de Bio-Rad como elemento detector, fue la opción que presentó mejor discriminación para las tres concentraciones empleadas de antígeno de GP (Tabla 32). En cuanto al antígeno de alto peso molecular, destacó CL15. La ratio señal/fondo obtenida por parte de CL35 a la concentración más baja de antígeno, pudo deberse a un error aportado por el montaje de la técnica ya que la señal RLU obtenida por la concentración previa fue ligeramente inferior que esta última (Tabla 31).

A continuación, se invirtió el sistema de captura de tal manera que el mAB destinado para la captura fue el proporcionado por el kit de Bio-Rad y, como elemento detector, se evaluaron cada uno de los clones purificados. En este caso, se trató de un ensayo basado en la técnica ELISA ya que, al no disponer del mAB de captura de Bio-Rad en solución, se usó la placa que facilita el kit.

Se empleó un único punto de concentración de antígeno y otro pocillo que actuó como “blanco” para analizar el ruido de fondo que aportó cada clon purificado conjugado sobre la placa de Bio-Rad.

En la primera columna se muestra la concentración empleada del antígeno purificado y el pocillo destinado para “blanco” o fondo de la reacción, y en las sucesivas, el mAB conjugado con peroxidasa (Clon purificado HRP) a una concentración normalizada (1 µg/ml según la concentración inicial de mAB). Las señales están expresadas en DO ya que, como se ha mencionado anteriormente, se usó la placa de ELISA proporcionada en el kit de Bio-Rad (Tabla 33). Se calculó la ratio señal/fondo con el objetivo de normalizar las señales obtenidas según la señal aportada por el antígeno y la señal aportada por el blanco en cada caso para analizar el grado de discriminación de cada pareja de mAB (Tabla 34).

Tabla 33. Valores DO de ensayo de captura tipo sandwich con mAB de Bio-Rad como elemento de captura y clones purificados como elementos detectores.
(Concentración de la primera columna corresponde al antígeno)

Antígeno	GP	GP	GP	GP	GP	>440kDa	GP	GP	>440kDa	>440kDa	Proteína	Proteína
mAB HRP	CL 2	CL3	CL 4	CL 5	CL 13	CL 15	CL 17	CL 21	CL 35	CL 36	CL 56	CL 60
0,1µg/ml	1,238	0,452	3,053	1,929	0,548	0,454	0,512	2,74	2,134	3,443	0,502	0,512
Blanco	0,726	0,259	0,305	0,653	0,254	0,34	0,39	0,582	1,948	4,436	0,425	0,407

Tabla 34. Valores ratio señal/fondo de ensayo de captura tipo sandwich con mAB de Bio-Rad como elemento de captura y clones purificados como elementos detectores.
(Concentración de la primera columna corresponde al antígeno)

Antígeno	GP	GP	GP	GP	GP	>440kDa	GP	GP	>440kDa	>440kDa	Proteína	Proteína
mAB HRP	CL 2	CL3	CL 4	CL 5	CL 13	CL 15	CL 17	CL 21	CL 35	CL 36	CL 56	CL 60
0,1µg/ml	1,705	1,745	10,01	2,954	2,157	1,335	1,313	4,708	1,095	0,776	1,181	1,258
Blanco	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Los sistemas con los cuales se obtuvo mayor discriminación entre el positivo y el fondo fueron los aportados por placa de Bio-Rad y CL4 como conjugado (ratio señal/fondo 10,01) y placa Bio-Rad con CL21 como conjugado (ratio señal/fondo 4,71).

En la Figura 52 se muestran los valores de ratio señal/fondo para cada una de las condiciones. Los puntos unidos por líneas corresponden al ensayo donde los clones purificados se dispusieron en placa y como conjugado se empleó el anticuerpo de Bio-Rad (detallado en la gráfica, en el eje de abscisas, como PC); y, por otro lado, los puntos aislados en la parte derecha de cada representación corresponden a la ratio señal/fondo de la única concentración evaluada donde se empleó la placa de Bio-Rad y cada uno de los clones purificados como conjugado (detallado en la gráfica, en el eje de ordenadas, como PB).

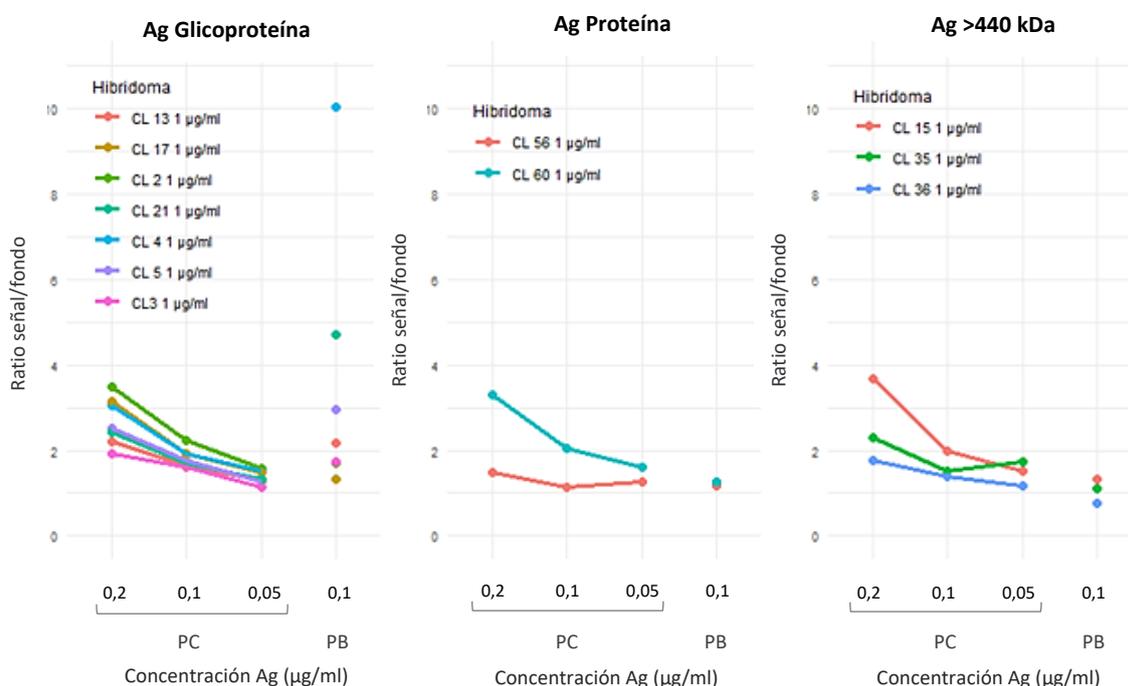


Figura 52. Ensayo captura tipo sandwich combinando clones purificados y mAB Bio-Rad.

Acto seguido, mediante ensayo de captura tipo sandwich, se analizó cada uno de los clones purificados actuando como elemento de captura y/o elemento detector del sistema. Hubo 144 combinaciones distintas, es decir, los 12 clones purificados dispuestos en placa y los mismos 12 clones purificados conjugados con peroxidasa. Se evaluó una única concentración de las cuatro fracciones antigénicas seleccionadas. Nuevamente, se destinó un pocillo que aportó información acerca del fondo de reacción. La concentración empleada para cada antígeno fue de 0,1 µg/ml y las fracciones seleccionadas fueron la de glicoproteína, proteína y GM de alto y bajo peso molecular. Los clones purificados se disponen sensibilizando la placa a una concentración de 1 µg/ml y, conjugados con peroxidasa, a la misma concentración. Los resultados se expresaron en RLU (Tabla 35) y se calculó la discriminación mediante ratio señal/fondo (Tabla 36).

Los valores de ratio señal/fondo se representaron en una gráfica que muestra, para cada tipo de antígeno, aquella combinación con la que se obtuvo un mayor grado de discriminación entre la concentración de antígeno evaluada y el ruido de fondo. Para todos los tipos de antígeno evaluados, la condición de sandwich con la que se obtuvieron mejores tasas de discriminación fue la aportada por CL21 como anticuerpo de captura y CL21-H como anticuerpo detector. Se observó de mayor a menor, el grado de discriminación para el antígeno de glicoproteína, antígeno de alto peso molecular, >440 kDa, antígeno de bajo peso molecular, <13 kDa, y proteína (línea verde Figura 53).

Tabla 35. Valores RLU de ensayo captura tipo sandwich donde todos los clones purificados actúan como elemento de captura y como elemento detector del sistema.

CLON PURIFICADO HRP	ANTÍGENO	CLON PURIFICADO EN PLACA											
		CL 2 1µg/ml	CL 3 1µg/ml	CL 4 1µg/ml	CL 5 1µg/ml	CL 13 1µg/ml	CL 15 1µg/ml	CL 17 1µg/ml	CL 21 1µg/ml	CL 35 1µg/ml	CL 36 1µg/ml	CL 56 1µg/ml	CL 60 1µg/ml
CL 2 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	4,265	1,297	8,979	2,297	2,336	5,297	1,067	3,497	3,175	1,297	1,459	2,797
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	4,326	1,336	5,354	2,977	2,364	4,228	0,997	3,249	3,225	1,118	1,979	2,641
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	3,267	1,597	2,597	1,825	1,972	3,697	1,578	1,597	3,287	1,226	1,897	2,578
	Ag Proteína 0,1µg/ml	4,298	1,441	1,975	1,328	1,523	4,216	0,897	0,597	3,169	1,879	1,628	2,571
	Blanco	3,225	1,328	1,277	1,264	1,489	4,027	0,779	0,551	2,783	1,587	1,554	2,497
CL 3 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	6,785	3,497	3,045	1,047	2,544	2,297	3,120	1,589	3,248	1,097	2,002	1,819
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	5,998	3,149	3,131	1,004	1,972	2,336	3,979	1,952	3,120	1,228	2,397	1,894
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	5,421	2,255	3,329	0,954	1,214	2,147	2,533	1,058	3,427	1,058	1,588	1,990
	Ag Proteína 0,1µg/ml	5,319	1,229	4,062	0,826	0,597	2,108	2,982	1,052	2,628	0,987	1,417	1,844
	Blanco	4,597	1,218	2,978	0,788	0,536	2,044	2,087	0,914	2,336	0,726	0,921	1,287
CL 4 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	2,095	3,055	5,267	1,112	2,088	1,743	2,028	8,805	2,037	1,927	2,979	2,697
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	1,679	2,341	4,221	1,068	1,987	1,931	1,938	7,260	2,225	1,829	2,688	2,587
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	2,305	3,712	2,264	1,045	1,393	1,801	1,877	5,510	3,397	1,994	3,197	3,189
	Ag Proteína 0,1µg/ml	2,704	1,979	1,597	0,943	1,578	2,010	1,417	5,329	1,597	1,879	2,632	2,119
	Blanco	1,183	1,828	1,225	0,869	1,264	1,628	0,938	2,599	1,489	1,597	1,987	2,074
CL 5 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	1,297	1,414	2,314	1,597	2,067	2,054	1,064	2,031	1,979	2,957	2,002	1,597
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	1,226	1,597	2,108	1,226	2,113	1,982	1,003	2,003	1,588	2,336	2,189	1,266
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	1,228	1,970	2,332	1,297	2,098	1,336	1,187	2,871	1,697	2,187	1,972	1,054
	Ag Proteína 0,1µg/ml	1,108	1,829	1,928	1,261	1,997	1,597	1,008	2,364	1,828	2,360	1,287	1,364
	Blanco	1,112	1,359	1,817	1,447	1,829	1,241	0,978	1,978	1,424	2,108	1,003	1,011
CL 13 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	0,879	1,067	1,119	2,149	2,187	2,197	2,197	2,260	2,490	2,667	3,649	2,619
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	0,597	1,118	1,497	1,597	2,697	2,597	2,118	1,879	2,231	2,597	3,118	2,297
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	0,597	1,260	1,134	1,297	2,065	2,331	2,697	1,664	2,327	2,497	3,158	2,268
	Ag Proteína 0,1µg/ml	0,599	1,297	1,597	1,587	1,597	2,417	1,970	1,528	1,979	1,746	2,597	2,147
	Blanco	0,497	0,987	1,008	1,087	1,118	1,979	1,364	1,325	1,697	1,523	2,528	1,928
CL 15 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	2,013	2,332	2,335	1,697	1,679	2,057	1,697	2,150	2,197	2,197	2,297	2,336
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	2,118	2,064	2,670	1,547	1,660	2,225	1,447	1,979	3,197	1,978	2,145	2,497
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	2,329	2,118	2,318	1,260	1,697	2,365	1,679	1,597	2,979	1,336	2,679	2,187
	Ag Proteína 0,1µg/ml	2,267	1,897	1,657	1,359	1,221	2,189	1,509	1,329	1,697	1,979	1,697	2,270
	Blanco	1,847	1,814	1,590	1,114	1,014	2,205	1,665	1,264	1,378	1,231	1,348	2,097
CL 17 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	3,497	1,947	2,170	3,190	2,197	1,979	2,064	3,264	2,164	1,150	1,734	2,979
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	3,196	1,297	1,679	3,189	2,188	1,261	2,003	2,154	2,756	1,166	1,697	1,670
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	2,649	1,656	1,640	2,649	2,134	1,236	1,897	2,449	1,279	1,144	1,643	1,649
	Ag Proteína 0,1µg/ml	2,697	1,346	1,398	1,997	2,480	1,064	1,663	2,326	1,064	1,320	1,231	1,240
	Blanco	2,336	1,212	1,157	1,597	1,875	1,012	1,264	1,897	0,878	1,064	1,078	1,034

CLON PURIFICADO HRP	ANTÍGENO	CLON PURIFICADO EN PLACA											
		CL 2 1µg/ml	CL 3 1µg/ml	CL 4 1µg/ml	CL 5 1µg/ml	CL 13 1µg/ml	CL 15 1µg/ml	CL 17 1µg/ml	CL 21 1µg/ml	CL 35 1µg/ml	CL 36 1µg/ml	CL 56 1µg/ml	CL 60 1µg/ml
CL 21 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	2,359	2,657	5,065	2,649	1,497	3,497	2,105	56,397	2,033	1,097	1,119	2,022
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	2,663	2,321	6,654	3,319	1,599	3,116	2,002	19,269	2,587	1,002	1,254	2,014
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	2,174	2,028	3,264	3,114	1,187	3,210	2,417	7,224	2,018	1,417	1,417	1,297
	Ag Proteína 0,1µg/ml	1,214	2,297	1,267	3,142	1,064	1,978	2,359	1,445	2,050	1,365	1,231	1,329
	Blanco	1,233	1,987	0,987	2,234	0,913	1,106	1,627	0,236	1,827	0,745	1,117	1,114
CL 35 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	2,187	3,221	2,336	3,166	2,497	1,979	2,697	1,540	1,233	1,597	2,197	3,118
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	3,497	2,655	2,087	3,108	2,133	2,066	2,526	1,636	1,087	1,297	2,331	3,187
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	2,667	2,471	2,411	3,417	2,057	2,597	2,331	1,587	1,297	1,333	2,178	2,297
	Ag Proteína 0,1µg/ml	2,412	2,263	2,326	3,233	2,229	2,123	2,417	1,597	1,003	1,078	1,987	2,223
	Blanco	2,241	2,105	1,989	3,281	2,110	1,841	2,223	1,328	0,977	1,028	1,820	2,208
CL 36 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	0,979	2,258	1,957	2,098	3,297	2,329	2,411	1,099	2,097	2,331	1,069	2,321
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	0,878	2,128	1,889	2,228	3,112	2,177	2,065	1,118	2,115	2,057	1,118	2,308
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	0,728	2,554	1,847	2,271	2,924	2,086	2,221	1,063	2,329	2,014	1,114	1,987
	Ag Proteína 0,1µg/ml	0,758	2,144	1,236	2,199	2,827	1,927	2,263	1,117	2,222	2,033	1,397	1,336
	Blanco	0,723	2,038	1,157	2,108	2,678	1,869	2,011	0,986	1,897	1,979	1,108	1,287
CL 56 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	1,067	1,039	1,689	1,978	2,333	4,499	1,597	2,197	0,979	2,223	5,019	2,273
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	1,259	1,599	1,254	1,557	2,180	4,198	1,009	2,225	0,972	2,127	5,005	2,116
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	1,441	1,679	1,238	1,478	1,978	3,117	1,972	1,297	0,874	2,331	5,701	2,411
	Ag Proteína 0,1µg/ml	1,957	1,224	1,267	1,494	1,933	3,149	1,258	1,448	0,743	2,228	6,149	2,372
	Blanco	1,028	1,177	1,290	1,047	2,024	2,978	0,971	1,267	0,697	1,978	4,997	1,997
CL 60 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	1,158	1,529	2,947	1,067	2,197	3,497	1,297	2,167	1,798	2,067	1,597	2,066
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	1,199	1,297	2,331	1,597	2,118	2,287	1,224	2,223	1,279	2,003	1,287	2,142
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	1,282	1,417	2,478	1,334	1,854	2,689	1,123	2,187	1,597	2,187	1,231	1,874
	Ag Proteína 0,1µg/ml	1,357	1,299	2,297	1,112	1,541	2,187	1,087	2,133	1,544	1,829	1,187	1,628
	Blanco	0,957	1,114	2,147	1,056	1,523	1,928	1,001	1,947	1,126	1,125	1,108	1,255

Tabla 36. Valores ratio señal/fondo de ensayo captura tipo sandwich donde todos los clones purificados actúan como elemento de captura y como elemento detector del sistema.

CLON PURIFICADO HRP	ANTÍGENO	CLON PURIFICADO EN PLACA											
		CL 2 1µg/ml	CL 3 1µg/ml	CL 4 1µg/ml	CL 5 1µg/ml	CL 13 1µg/ml	CL 15 1µg/ml	CL 17 1µg/ml	CL 21 1µg/ml	CL 35 1µg/ml	CL 36 1µg/ml	CL 56 1µg/ml	CL 60 1µg/ml
CL 2 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	1,322	0,977	7,031	1,817	1,569	1,315	1,370	6,347	1,141	0,817	0,939	1,120
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	1,341	1,006	4,193	2,355	1,588	1,050	1,280	5,897	1,159	0,704	1,273	1,058
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	1,013	1,203	2,034	1,444	1,324	0,918	2,026	2,898	1,181	0,773	1,221	1,032
	Ag Proteína 0,1µg/ml	1,333	1,085	1,547	1,051	1,023	1,047	1,151	1,083	1,139	1,184	1,048	1,030
	Blanco	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
CL 3 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	1,476	2,871	1,022	1,329	4,746	1,124	1,495	1,739	1,390	1,511	2,174	1,413
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	1,305	2,585	1,051	1,274	3,679	1,143	1,907	2,136	1,336	1,691	2,603	1,472
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	1,179	1,851	1,118	1,211	2,265	1,050	1,214	1,158	1,467	1,457	1,724	1,546
	Ag Proteína 0,1µg/ml	1,157	1,009	1,364	1,048	1,114	1,031	1,429	1,151	1,125	1,360	1,539	1,433
	Blanco	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
CL 4 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	1,771	1,671	4,300	1,280	1,652	1,071	2,162	3,388	1,368	1,207	1,499	1,300
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	1,419	1,281	3,446	1,229	1,572	1,186	2,066	2,793	1,494	1,145	1,353	1,247
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	1,948	2,031	1,848	1,203	1,102	1,106	2,001	2,120	2,281	1,249	1,609	1,538
	Ag Proteína 0,1µg/ml	2,286	1,083	1,304	1,085	1,248	1,235	1,511	2,050	1,073	1,177	1,325	1,022
	Blanco	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
CL 5 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	1,166	1,040	1,274	1,104	1,130	1,655	1,088	1,027	1,390	1,403	1,996	1,580
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	1,103	1,175	1,160	0,847	1,155	1,597	1,026	1,013	1,115	1,108	2,182	1,252
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	1,104	1,450	1,283	0,896	1,147	1,077	1,214	1,451	1,192	1,037	1,966	1,043
	Ag Proteína 0,1µg/ml	0,996	1,346	1,061	0,871	1,092	1,287	1,031	1,195	1,284	1,120	1,283	1,349
	Blanco	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
CL 13 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	1,769	1,081	1,110	1,977	1,956	1,110	1,611	1,705	1,467	1,751	1,443	1,358
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	1,201	1,133	1,485	1,469	2,412	1,312	1,553	1,418	1,315	1,705	1,233	1,191
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	1,201	1,276	1,125	1,193	1,847	1,178	1,977	1,256	1,371	1,640	1,249	1,176
	Ag Proteína 0,1µg/ml	1,205	1,314	1,584	1,460	1,428	1,221	1,444	1,153	1,166	1,146	1,027	1,114
	Blanco	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
CL 15 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	1,090	1,286	1,468	1,523	1,656	0,933	1,633	1,701	1,594	1,785	1,704	1,114
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	1,147	1,138	1,679	1,389	1,637	1,009	1,585	1,566	2,320	1,607	1,591	1,191
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	1,261	1,168	1,458	1,131	1,674	1,073	1,501	1,263	2,162	1,085	1,987	1,043
	Ag Proteína 0,1µg/ml	1,227	1,046	1,042	1,220	1,204	0,993	1,316	1,051	1,231	1,608	1,259	1,082
	Blanco	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
CL 17 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	1,497	1,606	1,875	1,997	1,172	1,956	1,294	1,721	2,465	1,081	1,609	2,881
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	1,368	1,070	1,451	1,997	1,167	1,246	1,230	1,135	3,139	1,096	1,574	1,615

CLON PURIFICADO HRP	ANTÍGENO	CLON PURIFICADO EN PLACA											
		CL 2 1µg/ml	CL 3 1µg/ml	CL 4 1µg/ml	CL 5 1µg/ml	CL 13 1µg/ml	CL 15 1µg/ml	CL 17 1µg/ml	CL 21 1µg/ml	CL 35 1µg/ml	CL 36 1µg/ml	CL 56 1µg/ml	CL 60 1µg/ml
CL 17 1µg/ml	Ag 13kDa 0,1µg/ml	1,134	1,367	1,417	1,659	1,138	1,221	1,486	1,291	1,457	1,075	1,524	1,595
	Ag Proteína 0,1µg/ml	1,155	1,111	1,208	1,250	1,323	1,051	1,450	1,226	1,212	1,241	1,142	1,199
	Blanco	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
CL 21 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	1,913	1,337	5,132	1,186	1,640	3,162	1,213	238,970	1,113	1,472	1,002	1,815
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	2,160	1,168	6,742	1,486	1,751	2,817	1,136	81,648	1,416	1,345	1,123	1,808
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	1,763	1,021	3,307	1,394	1,300	2,902	1,049	30,610	1,105	1,902	1,269	1,164
	Ag Proteína 0,1µg/ml	0,985	1,156	1,284	1,406	1,165	1,788	1,087	6,123	1,122	1,832	1,102	1,193
	Blanco	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
CL 35 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	0,976	1,530	1,174	0,965	1,183	1,075	1,199	1,160	1,262	1,554	1,207	1,412
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	1,560	1,261	1,049	0,947	1,011	1,122	1,027	1,232	1,113	1,262	1,281	1,443
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	1,190	1,174	1,212	1,041	0,975	1,411	1,104	1,195	1,328	1,297	1,197	1,040
	Ag Proteína 0,1µg/ml	1,076	1,075	1,169	0,985	1,056	1,153	1,125	1,203	1,027	1,049	1,092	1,007
	Blanco	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
CL 36 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	1,354	1,108	1,691	0,995	1,231	1,246	1,645	1,115	1,105	1,178	0,965	1,803
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	1,214	1,044	1,633	1,057	1,162	1,165	1,039	1,134	1,115	1,039	1,009	1,793
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	1,007	1,253	1,596	1,077	1,092	1,116	2,031	1,078	1,228	1,018	1,005	1,544
	Ag Proteína 0,1µg/ml	1,048	1,052	1,068	1,043	1,056	1,031	1,296	1,133	1,171	1,027	1,261	1,038
	Blanco	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
CL 56 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	1,038	0,883	1,309	1,889	1,153	1,511	1,645	1,734	1,405	1,124	1,004	1,138
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	1,225	1,359	0,972	1,487	1,077	1,410	1,039	1,756	1,395	1,075	1,002	1,060
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	1,402	1,427	0,960	1,412	0,977	1,047	2,031	1,024	1,254	1,178	1,141	1,207
	Ag Proteína 0,1µg/ml	1,904	1,040	0,982	1,427	0,955	1,057	1,296	1,143	1,066	1,126	1,231	1,188
	Blanco	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
CL 60 1µg/ml	Ag GP 0,1µg/ml	1,210	1,373	1,373	1,010	1,443	1,814	1,296	1,113	1,597	1,837	1,441	1,646
	Ag >440kDa 0,1µg/ml	1,253	1,164	1,086	1,512	1,391	1,186	1,223	1,142	1,136	1,780	1,162	1,707
	Ag 13kDa 0,1µg/ml	1,340	1,272	1,154	1,263	1,217	1,395	1,122	1,123	1,418	1,944	1,111	1,493
	Ag Proteína 0,1µg/ml	1,418	1,166	1,070	1,053	1,012	1,134	1,086	1,096	1,371	1,626	1,071	1,297
	Blanco	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Los valores ratio señal/fondo obtenidos reflejan que existe una combinación donde la discriminación entre las diferentes fracciones antigénicas y el blanco fue mayor (Tabla 36). El denominado CL21 empleado en placa y como conjugado aportó buenos índices de discriminación para los tres tipos de antígeno de galactomanano (ratio señal/fondo 238,97 Ag GP, 81,648 Ag >440 kDa y 30,61 Ag 13 kDa) e incluso cierta distinción con la fracción proteica (ratio señal/fondo 6,123) (línea verde Figura 53).

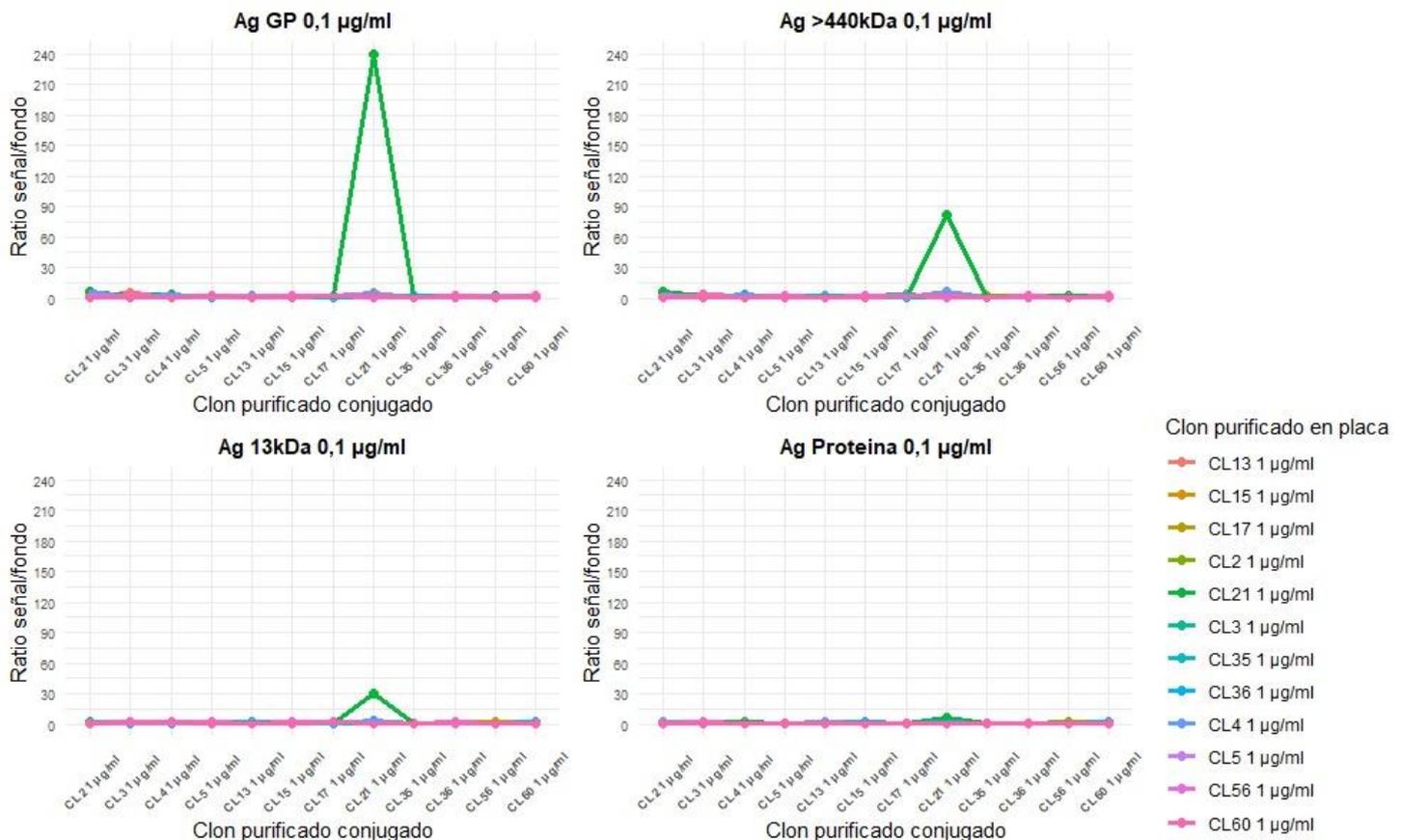


Figura 53. Representación valores de ratio señal/fondo de cada pareja de anticuerpos en el ensayo de captura tipo sandwich.

Los resultados obtenidos en los ensayos llevados a cabo anteriormente nos muestran a CL21 como un candidato óptimo por su similitud en cuanto a comportamiento y naturaleza respecto al mAB de Bio-Rad. A modo de resumen, el mAB denominado CL21 presentó reactividad frente al amplio abanico de antígenos de diferentes pesos moleculares, frente a antígeno exclusivo de galactomanano o mezcla de proteína-azúcar. La caracterización en cuanto al isotipo refleja que se trata de una inmunoglobulina IgM, al igual que el monoclonal EB-A2. En cuanto a los ensayos de inhibición, se presentó un porcentaje de inhibición con el antígeno de glicoproteína del 99% e inhibición del 27% y 71% hacia antígeno de bajo peso molecular y alto peso molecular, respectivamente, cuando se tomó el mAB conjugado de Bio-Rad como anticuerpo secundario del sistema indirecto. En el ensayo de avidéz, se obtuvo un índice de alta avidéz, lo que se traduce en una elevada fuerza de unión antígeno-anticuerpo, al igual que ofrece el anticuerpo EB-A2. Por último,

en el ensayo de captura tipo sandwich, este mAB fue el que ofreció el mayor grado de discriminación para todas las fracciones antigénicas evaluadas.

Las propiedades aportadas por dicho mAB hacen considerarlo como candidato único para los sucesivos ensayos que tuvieron como objetivo la optimización del sistema.

4.2.1. DISEÑO Y DEFINICIÓN DEL SOPORTE SÓLIDO DEL SISTEMA.

Una vez elegido el mAB, tuvo lugar la definición de las características que forman parte del elemento sólido del sistema, es decir, la microplaca. Teniendo de base el tipo de placa suministrada por Bio-Rad y la que se emplea habitualmente para los ensayos indirectos de detección de anticuerpos, se analizaron diferentes tipos de plástico para la técnica de CLIA. Se ensayaron dos tipos de placa de la casa comercial Thermo Scientific™ y dos de la casa comercial Greiner Bio-One con las características que se detallan en el apartado correspondiente de Material y Métodos.

Como muestra se usó el antígeno de bajo peso molecular, <13 kDa, y el mAB se dispuso inmovilizado en placa a la concentración de 1 µg/ml diluido en tampón PBS pH 7,2. En este caso se usó como solución de bloqueo tampón PBS con BSA al 4% (p/v). El antígeno de bajo peso molecular se presentó a distintas concentraciones y el mAB conjugado con peroxidasa a una concentración de 1 µg/ml, según la concentración inicial de mAB, ambos diluidos en PBS-BSA al 1% (p/v).

A continuación, en la Tabla 37, se muestran los resultados RLU de cada concentración de antígeno sobre cada tipo de placa, así como la ratio señal/fondo (Ratio S/F) para determinar el nivel de discriminación de cada condición:

Tabla 37. Análisis de diferente tipo de placa en ensayo captura tipo sandwich.
(Concentraciones primera columna corresponden al antígeno (Ag))

Ag / Placa	Thermo MaxiSorp		Thermo PolySorp		Greiner High Binding		Greiner Medium Binding	
	RLU	Ratio S/F	RLU	Ratio S/F	RLU	Ratio S/F	RLU	Ratio S/F
0,25ug/ml	3,886	5,412	0,73	2,246	4,12	4,666	0,688	3,909
0,03ug/ml	1,162	1,618	0,187	0,575	1,758	1,991	0,363	2,063
0,007ug/ml	0,924	1,287	0,248	0,763	1,102	1,248	0,125	0,71
Blanco	0,718	1	0,325	1	0,883	1	0,176	1

Se considera cierto grado de discriminación en aquellas ratios donde el resultado del cálculo es superior a 1 ya que en ese valor se encuentra la ratio del pocillo que actúa como blanco del sistema. La representación de los valores de ratio señal/fondo (Figura 54) muestra que para Greiner High Binding y Thermo Maxisorp se obtuvieron mayores tasas de discriminación para la concentración máxima y mínima ensayada.

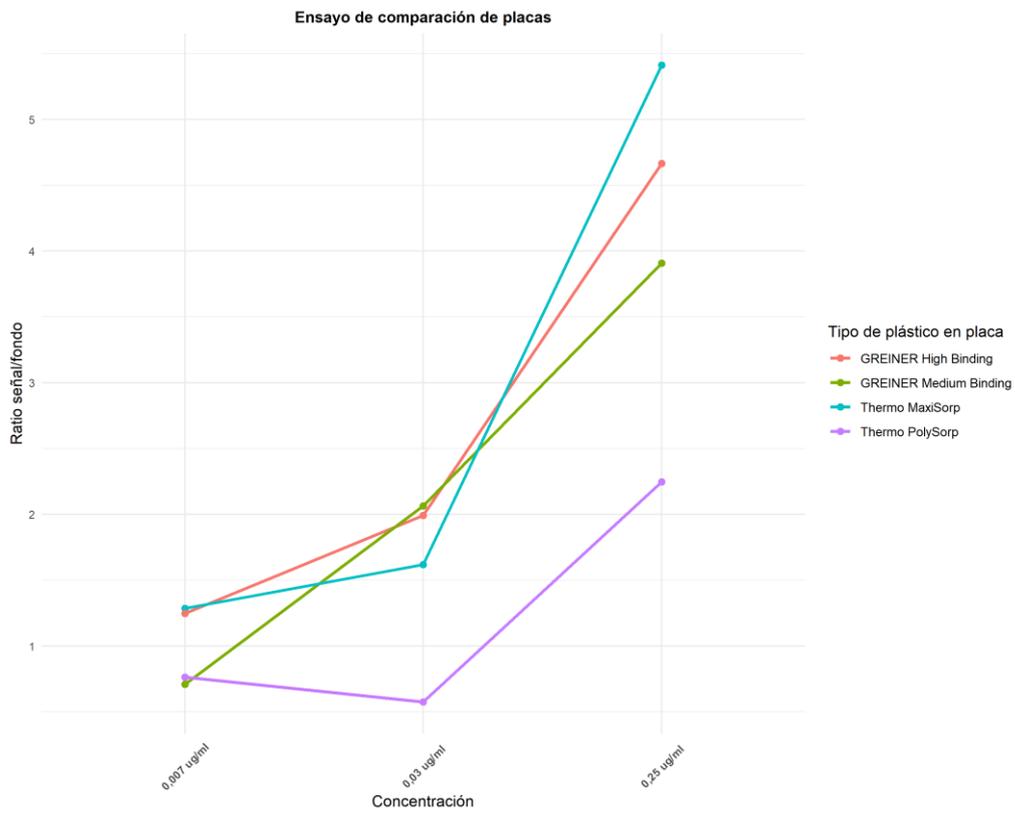


Figura 54. Representación valores ratio señal/fondo obtenidos en el ensayo de captura tipo sandwich con cada tipo de plástico.

En la placa Thermo MaxiSorp y Greiner High Binding se obtuvo discriminación en las tres concentraciones ensayadas de antígeno de bajo peso molecular con un grado de discriminación muy similar en el límite inferior estudiado, 0,007 µg/ml. Es por esta razón que se decidió ensayar ambas condiciones más en profundidad y se descartaron las otras dos opciones. La ratio señal/fondo fue similar para ambas como se refleja en el valor de R^2 (0,9877) y en la pendiente de la recta (0,896) (Figura 55).

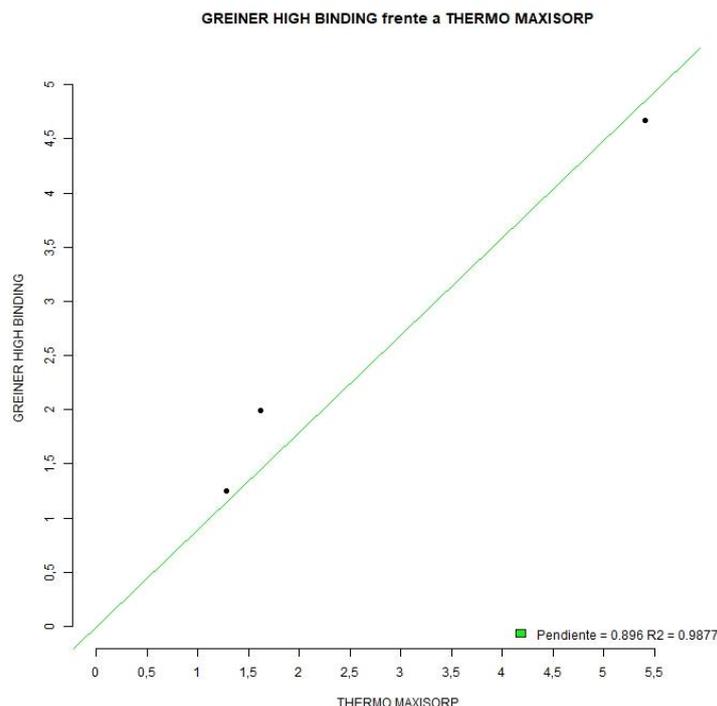


Figura 55. Correlación de ratios señal/fondo de la placa Thermo Maxisorp y Greiner High Binding.

En el siguiente ensayo, el mAB purificado se dispuso, diluido en PBS pH 7,2, a distintas concentraciones inmovilizado en placa Thermo MaxiSorp y Greiner High Binding. Se probó una concentración de antígeno de bajo peso molecular, <13kDa, y un pocillo destinado para analizar el fondo de reacción. El mAB conjugado con peroxidasa se dispuso a 1 µg/ml según la concentración inicial de mAB tal y como se había llevado a cabo en el ensayo anterior.

La condición con la que se obtuvo mayor discriminación entre la señal obtenida por el antígeno a la concentración evaluada y el fondo de reacción fue la aportada por la placa Greiner High Binding. A través del cálculo anterior se muestra cómo, dentro de cada tipo de placa, la concentración de mAB purificado inmovilizado en placa es óptima a una concentración determinada y esta no guarda una relación proporcional con la cantidad (Tabla 38).

Tabla 38. Análisis de diferentes concentraciones de anticuerpo dispuesto sobre distinto tipo de placa. Valores expresados en RLU y ratio señal/fondo (Ag = antígeno; [] mAB = concentración mAB)

Thermo Maxisorp								
Ag / [] mAB	Clon 21 1µg/ml		Clon 21 2µg/ml		Clon 21 5µg/ml		Clon 21 10µg/ml	
	RLU	Ratio S/F	RLU	Ratio S/F	RLU	Ratio S/F	RLU	Ratio S/F
Ag <13kDa 0,25 µg/ml	2,746	2,730	4,339	3,783	4,311	4,251	4,328	3,358
Blanco	1,006	1,000	1,147	1,000	1,014	1,000	1,289	1,000
Greiner High Binding								
Ag / [] mAB	Clon 21 1µg/ml		Clon 21 2µg/ml		Clon 21 5µg/ml		Clon 21 10µg/ml	
	RLU	Ratio S/F	RLU	Ratio S/F	RLU	Ratio S/F	RLU	Ratio S/F
Ag <13kDa 0,25 µg/ml	3,153	3,956	4,342	7,273	3,843	6,912	3,932	6,012
Blanco	0,797	1,000	0,597	1,000	0,556	1,000	0,654	1,000

En la siguiente gráfica, donde se muestran ratios señal/fondo para cada concentración de mAB inmovilizado en placa, se observa una especie de comportamiento en campana para ambos tipos de placa. Se obtuvo un mayor grado de discriminación con la placa Greiner High Binding para todas las concentraciones de mAB. Se alcanzó el punto óptimo para Greiner High Binding a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con una ratio de 7,27 y el óptimo para Thermo MaxiSorp a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con una ratio de 4,25 (Figura 56).

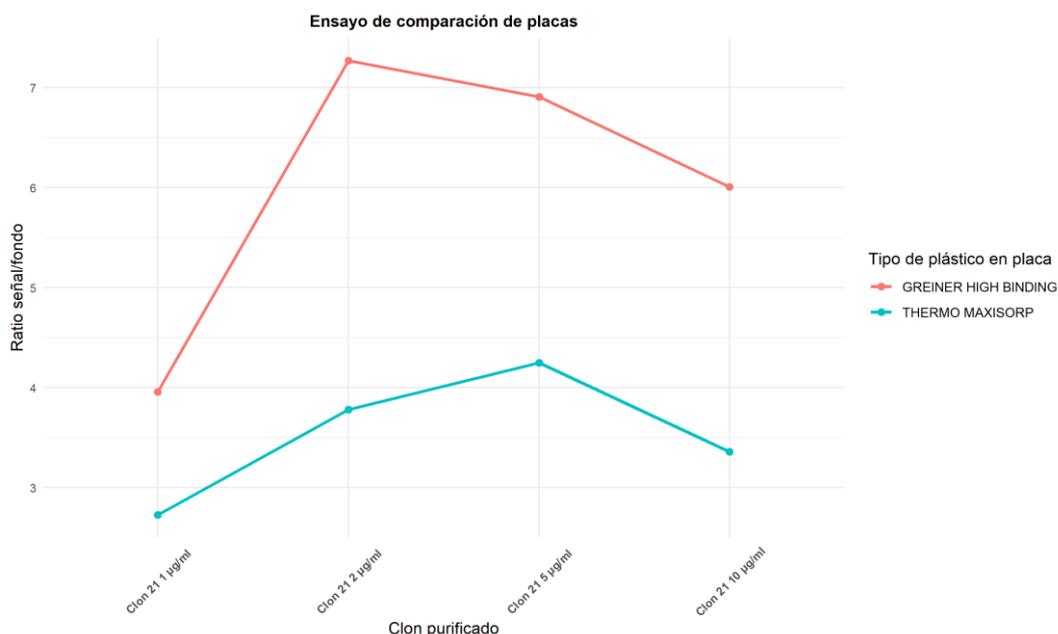


Figura 56. Representación valores de ratio señal/fondo para analizar el comportamiento del mAB de captura dispuesto a distintas concentraciones sobre placa con distinto tipo de plástico.

En el caso de Thermo Maxisorp, además de presentar una peor discriminación, hubo que aplicar una mayor concentración de mAB en la placa para adquirir el punto óptimo con lo que el gasto supondría más del doble con respecto al tipo Greiner. Se eligió por tanto el tipo de placa Greiner High Binding como óptima para su uso como soporte sólido del sistema de captura tipo sandwich.

Una vez seleccionado el tipo de placa, se ensayaron diferentes concentraciones de mAB sensibilizando la misma con muestras reales de suero. Estas fueron caracterizadas previamente como negativas y positivas. A través de los resultados expresados en RLU, se calculó el promedio de la señal de los positivos y el promedio de la señal de los negativos (fondo), se estableció el valor ratio señal/fondo y, por tanto, el grado de discriminación para cada una de las condiciones.

La mayor ratio señal/fondo estuvo en 59,59 para la concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los resultados muestran que no existió una relación positiva en cuanto a mayor cantidad de anticuerpo con mejor rendimiento. Con menor cantidad de anticuerpo se obtuvo un promedio de señal superior a las otras dos concentraciones tanto para muestras positivas como para negativas. La ratio señal/fondo indica, en este caso, que la superioridad de señal en los positivos no está en equilibrio con la superioridad en señal de los negativos, lo que hace que esta sea más baja traduciéndose en una peor

discriminación. La condición opuesta, es decir, la de 3 µg/ml, aportó señales más bajas en los positivos y, el promedio de las mismas no guarda proporcionalidad con la obtenida para las muestras negativas, lo que hace que se obtenga una ratio señal/fondo inferior que el que aportó la condición de 2µg/ml. El análisis estadístico empleado, Wilcoxon, donde se compara la condición “CL21 2 µg/ml” debido a su elevado ratio señal/fondo, respecto al resto, muestra que existieron diferencias significativas entre las distintas concentraciones de anticuerpo monoclonal (Tabla 39).

Tabla 39. Evaluación diferentes concentraciones de mAB en placa con muestras reales.
 ([] mAB: concentración mAB; muestras señadas en verde se consideran negativas y muestras señadas en rojo se consideran positivas)

Muestra / [] mAB	CL21 1µg/ml	Ratio Señal/CO	CL21 2µg/ml	Ratio Señal/CO	CL21 3µg/ml	Ratio Señal/CO
8325133	0,11	0,11	0,10	0,22	0,10	0,22
8395806	0,11	0,11	0,10	0,24	0,15	0,36
8395776	0,17	0,18	0,14	0,33	0,08	0,19
8325798	0,77	0,80	0,44	1,01	0,59	1,36
8325803	0,26	0,27	0,20	0,46	0,21	0,49
8325858	0,11	0,11	0,12	0,27	0,17	0,40
8328450	0,14	0,15	0,09	0,20	0,09	0,22
8325159	1,36	1,42	0,56	1,30	0,41	0,94
8325139	0,17	0,17	0,10	0,23	0,10	0,24
8325836	0,09	0,09	0,10	0,24	0,11	0,25
8395783	0,13	0,13	0,13	0,30	0,13	0,30
8395461	0,13	0,13	0,16	0,36	0,18	0,41
A-83-036	0,82	0,86	0,36	0,83	0,30	0,69
A-83-037	0,18	0,19	0,12	0,27	0,22	0,51
A-83-038	0,14	0,14	0,10	0,23	0,13	0,30
A-83-039	0,13	0,13	0,09	0,21	0,10	0,23
A-83-040	0,14	0,15	0,10	0,23	0,08	0,18
A-83-041	0,52	0,55	0,17	0,39	0,12	0,28
A-83-042	0,14	0,14	0,11	0,24	0,19	0,43
A-83-043	0,22	0,23	0,16	0,38	0,14	0,31
A-83-044	0,25	0,26	0,14	0,32	0,14	0,32
A-83-045	0,12	0,13	0,14	0,33	0,12	0,28
A-83-047	0,22	0,23	0,11	0,26	0,27	0,61
A-83-048	0,14	0,14	0,12	0,29	0,20	0,47
A-83-049	0,15	0,15	0,11	0,26	0,12	0,28
A-83-050	0,11	0,12	0,09	0,21	0,21	0,50
A-83-051	0,40	0,42	0,19	0,43	0,26	0,60
A-83-052	0,20	0,21	0,13	0,31	0,14	0,31
A-83-053	0,28	0,29	0,17	0,38	0,11	0,25
A-83-054	0,16	0,17	0,16	0,37	0,21	0,49
A-109-076	0,29	0,30	0,20	0,46	0,11	0,25
A-109-093	0,32	0,34	0,16	0,37	0,15	0,36
A-109-095	0,23	0,24	0,14	0,33	0,18	0,41
A-110-001	0,18	0,19	0,13	0,30	0,11	0,25
A-110-005	0,24	0,25	0,16	0,36	0,15	0,34
A-83-035	0,16	0,17	0,14	0,33	0,20	0,47
A-120-023	0,35	0,36	0,23	0,53	0,16	0,37
A-122-021	0,22	0,23	0,14	0,33	0,13	0,31
A-122-027	0,26	0,27	0,21	0,50	0,21	0,48
A-120-027	0,15	0,15	0,14	0,32	0,15	0,36
8325132	6,07	6,34	3,42	7,95	2,22	5,13
8325169	21,68	22,65	22,29	51,83	16,26	37,65
8325832	5,44	5,68	3,29	7,64	2,93	6,78
8328427	15,27	15,96	14,22	33,06	12,03	27,85

Muestra / [] mAB	CL21 1µg/ml	Ratio Señal/CO	CL21 2µg/ml	Ratio Señal/CO	CL21 3µg/ml	Ratio Señal/CO
8325137	20,37	21,29	20,27	47,14	18,26	42,28
8328441	3,13	3,27	1,62	3,76	0,73	1,68
8325148	6,83	7,14	3,84	8,92	2,12	4,91
8395782	9,30	9,71	7,50	17,43	5,23	12,09
8395808	1,69	1,76	0,98	2,29	0,65	1,51
8328398	14,85	15,51	15,43	35,89	10,30	23,84
8328436	3,88	4,06	2,23	5,19	1,83	4,23
8325854	9,91	10,35	7,62	17,73	6,24	14,44
A-121-012	14,54	15,19	10,09	23,46	8,07	18,67
A-121-030	35,08	36,66	35,63	82,85	25,99	60,16
A-120-088	9,14	9,55	9,58	22,27	8,13	18,83
A-120-092	17,97	18,78	13,27	30,86	10,26	23,75
A-120-078	11,77	12,30	7,26	16,89	6,29	14,56
A-120-074	7,76	8,11	5,25	12,22	4,10	9,50
A-120-066	9,49	9,92	6,23	14,48	5,26	12,18
A-90-026	0,25	0,26	0,15	0,35	0,20	0,47
A-90-027	20,49	21,41	21,77	50,63	17,60	40,74
A-90-028	7,64	7,98	5,09	11,84	4,23	9,78
A-90-029	13,23	13,82	10,18	23,68	8,75	20,25
A-90-030	5,08	5,31	2,67	6,20	1,90	4,39
Señal	11,29	11,79	9,58	22,27	7,48	17,32
Fondo	0,26	0,27	0,16	0,37	0,17	0,40
Señal/fondo	44,14	44,14	59,59	59,59	43,20	43,20
CO Teórico	0,97	-	0,44	-	0,46	-
Wilcoxon p-valor	-	2,292e-11	-	-	-	0,00029

La representación de los valores de ratio Señal/CO refleja que la concentración de 2 µg/ml es la que guardaba mayor equilibrio entre las muestras negativas y las positivas y se obtuvieron los mayores ratios en positivos y las menores para los negativos (Figura 57). En cuanto al diagrama de caja y bigotes (Figura 58), se observa que existe una distribución sesgada positivamente y no existe simetría ya que el valor de Q2 está muy próximo o sobre el propio valor de Q1 y también, que existe mayor dispersión en muestras positivas que en muestras negativas, superior para la condición “CL21 2 µg/ml”. Por otro lado, se observan ciertos valores atípicos, correspondientes a muestras positivas, 4, 7 y 8, respectivamente, según orden creciente de concentración de mAB testada. Se seleccionó, por tanto, la concentración de 2 µg/ml de mAB como óptima para la sensibilización de placas.

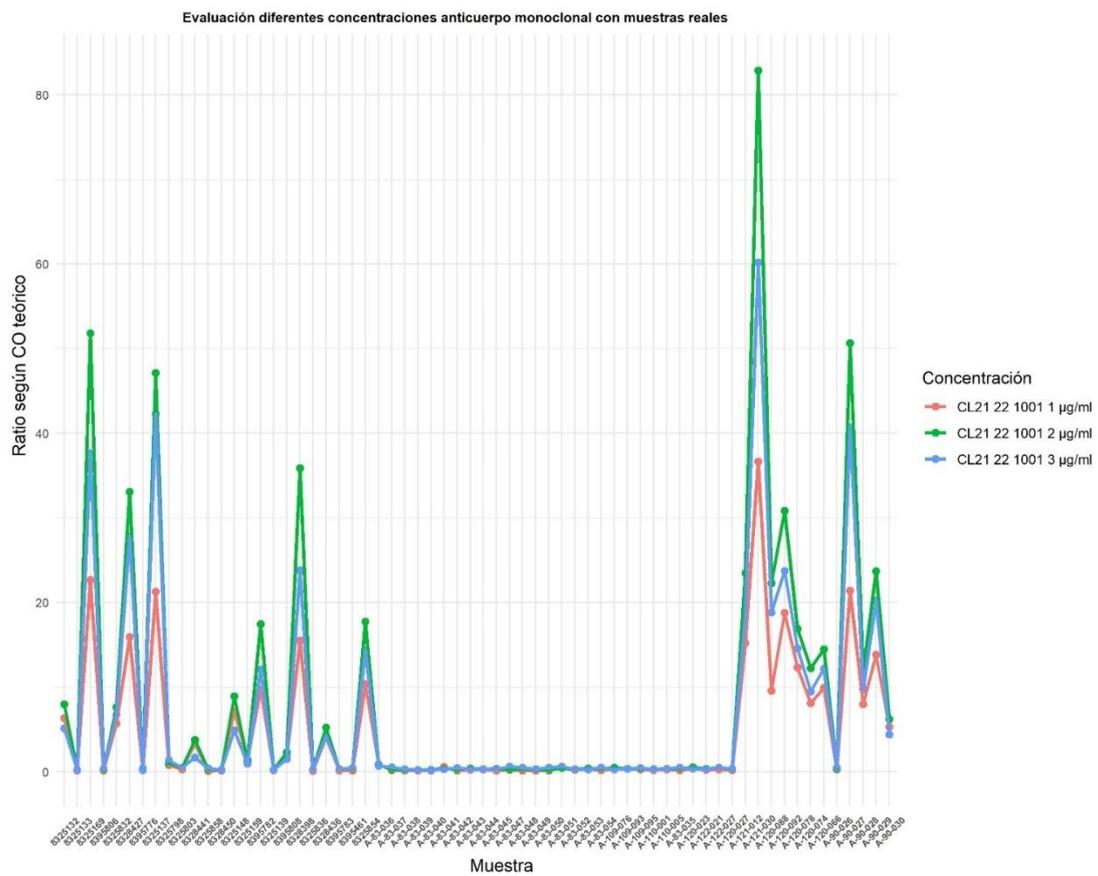


Figura 57. Valores ratio Señal/CO de las tres concentraciones evaluadas para mAB dispuesto en placa.

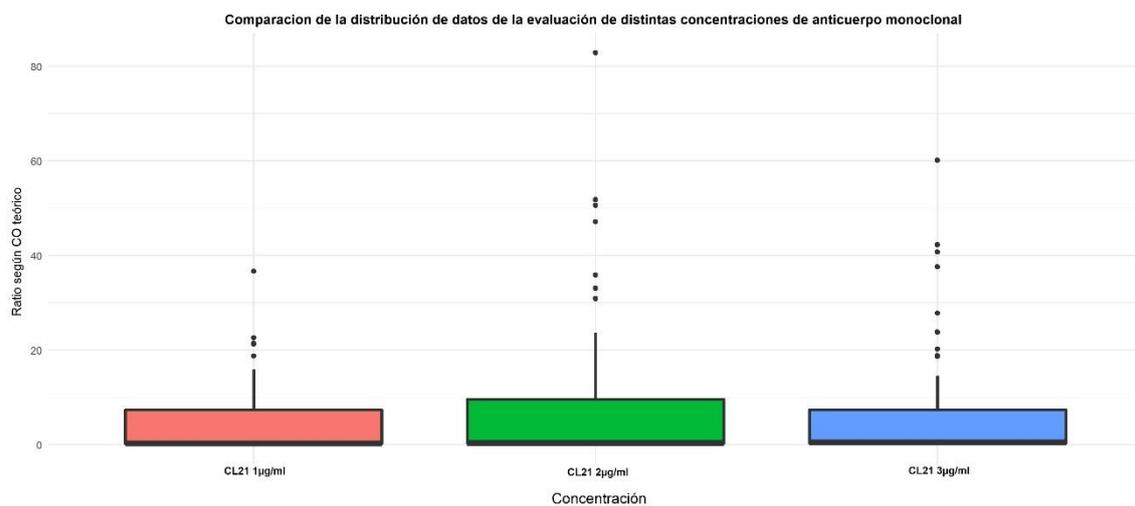


Figura 58. Diagrama de caja y bigotes. Comparación de la distribución de valores ratio Señal/CO de las tres concentraciones evaluadas para mAB dispuesto en placa.

Definido el tipo de plástico de la microplaca y la concentración óptima de mAB, se pusieron en marcha una serie de ensayos que tenían como objetivo optimizar el rendimiento de la técnica para conseguir una buena discriminación entre negativos y positivos. Para ello, uno de los aspectos a tener en cuenta fue la solución empleada para bloquear las regiones donde no se había adsorbido el mAB. Esto se lleva a cabo con el propósito de eliminar reacciones inespecíficas que puedan ser aportadas por la muestra que se vaya a evaluar y/o por el anticuerpo detector del sistema. Añadido a esto, se trató también de conservar la microplaca sensibilizada para su mantenimiento a lo largo del tiempo, característica requerida para su comercialización. Tuvo lugar, por tanto, la evaluación de diferentes soluciones conservantes/bloqueantes (C/B) de placa (detalladas en apartado Material y Métodos, Tabla 7, apartado 5). Los resultados RLU y ratio señal/fondo (Ratio S/F) obtenidos para cada condición fueron los presentados en la Tabla 40:

Tabla 40. Valores RLU y ratio señal/fondo de la evaluación de diferentes soluciones conservantes/bloqueantes de placa.

Antígeno / C/B	Condición 1	Condición 2	Condición 3	Condición 4	Condición 5
Ag <13kDa 0,5µg/ml	13,738	14,864	15,077	9,972	15,45
Blanco	1,199	1,472	1,924	0,893	1,067
Ratio S/F	11,46	10,1	7,84	11,17	14,48

El conservante/bloqueante con el que se obtuvo mayor discriminación entre la señal y el fondo de la reacción con el antígeno de bajo peso molecular es el que presentó la denominada “Condición 5”, seguido de la condición 1, condición 4, condición 2 y, por último, la condición 3. A continuación, se evaluaron las 5 condiciones en un ensayo de captura con muestras reales de suero caracterizadas como negativas (señaladas en verde, Tabla 41) y positivas (señaladas en rojo, Tabla 41). Los valores ratio Señal/CO mostraron una mayor discriminación con el “Bloqueante 5”, muy superior al resto. El análisis estadístico que compara esta condición respecto al resto muestra que existen diferencias significativas entre las mismas (Tabla 41).

Tabla 41. Evaluación diferentes conservantes/bloqueantes en ensayo captura con muestras reales.

Muestra / C/B	Bloqueante 1		Bloqueante 2		Bloqueante 3		Bloqueante 4		Bloqueante 5	
	RLU	Señal/CO								
A-83-046	1,22	0,601	1,926	0,94	0,908	0,534	0,426	0,765	0,155	0,646
A-83-047	1,475	0,727	1,766	0,861	1,088	0,64	0,354	0,636	0,165	0,688
A-83-048	1,561	0,769	1,71	0,834	1,427	0,839	0,354	0,636	0,149	0,621
A-83-049	1,548	0,763	1,773	0,865	1,2	0,706	0,36	0,646	0,14	0,583
A-83-050	1,462	0,72	1,659	0,809	1,162	0,684	0,27	0,485	0,125	0,521
A-83-051	1,817	0,895	1,611	0,786	1,349	0,794	0,385	0,691	0,19	0,792
A-83-053	1,44	0,709	1,626	0,793	1,225	0,721	0,463	0,831	0,199	0,829
A-120-088	9,594	4,726	6,59	3,215	8,457	4,975	9,124	16,381	7,273	30,304
A-120-074	6,922	3,41	5,665	2,763	6,802	4,001	7,166	12,865	5,337	22,238
A-120-066	8,073	3,977	6,983	3,406	7,016	4,127	8,195	14,713	5,883	24,513
A-90-027	19,601	9,656	13,718	6,692	17,969	10,57	18,187	32,652	17,359	72,329
A-90-028	6,821	3,36	4,592	2,24	6,019	3,541	6,399	11,488	5,269	21,954
A-90-029	11,078	5,457	7,862	3,835	9,304	5,473	10,704	19,217	9,186	38,275
A-90-030	4,512	2,223	3,469	1,692	3,865	2,274	4,262	7,652	3,012	12,55
Señal	9,514	4,687	6,983	3,406	8,49	4,994	9,148	16,424	7,617	31,738
Fondo	1,503	0,741	1,724	0,841	1,194	0,702	0,373	0,67	0,16	0,668
Señal/fondo	6,329	6,329	4,049	4,049	7,11	7,11	24,516	24,516	47,479	47,479
CO teórico	2,038	-	2,052	-	1,704	-	0,557	-	0,24	-
Wilcoxon p-valor	-	0,029	-	0,045	-	0,018	-	0,008	-	-

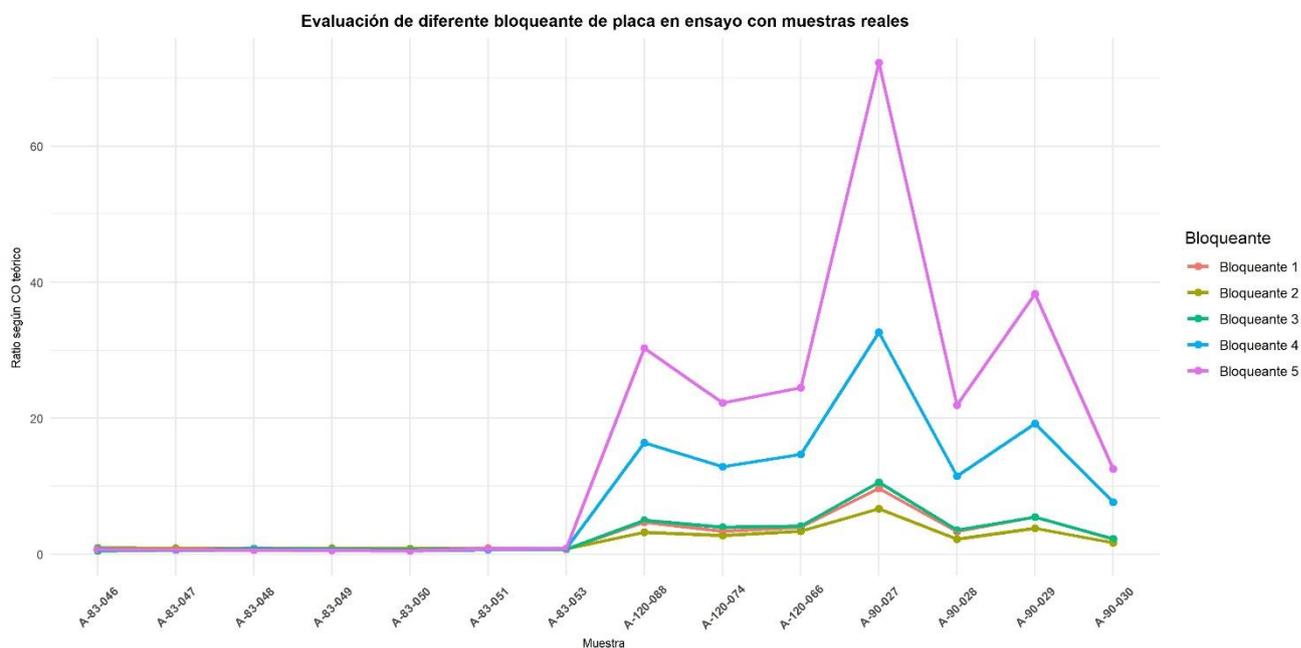


Figura 59. Valores ratio Señal/CO según el CO teórico para cada tipo de solución bloqueante.

Una vez normalizadas las señales RLU obtenidas por los negativos y por los positivos, la representación gráfica muestra el leve ruido de fondo aportado por las muestras negativas, cercanas a 0 y la elevada señal en las muestras positivas, superior para el conjunto de muestras positivas para la condición denominada “Bloqueante 5” (Figura 59). El diagrama de caja y bigotes (Figura 60) muestra que los datos están sesgados de forma positiva, con el valor de la mediana cercano o próximo al valor de Q1, y una distribución asimétrica de los resultados con mayor dispersión en el rango de 50-75% de los mismos, es decir, en muestras positivas. Fue esta mayor para la condición “Bloqueante 5”. Hay que destacar también la presencia de un valor atípico en las condiciones denominadas “Bloqueante 1”, “Bloqueante 2”, “Bloqueante 3” y “Bloqueante 5”.

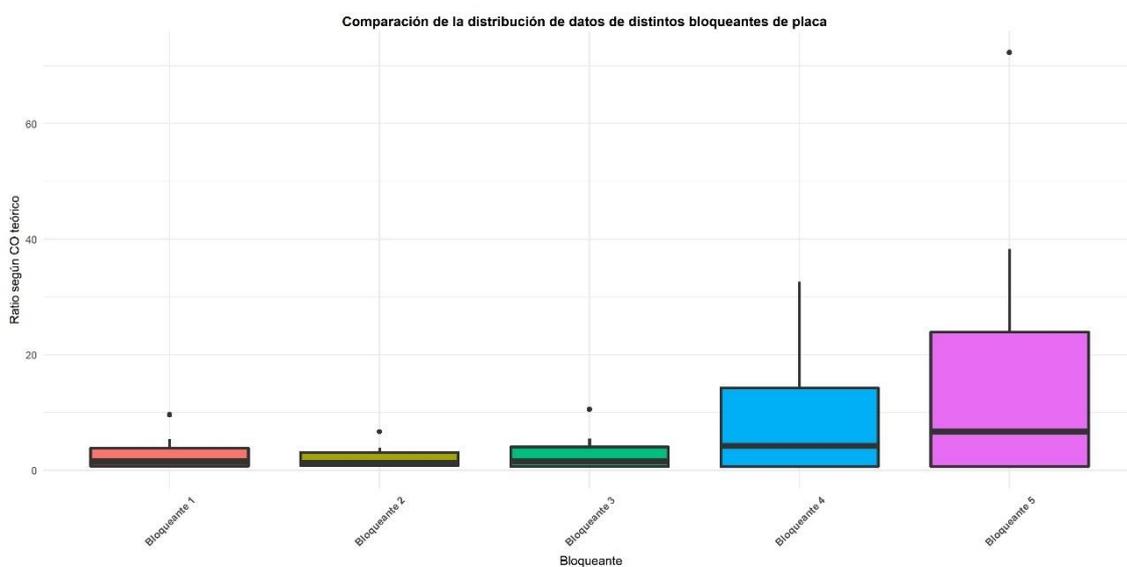


Figura 60. Diagrama de caja y bigotes. Comparación de la distribución de valores ratio Señal/CO de los cinco tipos de solución bloqueante.

Se seleccionó la solución conservante/bloqueante comercial de la casa Surmodics llamada StabilBlock, Ref. ST01 (Tabla 7). Garantizada la característica de bloqueante, se ensayó la capacidad conservante a lo largo del tiempo, para ello, mediante un ensayo de estabilidad forzada consistente en 12 días a 37°C (Tabla 42) se simuló si la placa sufriera degradación tras 15 meses desde su fabricación.

Se calculó el promedio de las tres réplicas ensayadas para cada condición y se calculó el porcentaje de caída de señal respecto a este. El % de caída de señal fue de 3,485%, tal y como puede comprobarse en la Figura 63 (línea violeta), donde se presentan los resultados de estabilidad forzada de placa, conjugado y controles. Se cumplió la especificación establecida de obtener una caída de señal $\leq 20\%$.

Tabla 42. Estabilidad forzada placa sensibilizada con mAB.

	RLU 4°C	RLU 37°C	% caída señal
Réplica 1	15,45	14,85	
Réplica 2	15,6	15,12	
Réplica 3	15,4	14,91	
Promedio	15,5	14,96	3,485

4.2.2. DISEÑO Y DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA EL ELEMENTO DETECTOR DEL SISTEMA.

Una vez conjugado con peroxidasa el mAB según el protocolo descrito en el apartado de Material y Métodos, tuvo lugar su evaluación mediante ensayo directo con el objetivo de analizar su reacción frente a placa sensibilizada con las dos fracciones de bajo peso molecular, es decir, <13 kDa y 75-29 kDa.

Tabla 43. Evaluación mAB conjugado en ensayo directo.

Título mAB-HRP / Antígeno	<13 kDa 0,5 µg/ml		75-29 kDa 0,5 µg/ml	
	RLU	Ratio S/F	RLU	Ratio S/F
1/500	35,615	226,847	44,226	231,55
1/1000	21,265	135,446	26,601	139,272
1/2000	12,628	80,433	13,273	69,492
Blanco	0,157	1	0,191	1

Los tres títulos empleados de mAB conjugado (mAB-HRP) aportaron señales RLU muy superiores al ruido de fondo (Tabla 43). Garantizada la reactividad, se estudiaron diferentes soluciones tamponadas con el objetivo de elegir la óptima en cuanto a una adecuada discriminación entre el fondo y la señal.

El título empleado de mAB peroxidado, basándonos en las señales obtenidas anteriormente, fue 1/5000. En primer lugar, se estudiaron los diferentes tampones (detallada su composición en el apartado Material y Métodos, Tabla 8, apartado 5), con dicho anticuerpo, sobre ensayo directo frente a distintas fracciones antigénicas (Ag) dispuestas a 0,5 µg/ml. Se dispuso una placa sin antígeno que actuaba como blanco para comprobar si existía reacción inespecífica debido a alguno de los componentes que formaban parte del diluyente frente a la placa y/o conservante/bloqueante de la misma. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 44.

Tabla 44. Evaluación mAB conjugado en diferentes diluyentes sobre ensayo directo.

Diluyente conjugado / Ag	>440 kDa		440-75 kDa		<13 kDa		GP		Placa sin antígeno	
	RLU	Ratio S/F	RLU	Ratio S/F	RLU	Ratio S/F	RLU	Ratio S/F	RLU	Ratio S/F
Condición 1	20,277	35,636	5,541	9,738	3,523	6,192	109,874	193,1	0,569	1,000
Condición 2	9,936	33,455	1,098	3,697	0,919	3,094	75,959	255,754	0,297	1,000
Condición 3	6,951	32,943	1,066	5,052	0,816	3,867	68,36	323,981	0,211	1,000
Condición 4	12,019	132,077	1,319	14,495	0,755	8,297	89,727	986,011	0,091	1,000
Condición 5	9,385	153,852	0,834	13,672	0,378	6,197	71,546	1172,885	0,061	1,000

Las mejores ratios señal/fondo se obtuvieron con las denominadas Condición 1, 4 y 5 para los antígenos de alto, medio y bajo peso molecular. En cuanto a la fracción glicoproteica, los que aumentaron notablemente su discriminación fueron las condiciones 4 y 5.

Una vez realizado el ensayo directo, tuvo lugar el ensayo de captura con el mAB tapizando la placa a la concentración definida en el apartado anterior, 2 µg/ml, así como el tampón de tapizado y tampón de bloqueo. El objetivo fue evaluar los 3 tampones que mejor discriminaban entre la señal aportada por la reactividad del mAB conjugado frente a cada tipo de antígeno *versus* la reactividad del mismo en el pocillo que actúa como blanco en cada caso.

Seguidamente se realizó el siguiente ensayo utilizando el mAB conjugado que se dispuso a 1/5000, mismo título empleado en el ensayo directo anterior y utilizando como matriz muestra de suero.

Las muestras caracterizadas como negativas se marcan en verde y las caracterizadas como positivas se muestran en rojo (Tabla 45). Los resultados son expresados en RLU y en el pie inferior de la tabla se refleja el promedio aportado por las muestras positivas y promedio aportado por las muestras negativas, lo que sirve para el cálculo de la ratio señal/fondo. Además, a través del CO teórico y la RLU de cada muestra, se calculó la denominada ratio Señal/CO.

Tabla 45. Evaluación diferentes diluyentes de conjugado en ensayo de captura tipo sandwich.

Muestra/Dil.	Diluyente 1	Señal/CO	Diluyente 4	Señal/CO	Diluyente 5	Señal/CO
A-83-007	0,533	0,344	0,464	0,446	0,247	0,520
A-83-012	0,594	0,383	0,519	0,499	0,213	0,449
A-83-009	0,395	0,255	0,486	0,468	0,196	0,412
A-83-010	0,434	0,280	0,543	0,522	0,241	0,507
A-83-011	1,867	1,204	0,577	0,555	0,265	0,558
A-83-008	0,800	0,516	0,791	0,760	0,339	0,714
A-83-013	0,710	0,458	0,740	0,711	0,337	0,710
A-83-014	0,560	0,361	0,567	0,545	0,250	0,527
A-83-015	0,567	0,366	0,477	0,459	0,246	0,519
A-83-016	0,495	0,319	0,561	0,539	0,270	0,568
A-83-017	0,568	0,366	0,640	0,615	0,310	0,654
A-83-018	0,521	0,336	0,547	0,526	0,212	0,446
A-83-019	0,362	0,234	0,412	0,396	0,181	0,381
A-83-020	0,496	0,320	0,552	0,531	0,227	0,478
A-83-021	0,479	0,309	0,521	0,501	0,369	0,776

Muestra/Dil.	Diluyente 1	Señal/CO	Diluyente 4	Señal/CO	Diluyente 5	Señal/CO
A-83-022	0,605	0,390	0,693	0,667	0,272	0,573
A-122-021	0,111	0,072	0,164	0,157	0,087	0,183
A-120-023	0,260	0,168	0,372	0,358	0,223	0,470
A-110-005	0,140	0,090	0,212	0,204	0,113	0,238
A-122-023	0,553	0,357	0,796	0,766	0,378	0,796
A-122-025	0,332	0,214	0,470	0,452	0,199	0,418
A-122-027	0,207	0,133	0,226	0,218	0,137	0,288
A-120-027	0,128	0,082	0,184	0,177	0,101	0,213
A-122-031	21,191	13,672	18,042	17,348	14,945	31,464
A-122-033	13,242	8,543	11,563	11,118	8,554	18,008
A-122-035	26,336	16,991	24,474	23,533	20,789	43,767
A-120-025	5,673	3,660	5,389	5,181	3,330	7,010
A-109-097	3,285	2,119	2,536	2,438	1,616	3,403
A-121-057	7,800	5,033	8,085	7,774	4,315	9,085
A-121-030	29,302	18,905	27,070	26,029	23,459	49,388
A-121-012	8,424	5,435	8,575	8,246	4,508	9,490
A-121-057	2,470	1,594	3,508	3,373	2,281	4,803
A-121-012	3,248	2,096	4,953	4,763	2,711	5,708
A-121-030	11,323	7,305	12,713	12,224	11,652	24,530
Señal	12,027	7,759	11,537	11,093	8,924	18,787
Fondo	0,509	0,329	0,501	0,481	0,235	0,496
Señal/fondo	23,610	23,610	23,047	23,047	37,906	37,906
CO Teórico	1,553	-	1,038	-	0,475	-
Wilcoxon p-valor	-	3,725e-8	-	0,00096	-	-

La mayor discriminación entre muestras positivas y negativas fue la aportada por el diluyente de conjugado denominado StabilZyme Protein-Free Ref. SZPF de la casa comercial Surmodics, "Diluyente 5". El test de Wilcoxon mostró que existían diferencias significativas entre el "Diluyente 5" vs. "Diluyente 1" y "Diluyente 5" vs. "Diluyente 4", con p-valores <0,05 en ambos (Tabla 45). La Figura 61 muestra que los valores normalizados para los negativos son similares para las tres condiciones, en cambio, se aprecian ratios más elevadas para las muestras positivas en el Diluyente 5, lo que aumenta el poder discriminatorio.

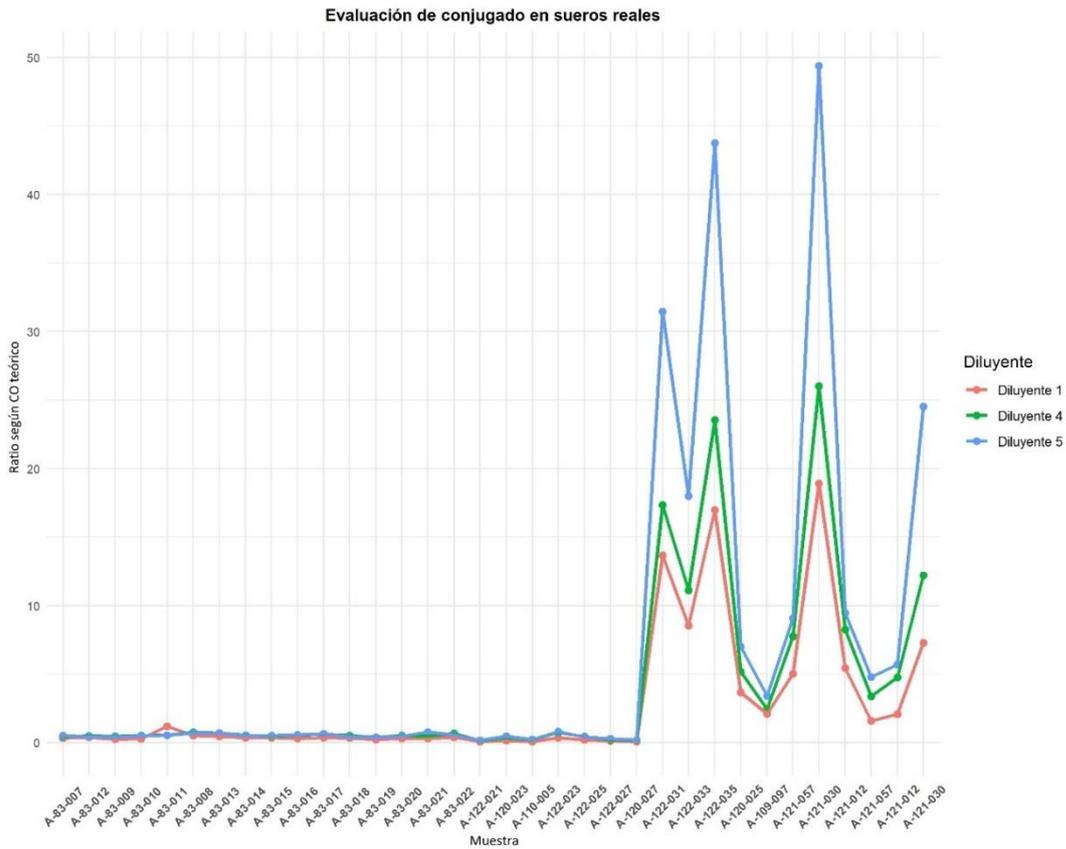


Figura 61. Valores ratio Señal/CO para cada tipo de diluyente de conjugado.

En cuanto al diagrama de cajas y bigotes (Figura 62), al igual que ocurre en ensayos previos, existe una distribución asimétrica, tal y como refleja la posición de Q2 en las tres cajas y los datos están sesgados positivamente estando este sobre la línea del valor de Q1. El 50% de los valores presentó ratios señal/CO muy cercanos al 0, lo que se traduce en este tipo de representación. Por otro lado, se aprecia mayor dispersión de datos en el “Diluyente 5”, correspondiendo estos a las muestras positivas contando también con la presencia de 5 valores atípicos.

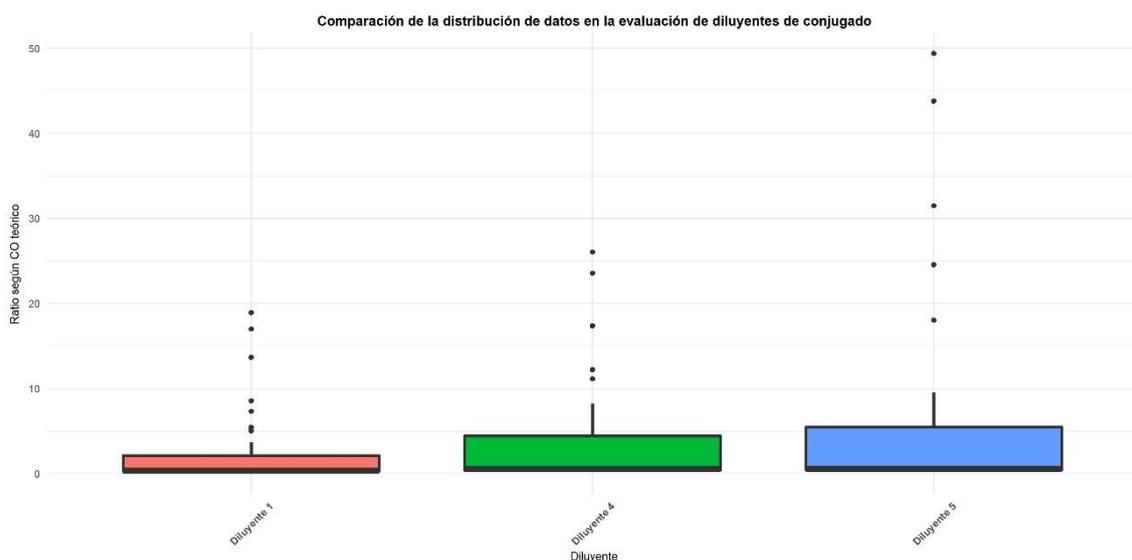


Figura 62. Diagrama de caja y bigotes. Comparación de la distribución de valores ratio Señal/CO de los tres tipos de diluyentes de conjugado.

A continuación, se realizó un ensayo de estabilidad forzada del mAB conjugado con peroxidasa diluido en el tampón seleccionado. De este modo se intentaba imitar la vida útil que presentaría el reactivo una vez contenido en el kit.

La condición objeto de estudio fue la conservación de la solución a 37°C durante 12 días, la condición tomada como referencia, fue la conservación de una solución hermana durante el mismo periodo de tiempo, esta vez a 4°C. Para eliminar la variabilidad aportada por las muestras en el ensayo de captura tipo sandwich, la reactividad del mAB conjugado se midió sobre placa con antígeno inmovilizado en ensayo directo.

El porcentaje de caída de señal de la condición sometida a estrés con respecto a la condición tomada de referencia fue de 14,668% (Tabla 46 y Figura 63 (línea color salmón)). Se cumplió, por tanto, la especificación establecida de obtener un porcentaje de caída de señal $\leq 20\%$ para la aceptación en este tipo de ensayo.

Tabla 46. Estabilidad forzada de mAB conjugado.

	RLU 4°C	RLU 37°C	% caída señal
Réplica 1	28,75	24,55	/
Réplica 2	28,72	24,61	
Réplica 3	28,98	24,59	
Promedio	28,81	24,58	14,668

4.2.3. DISEÑO Y DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LOS CONTROLES DE LA TÉCNICA.

Los controles del kit se disponen listos para uso en cada monodosis de tal manera que el cliente no requiere emplear tiempo extra en el procesamiento ni en el montaje de los mismos.

La materia prima empleada en los controles del kit fue el antígeno purificado de bajo peso molecular. Este antígeno fue diluido a la concentración definida en tampón fosfato (PB), tampón fosfato sódico (PBS) y un suero negativo.

Antes de someter a estabilidad a cada condición, el antígeno se tituló y se eligió aquella concentración a la cual se obtuvo una RLU entre 2-7, especificación establecida para el calibrador del kit siendo similar a otros kits comerciales de la misma línea.

El ensayo de estabilidad forzada consistió en estudiar el efecto a 37°C durante 12 días con respecto a la condición tomada como referencia, aquella donde se mantuvo a 4°C durante el mismo periodo de tiempo (Figura 47).

Tabla 47. Estabilidad forzada de calibrador en diferentes diluyentes.

		RLU 4°C	RLU 37°C	% caída señal
Control PB Ag 0,08µg/ml	Réplica 1	4,95	5,34	
	Réplica 2	4,82	4,97	
	Réplica 3	4,87	5,16	
	Promedio	4,88	5,15	-5,639
Control PBS Ag 0,08µg/ml	Réplica 1	5,08	4,99	
	Réplica 2	4,71	4,98	
	Réplica 3	4,88	5,06	
	Promedio	4,89	5,01	-2,375
Control Suero negativo 44200 Ag 0,08µg/ml	Réplica 1	6,29	6,79	
	Réplica 2	6,28	6,26	
	Réplica 3	5,97	6,44	
	Promedio	6,18	6,50	-5,113

En los tres tampones se obtuvieron porcentajes con valores negativos, muy cercanos a 0, lo cual indicaba que las señales RLU obtenidas en las condiciones sometidas a 37°C eran ligeramente superiores a la condición de referencia, es decir, no se apreciaba degradación (Tabla 47 y Figura 63 (líneas en tonos de verde)). Se decidió usar tampón PBS ELISA pH 7,2, ampliamente empleado como base de múltiples soluciones en los kits comerciales de VIRCELL S.L., y añadir Neolone® y Bronidox® como conservantes de la mezcla.

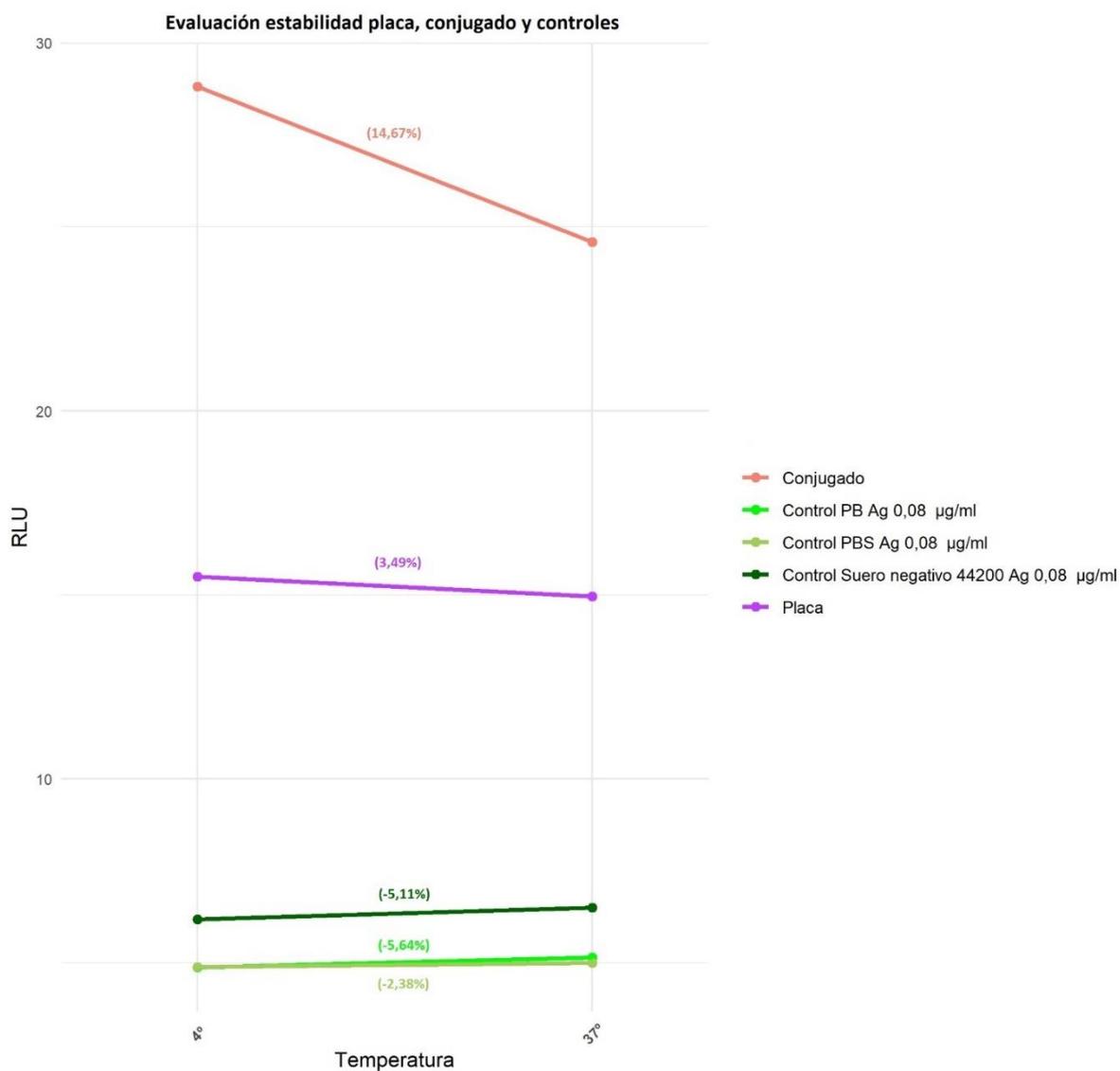


Figura 63. Ensayo estabilidad forzada de placa, conjugado y controles.

4.2.4. ANÁLISIS DE LOS PERIODOS DE INCUBACIÓN EN EL ENSAYO DE CAPTURA TIPO SANDWICH.

La condición estándar empleada en los kits comercializados de la línea VIRCLIA consiste en 2 periodos de incubación de 20 minutos y un último periodo de 10 minutos. En el diseño y desarrollo de este kit se analizaron varias condiciones, incluyendo la estándar, con el objetivo de obtener una tasa óptima de discriminación. Cuando se aplicaron incrementos en la duración de la técnica, estos fueron en ciclos de 20 minutos debido a la necesidad de acople al resto de técnicas en los sistemas automatizados. Por otro lado, también se contempló y se evaluó en paralelo el protocolo seguido por Bio-Rad, que consiste en un único periodo de incubación donde la muestra y el mAB conjugado

se dispensan de forma conjunta en proporción 1:1. Las condiciones evaluadas fueron las expuestas en la Tabla 48:

Tabla 48. Diferentes periodos de incubación a aplicar en la técnica de CLIA.

	Condición 1	Condición 2	Condición 3	Condición 4	Condición 5
Incubación Muestra	40'	40'	20'	20'	40'
Incubación Mab-HRP	40'	20'	40'	20'	
Incubación Sustrato	10'	10'	10'	10'	10'

Mediante el sistema de captura tipo sandwich, se evaluaron los tiempos de incubación de la tabla anterior empleando, como hasta ahora, el denominado CL21 tanto en placa (2 µg/ml) como actuando de elemento detector del sistema (título 1/5000). Como muestra se usó el antígeno de bajo peso molecular a varias concentraciones. Los resultados obtenidos en la evaluación en las distintas condiciones vienen indicados en la Tabla 49.

Tabla 49. Evaluación diferentes periodos de incubación con antígeno de bajo peso molecular.

Ag/Incubación	Condición 1		Condición 2		Condición 3		Condición 4		Condición 5	
	RLU	Ratio S/F								
0,25µg/ml	4,338	3,987	5,835	5,443	7,952	1,622	6,831	5,641	3,34	1,912
0,06µg/ml	2,03	1,866	2,281	2,128	6,301	1,285	3,416	2,821	2,044	1,17
Blanco	1,088	1	1,072	1	4,904	1	1,211	1	1,747	1

Se obtuvieron los mejores resultados en la condición 2 y 4, la discriminación entre el positivo y blanco fue superior en ambas y, dentro de ellas, se obtuvieron valores ligeramente mejores en las dos proporciones de antígeno ensayadas para la condición 4, la que presentaba un proceso consistente en 3 etapas con periodos de incubación consistentes en 20 minutos + 20 minutos + 10 minutos. En cuanto a la condición 5, la señal RLU del pocillo “blanco” se vio aumentada cuando se llevó a cabo la incubación conjunta de la muestra y el mAB conjugado, esto hizo que el grado de discriminación empeorara con respecto al resto de condiciones a excepción de la condición 3 que presentó valores similares (Figura 64).

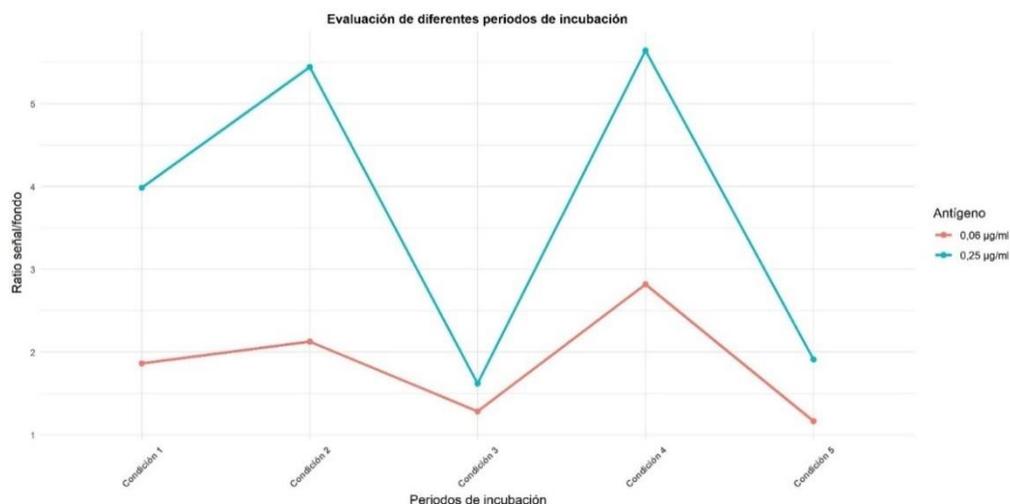


Figura 64. Evaluación diferentes periodos de incubación en ensayo captura con antígeno de bajo peso molecular.

Además del ensayo realizado con el antígeno de bajo peso molecular, se llevó a cabo la evaluación de los diferentes periodos de incubación con un conjunto de muestras reales (Tabla 50), negativas (verde) y positivas (rojo), donde se analizó la ratio obtenida a través del CO teórico (Figura 65).

Tabla 50. Evaluación diferentes periodos de incubación con muestras reales.

Muestra / Incubación	Condición 1		Condición 2		Condición 3		Condición 4		Condición 5	
	RLU	Señal/CO								
8325133	0,105	0,422	0,078	0,248	0,083	0,343	0,065	0,485	0,017	0,120
8395806	0,164	0,659	0,088	0,280	0,091	0,376	0,061	0,455	0,012	0,085
8395776	0,087	0,349	0,095	0,303	0,089	0,368	0,057	0,425	0,028	0,197
8325798	0,063	0,253	0,201	0,640	0,187	0,773	0,117	0,873	0,098	0,690
8325803	0,078	0,313	0,119	0,379	0,082	0,339	0,086	0,642	0,019	0,134
8325858	0,106	0,426	0,077	0,245	0,074	0,306	0,055	0,410	0,010	0,070
8328450	0,114	0,458	0,088	0,280	0,077	0,318	0,060	0,448	0,013	0,092
8325159	0,197	0,791	0,244	0,777	0,171	0,707	0,062	0,463	0,086	0,606
8325132	2,646	10,627	2,462	7,841	1,477	6,103	2,054	15,328	1,048	7,380
8325169	18,259	73,329	21,642	68,924	17,810	73,595	15,663	116,888	6,770	47,676
8325832	0,978	3,928	1,743	5,551	1,094	4,521	1,734	12,940	0,867	6,106
8328427	8,297	33,321	12,004	38,229	8,245	34,070	9,441	70,455	3,898	27,451
8325137	16,597	66,655	21,091	67,169	17,227	71,186	15,812	118,000	6,602	46,493
8328441	0,746	2,996	0,751	2,392	0,423	1,748	0,631	4,709	0,333	2,345
8325148	1,516	6,088	2,949	9,392	1,625	6,715	2,298	17,149	1,121	7,894
8395782	3,267	13,120	6,006	19,127	3,943	16,293	4,647	34,679	2,163	15,232
Señal	6,538	26,258	8,581	27,328	6,481	26,779	6,535	48,769	2,850	20,072
Fondo	0,114	0,459	0,124	0,394	0,107	0,441	0,070	0,525	0,035	0,249
Señal/Fondo	57,228	57,228	69,341	69,341	60,707	60,707	92,860	92,860	80,572	80,572
CO Teórico	0,249	-	0,314	-	0,242	-	0,134	-	0,142	-
Wilcoxon p-valor	-	0,0017	-	0,00038	-	0,00029	-	-	-	3,052e-5

Las muestras reales también proporcionaron resultados equivalentes donde la Condición 4 fue con la que se obtuvo mayor discriminación entre negativos y positivos. A esta le siguió la Condición 5, la que consistía en un único paso de incubación para muestra y conjugado, pero los valores RLU de las muestras positivas fueron en promedio más bajas y el fondo de la reacción fue similar. Por esta razón, la ratio señal/fondo difiere en 12,29 puntos. Por otro lado, las condiciones basadas en el incremento de tiempo en etapas individualizadas de incubación para muestra y/o conjugado reflejaron peores resultados con una disminución de la ratio señal/fondo (Tabla 50). El test de Wilcoxon mostraba que existían diferencias significativas entre cada una de ellas y la denominada “Condición 4”. Se seleccionó, por tanto, la “Condición 4” por sus resultados, teniendo también a su favor ser la condición habitual con la que se llevan a cabo el resto de referencias de la línea VirClia.

La representación gráfica de las ratios Señal/CO obtenidos a través de los valores RLU de cada muestra y el CO teórico calculado, mostró que para la Condición 4, los valores eran muy superiores al resto de condiciones para las muestras positivas y similares en cuanto a ruido de fondo (Figura 65).

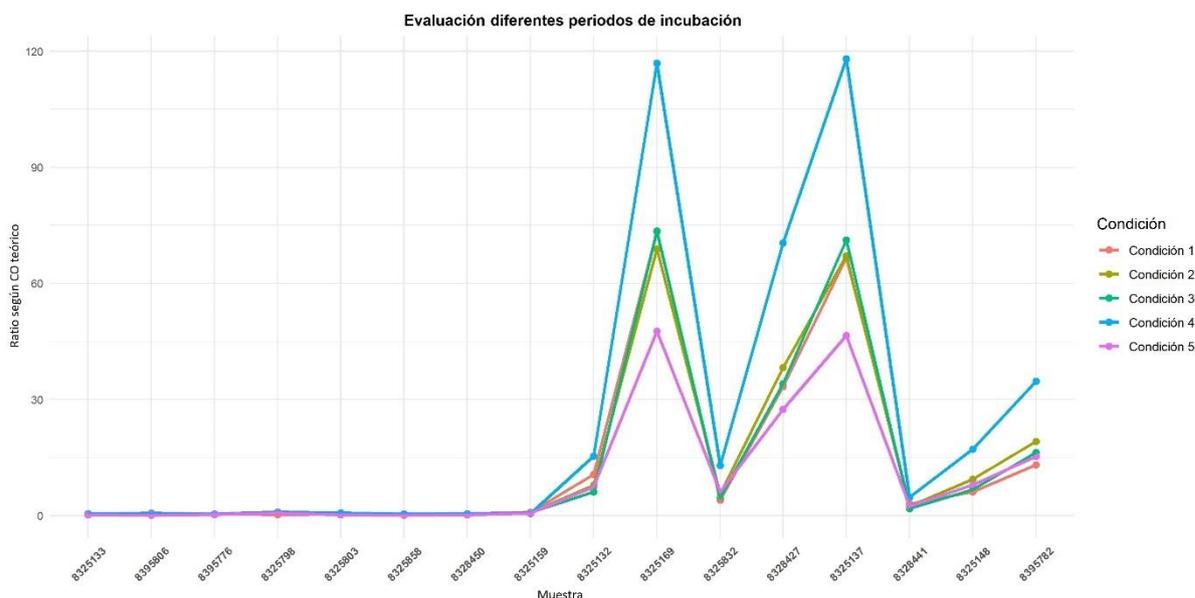


Figura 65. Valores ratio Señal/CO de la evaluación de diferentes periodos de incubación con muestras reales.

El diagrama de cajas y bigotes (Figura 66), muestra que las distintas poblaciones están sesgadas de forma positiva ya que el valor de Q2 está sobre el valor de Q1. El 50% de los valores rondan el valor 0 y los correspondientes a muestras positivas, se encuentran alejados, presentándose

mayor dispersión en la denominada “Condición 4”. Todas las condiciones presentaron 3 valores atípicos.

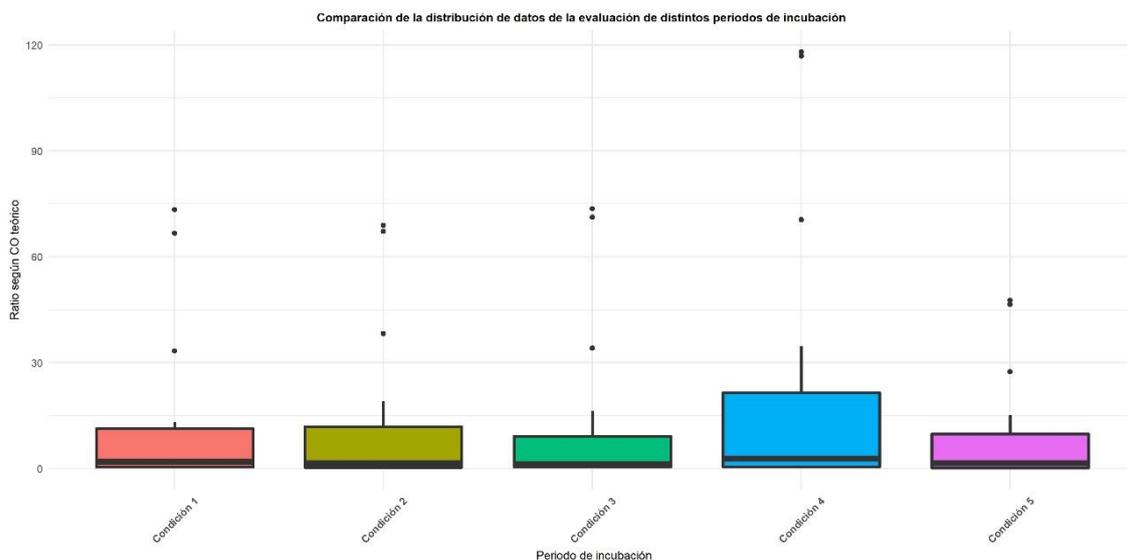


Figura 66. Diagrama de cajas y bigotes. Comparación de la distribución de valores ratio Señal/CO de los distintos periodos de incubación.

4.3. MUESTRAS BIOLÓGICAS.

4.3.1. ESTABILIDAD.

4.3.1.1. ESTABILIDAD FORZADA.

Cuatro muestras de suero positivas fueron sometidas a varios ciclos de congelación-descongelación a -80°C . Una vez transcurrido el tiempo hasta conseguir 4 réplicas de cada una de ellas, donde cada réplica correspondía con un ciclo de congelación-descongelación, se evaluaron en paralelo por el kit de VirClia. Además de las réplicas de los distintos ciclos, se incluyó en el montaje una alícuota extra que no había sufrido ninguna congelación. Esta actuó como condición de referencia.

Los resultados RLU obtenidos se sometieron a un cálculo para obtener el porcentaje de caída de señal de cada ciclo de congelación-descongelación con respecto a la condición tomada como referencia (Tabla 51).

Tabla 51. Estabilidad forzada de muestras tras varios ciclos de congelación-descongelación. (Ciclos C-D= ciclos congelación-descongelación; t=0, t=1, t=2, t=3 y t=4, corresponden al nº de ciclos; % caída, corresponde a la caída de señal RLU de la condición a evaluar respecto a la referencia)

Muestra / Ciclos C-D	t=0 (Ref.)		t=1		t=2		t=3		t=4	
	RLU	% caída	RLU	% caída	RLU	% caída	RLU	% caída	RLU	% caída
8246975	20,04	0	19,21	4,15	18,29	8,75	17,21	14,12	16,14	19,49
E00212027810121	13,88	0	14,03	-1,12	12,69	8,54	11,82	14,83	11,17	19,53
E00212101444621	7,25	0	6,54	9,88	6,38	12,03	6,59	9,18	5,95	17,95
L071220000779	4,13	0	3,49	15,56	3,52	14,93	3,6	12,88	2,75	33,54

La primera muestra experimentó caída gradual a lo largo de los ciclos de congelación-descongelación (Figura 67, línea color salmón); la segunda, no mostró apenas caída de señal tras los dos primeros ciclos de congelación-descongelación, posterior a estos, sí que se vio caída y esta fue gradual a medida que se contabilizaban ciclos (Figura 67, línea color verde). Las dos siguientes muestras, presentaron una mayor caída de señal en el primer ciclo de congelación-descongelación con respecto a la condición de referencia, pero a continuación, presentaron un comportamiento en meseta, con variaciones muy débiles en su valor RLU, hasta el cuarto ciclo donde se vio un mayor aumento (Figura 67, líneas color azul y morado).

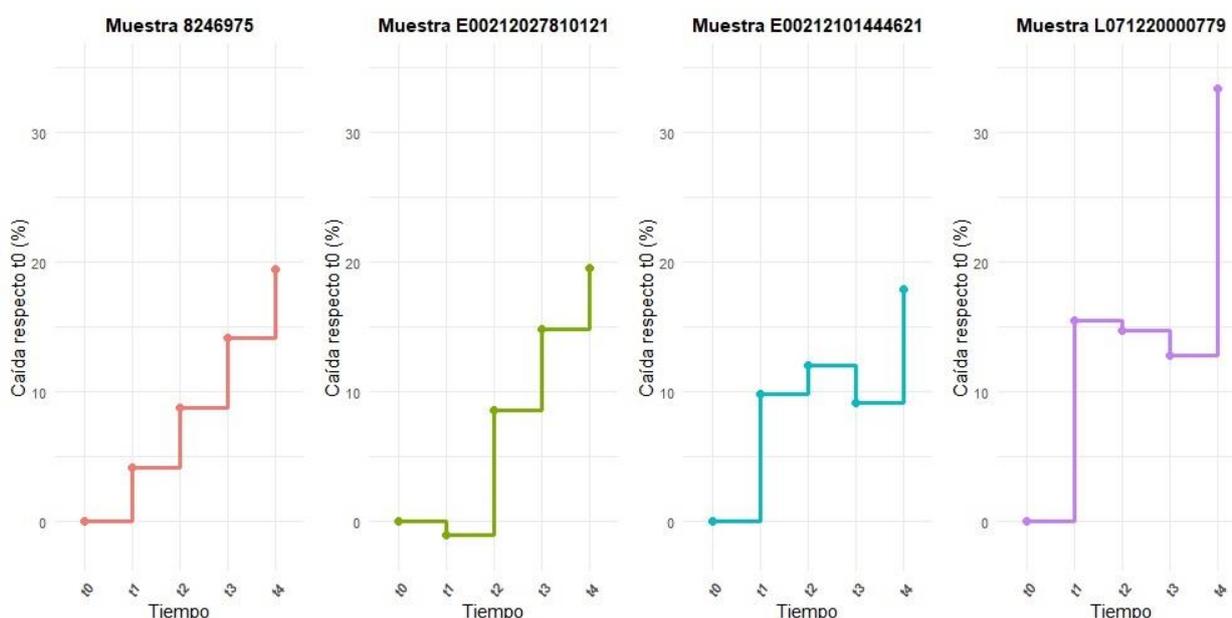


Figura 67. Estabilidad forzada con ciclos de congelación-descongelación en muestras reales.

4.3.1.2. ESTABILIDAD REAL.

Se evaluó la conservación y almacenamiento de las muestras a -80°C . Muestras de suero y LBA positivas fueron evaluadas en junio de 2020 constituyendo el tiempo 0 del ensayo. Por otro lado, una alícuota hermana de las mismas se mantuvo durante 2 años a dicha temperatura. Pasado este tiempo, en junio de 2022, dicha alícuota fue evaluada por el kit de VirClia empleando otro lote distinto al inicial ya que la caducidad del kit es de 15 meses. Los valores obtenidos en este ensayo son referidos en la Tabla 52.

Tabla 52. Estabilidad real muestras suero y LBA.

(% caída señal, corresponde a la caída de señal RLU de la condición a evaluar respecto a la referencia)

Tipo de muestra	Alícuota	Junio 2020		Junio 2022		% caída señal
		RLU	Índice	RLU	Índice	
Suero	R-319-080	2,72	0,67	2,39	0,41	12,30
Suero	R-320-033	1,96	0,54	2,18	0,37	-11,15
Suero	R-320-052	0,92	0,30	0,80	0,15	12,93
Suero	R-320-072	0,97	0,40	0,90	0,17	7,57
Suero	R-401-081	1,78	0,54	1,54	0,29	13,79
LBA	R-409-059	1,87	0,76	1,90	0,50	-1,63
LBA	R-409-066	1,85	0,53	1,61	0,46	12,94
LBA	R-409-077	0,61	0,17	0,51	0,17	17,31

En general, se aprecia caída de señal en todas las muestras excepto en dos de las ellas donde la señal RLU de la condición "Junio 2022" presentó un valor RLU más elevado que en el ensayo inicial (R-320-033 y R-409-059). La muestra R-409-077 con valor RLU e índice en torno al punto de corte de la técnica, fue la que presentó mayor caída tras su almacenamiento durante dos años con respecto a la condición de referencia.

Se concluye que, en valores RLU, las muestras presentaron cierta estabilidad, con un promedio de un 8% de caída de señal, tras haber sido conservadas durante 2 años a -80°C . En función de la naturaleza de la muestra, se obtuvo un promedio del 7,09% de caída de señal para las muestras de suero y del 9,54% para las 3 muestras LBA. Según se observa en la Figura 68, en las 8 muestras evaluadas, no existe una tendencia marcada influida por la naturaleza de las mismas, sino que es dependiente de cada una.

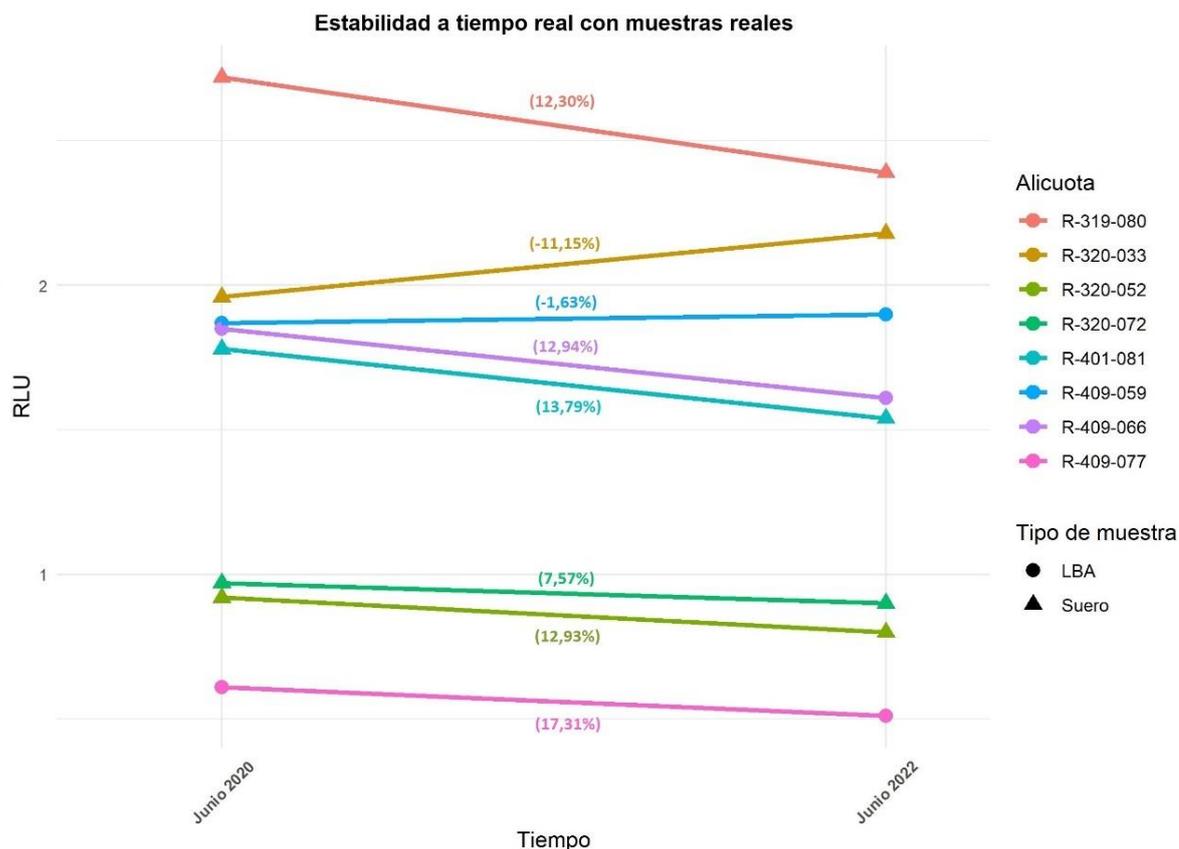


Figura 68. Estabilidad real en muestras reales.

4.3.2. TRATAMIENTO.

El tratamiento recibido por las muestras biológicas empleadas en la técnica se ha descrito ampliamente en la bibliografía y es el empleado en el kit de ELISA que se usará como referencia. El tratamiento consistió en la adición de un agente quelante a la muestra, una posterior etapa de calor y una última fase de centrifugación. Las propiedades termoestables del antígeno permiten este tipo de procesamiento y favorecen su liberación al sobrenadante.

A pesar de existir un protocolo bien definido por parte del kit de Bio-Rad, el cual está descrito en el apartado Material y Métodos, se intentó minimizar la mano de obra del técnico de laboratorio con el objetivo de convertir el procedimiento empleado para las muestras en un paso más simple y contemplar si existía otro agente que aportara resultados equivalentes (Tabla 53).

Tabla 53. Tratamientos a estudiar sobre las muestras biológicas.

Condición	Solución	Proporción sobre la muestra	Temperatura	Tiempo	Centrifugación
1	Tripsina + EDTA 1:1	1/4	37°C	20 min.	No
2	Tripsina + EDTA 1:1	1/4	Temperatura ambiente	20 min.	No
3	Tripsina	1/4	37°C	20 min.	No
4	Tripsina	1/4	Temperatura ambiente	20 min.	No
5	Tampón neutro con EDTA 4% + 2-Mercaptoetanol 1:1	1/4	37°C	20 min.	No
6	2-Mercaptoetanol	1/4	37°C	20 min.	No
7	Tampón citrato y fosfato pH 2,3	1/4	37°C	20 min.	No
8	Tampón neutro con EDTA 4% + 2-Mercaptoetanol 1:1	1/4	120°C	6 min.	10000 x g - 10 min.
9	2-Mercaptoetanol	1/4	120°C	6 min.	10000 x g - 10 min.
10	Tampón citrato y fosfato pH 2,3	1/4	120°C	6 min.	10000 x g - 10 min.
11	Tampón neutro con EDTA 4%	1/4	37°C	20 min.	No
12	Tampón neutro con EDTA 4%	1/4	120°C	6 min.	10000 x g - 10 min.

Este ensayo se llevó a cabo sobre muestras reales de suero y se ensayaron mediante técnica de captura tipo sandwich con el mAB de captura y de detección que había sido definido en etapas anteriores. Las muestras señaladas en color verde fueron las clasificadas como negativas y las de color rojo, como positivas (Tabla 54).

Tabla 54. Evaluación diferentes tratamientos de muestra.

Muestra/Tratamiento	RLU 1	Señal/CO 1	RLU 2	Señal/CO 2	RLU 3	Señal/CO 3	RLU 4	Señal/CO 4	RLU 5	Señal/CO 5	RLU 6	Señal/CO 6
44200	0,19	0,22	0,03	0,38	0,18	0,18	0,02	0,43	0,03	0,17	0,04	0,15
61200	0,54	0,62	0,05	0,71	0,65	0,67	0,04	0,75	0,06	0,45	0,05	0,19
78600	0,11	0,13	0,03	0,52	0,31	0,31	0,03	0,48	0,09	0,63	0,09	0,35
62400	0,07	0,08	0,02	0,31	0,23	0,24	0,02	0,39	0,07	0,48	0,16	0,64
97600	9,87	11,28	0,70	10,78	7,62	7,82	0,57	10,16	0,11	0,79	0,13	0,51
96800	21,22	24,25	6,58	101,28	19,68	20,20	3,09	55,18	0,25	1,73	0,24	0,97
41800	4,66	5,32	0,04	0,62	4,76	4,89	0,03	0,45	0,16	1,15	0,35	1,38
72800	14,05	16,05	1,24	19,08	11,78	12,10	0,70	12,48	0,30	2,08	0,30	1,18
Promedio señal	12,45	14,23	2,14	32,94	10,96	11,25	1,10	19,57	0,21	1,44	0,25	1,01
Promedio fondo	0,23	0,26	0,03	0,48	0,34	0,35	0,03	0,51	0,06	0,43	0,08	0,34
Señal/fondo	54,18	54,18	68,51	68,51	32,09	32,09	38,11	38,11	3,31	3,31	3,01	3,01
% caída señal	-27,42	-	78,08	-	-12,18	-	88,78	-	97,90	-	97,40	-
CO Teórico	0,87	-	0,07	-	0,97	-	0,06	-	0,14	-	0,25	-

Muestra/Tratamiento	RLU 7	Señal/CO 7	RLU 8	Señal/CO 8	RLU 9	Señal/CO 9	RLU 10	Señal/CO 10	RLU 11	Señal/CO 11	RLU 12	Señal/CO 12
44200	0,12	0,33	0,10	0,21	0,02	0,30	0,02	0,16	0,22	0,27	0,03	0,12
61200	0,25	0,69	0,09	0,19	0,01	0,20	0,02	0,18	0,33	0,42	0,16	0,63
78600	0,20	0,55	0,06	0,14	0,04	0,56	0,06	0,54	0,19	0,24	0,07	0,25
62400	0,22	0,60	0,30	0,64	0,04	0,59	0,06	0,54	0,54	0,68	0,03	0,12
97600	2,00	5,53	3,54	7,55	0,03	0,50	0,07	0,61	11,13	14,03	7,15	27,62
96800	3,68	10,19	5,68	12,11	0,12	1,88	0,10	0,87	15,24	19,21	17,62	68,05
41800	0,52	1,45	0,65	1,38	0,10	1,48	0,06	0,57	3,49	4,40	2,93	11,30
72800	2,68	7,42	4,19	8,93	0,24	3,65	0,07	0,60	8,49	10,70	11,37	43,92
Promedio señal	2,22	6,15	3,51	7,49	0,12	1,88	0,07	0,66	9,58	12,09	9,77	37,72
Promedio fondo	0,20	0,54	0,14	0,29	0,03	0,41	0,04	0,36	0,32	0,40	0,07	0,28
Señal/fondo	11,34	11,34	25,56	25,56	4,55	4,55	1,87	1,87	30,21	30,21	133,83	133,83
% caída señal	77,28	-	64,03	-	98,73	-	99,25	-	1,90	-	0,00	-
CO Teórico	0,36	-	0,47	-	0,07	-	0,11	-	0,79	-	0,26	-

Se analizó la ratio señal/fondo, el porcentaje de caída de señal en muestras positivas y, mediante el cálculo del CO teórico y el valor RLU de cada muestra, se definió la denominada ratio señal/CO.

La capacidad de discriminación entre negativos y positivos, que viene dada por la ratio señal/fondo, indicaba que la mejor condición evaluada fuera la tomada como referencia, en concreto la Condición 12. En cuanto al porcentaje de caída de señal de muestras positivas indica que las dos opciones en las que no se observaba caída fueron las condiciones 1, 3 y 11, pero en estas el promedio del fondo aumentaba. Esto hizo que la discriminación entre negativos y positivos se encontrara a la mitad o más que la condición tomada como referencia. En la mayoría de las condiciones evaluadas lo que parecía ocurrir fue que el agente empleado podía estar afectando a la funcionalidad y/o conformación del antígeno de galactomanano lo que le impedía ser capturado y detectado. Esto se reflejaba en los porcentajes de caída de señal calculados sobre el promedio de RLU aportado por las muestras positivas (Tabla 54).

Las ratios señal/CO mostraban que los valores obtenidos para las muestras negativas eran iguales o menores que para la condición o tratamiento 12 (referencia). Esta condición fue la que presentaba valores más altos para las muestras positivas con respecto al resto a excepción de la muestra 96800 en el tratamiento 2. Esta muestra experimentaba incremento en esta condición, siendo la única de las 4 muestras positivas evaluadas. Se tomó como un valor atípico que pudo deberse a un error en el montaje de la técnica. Por ese motivo, se eliminó la muestra positiva citada para la evaluación de esa condición y se obtuvo, en promedio, un porcentaje de caída de señal en torno al 78% (Figura 69).

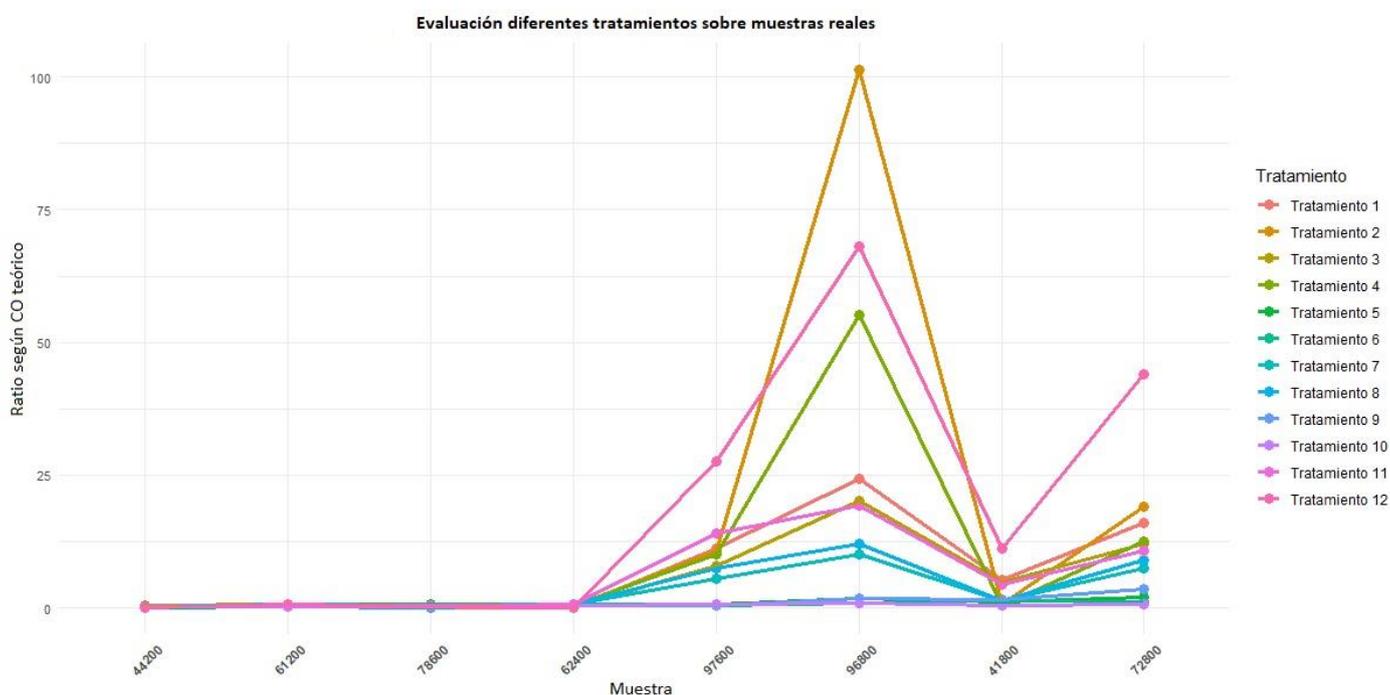


Figura 69. Evaluación diferentes tratamientos de muestra.

El diagrama de cajas y bigotes muestra, como ocurre en casos anteriores, una tendencia de sesgo positivo para todas las condiciones evaluadas al estar el valor de la mediana muy cercano a Q1. En cuanto a la dispersión, esta es notablemente mayor para el “Tratamiento 12” siendo debida a los valores de ratio señal/CO de muestras positivas. Para los tratamientos 5, 6, 9 y 10, no se observa apenas caja debido a presentar señales planas tanto para negativos y positivos, ya que estas están cercanas al ruido de fondo del sistema. Se aprecian también valores atípicos, uno para el “Tratamiento 2” y otro para “Tratamiento 4”, correspondiéndose estos con los valores que alteran la tendencia de señales en promedio de dichos tratamientos (Figura 70).

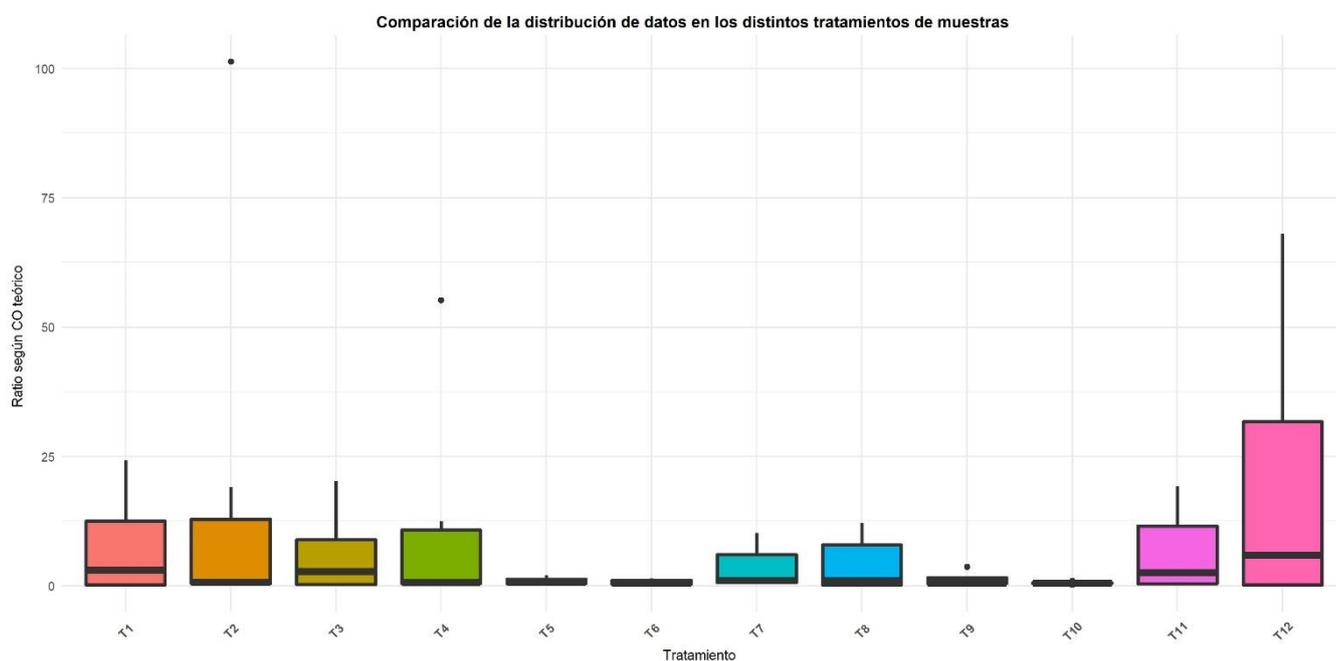


Figura 70. Diagrama de cajas y bigotes. Comparación de la distribución de valores ratio Señal/CO de los distintos tratamientos de muestras biológicas.

Los resultados de esta experiencia hacen llegar a dos conclusiones, la primera es que se requiere de un tratamiento que presente un paso de ebullición y otro de centrifugación para conseguir romper inmunocomplejos y hacer que la extracción y la liberación del antígeno de galactomanano sea lo más adecuada posible; y, por otro lado, el mejor agente, de los estudiados, es el que se usa en el kit de ELISA, el agente quelante EDTA. Procedimiento y agente que, antes de su uso en el kit de ELISA, fueron descritos por Reiss y colaboradores¹⁹³.

Otro aspecto ensayado, fue el conservante o conservantes empleados en la solución que impidiera que esta pudiera contaminarse como consecuencia de su uso y/o mantenimiento. Para ello se añadió, por un lado, Neolone® y Bronidox® y, por otro, azida sódica. Una vez añadido a muestras reales y tras su tratamiento, se apreciaba que el pellet creado en la solución que contenía Neolone® y Bronidox® era poco consistente, le daba a la muestra un aspecto heterogéneo e impedía al usuario

que la retirada del sobrenadante fuera adecuada y sencilla. Por su parte, con la solución de azida sódica, el precipitado obtenido fue más compacto con un sobrenadante más accesible (Figura 71).

Se ensayó una solución con ambos conservantes, otra con otro tipo de conservante, azida sódica, empleada a una concentración por debajo de su toxicidad y, como referencia, la solución de tratamiento de Bio-Rad. Además de su evaluación en muestras reales sobre ensayo de captura, se analizó en primer lugar el aspecto del precipitado obtenido ya que es un tema importante a la hora de su procesamiento por parte del usuario final.



Figura 71. Resultado tras protocolo de tratamiento de muestras con las diferentes soluciones.

Obtenida la solución de tratamiento óptima, se ensayó sobre muestras reales tomando como referencia la solución de tratamiento de Bio-Rad. En este caso a los resultados RLU obtenidos por ambas condiciones se les aplicó el coeficiente de correlación de Pearson ya que se busca obtener una solución similar y válida contando con que el precipitado obtenido en el caso de azida sódica es más manejable que el obtenido con la mezcla de Neolone® y Bronidox®.

En la tabla 55 se muestran los valores RLU obtenidos con las dos soluciones de tratamiento empleadas. Las muestras señaladas en verde son consideradas como negativas y las señaladas en rojo, como positivas.

Tabla 55. Evaluación diferentes soluciones de tratamiento con muestras.

Muestra/Tratamiento	Sol. Tratamiento VirClia	Sol. Tratamiento Bio-Rad
w41781600503600	0,292	0,313
W41781600516300	0,491	0,245
W41781600420400	0,341	0,222
W41781600455400	0,24	0,243
w41781600796800	26,117	27,622
w41781600797600	10,226	10,324
w41781600781300	37,366	36,542
w41781600741800	4,128	4,731

En la siguiente figura se presenta la correlación entre las dos soluciones de tratamiento de muestras empleadas (Figura 72).

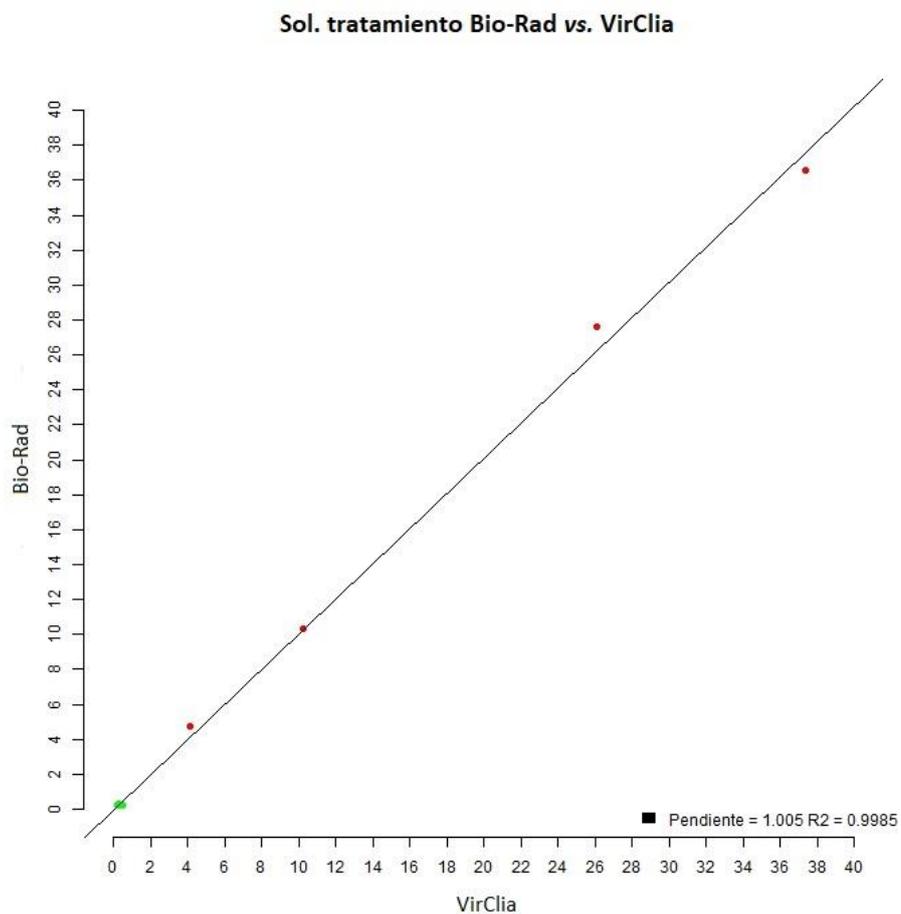


Figura 72. Correlación entre ambas soluciones de tratamiento.

Los valores de R^2 y pendiente (y) obtenidos indican alta correlación, así como buen ajuste de la condición evaluada con respecto a la tomada como referencia (Figura 72).

Otro aspecto estudiado fue la estabilidad que presentaba el sobrenadante obtenido una vez que las muestras habían sido tratadas. Para ello, en el estudio se incluyó una muestra negativa (verde) y una muestra positiva (roja) y se analizó su conservación a 2-8°C y -80°C durante varios periodos de tiempo. Tras dichos periodos de tiempo las dos muestras fueron evaluadas. Sobre los valores RLU se aplicó la fórmula para calcular el porcentaje de caída de señal en la muestra positiva y para la muestra negativa, se observó si existía un cambio en la interpretación cualitativa de la misma (Tabla 56). Las condiciones evaluadas fueron las siguientes:

- 0: Condición de referencia, tiempo 0
- 1: Conservación 2-8°C durante 48 horas
- 2: Conservación 2-8°C durante 1 semana
- 3: Conservación 2-8°C durante 2 semanas
- 4: Conservación -80°C durante 1 semana
- 5: Conservación -80°C durante 2 semanas

Tabla 56. Estabilidad sobrenadante obtenido tras tratamiento de las muestras.
(NCS: no cambia significación)

Condición	0		1		2		3		4		5		
Muestra	RLU	RLU	% caída	RLU	% caída	RLU	% caída	RLU	% caída	RLU	% caída	RLU	% caída
W41781600321800	0,52	0,29	NCS	0,43	NCS	0,19	NCS	0,23	NCS	0,2	NCS		
w41781600797600	11,51	11,11	3,42	9,86	14,31	6,28	45,4	11	4,4	7	39,15		

Tal y como recomienda Bio-Rad en sus instrucciones, el sobrenadante obtenido tras el tratamiento de las muestras permaneció estable hasta 48 horas mantenido a 2-8°C. Pasado este tiempo, a dicha temperatura, experimentó una caída tras 1 y 2 semanas siendo muy notable en la última condición. Por otro lado, un porcentaje de caída de señal similar al obtenido con la condición recomendada, 48 horas a 2-8°C, se obtuvo con la que se conservó en -80°C durante 1 semana, pero este no se mantuvo si se llega hasta las 2 semanas (Figura 73).

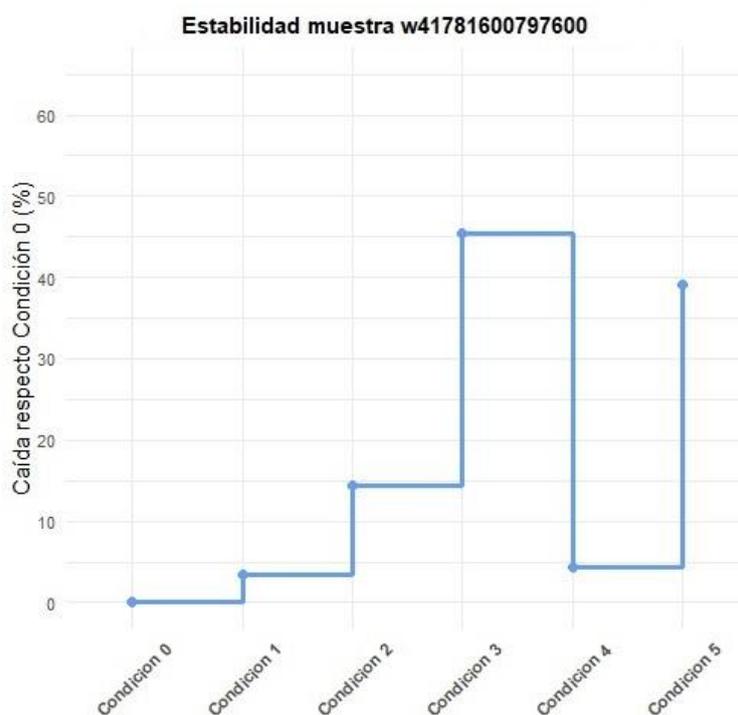


Figura 73. Estabilidad sobrenadante obtenido tras tratamiento de muestra.

Establecida la composición de la solución de tratamiento y analizada la estabilidad del sobrenadante obtenido tras el tratamiento, se analizó la etapa de centrifugación con la que finaliza el proceso de extracción del antígeno de la muestra biológica. La condición base definida en la bibliografía para el procesamiento de las muestras consiste en 10000 x g durante 10 minutos. Es bien conocido el efecto que presenta el radio de una centrífuga, así como su velocidad, en la separación de dos materias gracias a la diferencia de su densidad. Se analizó una centrífuga estándar, comúnmente usada en hospitales, con un radio máximo de $4,2 \pm 0,5$ cm y otra centrífuga con un radio mayor, $6,2 \pm 0,5$ cm; también se analizaron, con la centrífuga más común, diferentes velocidades ya que, en la práctica, puede que alguna de ellas no consiga llegar a las “x g” determinadas.

Teniendo como referencia el peso del tubo de polipropileno con y sin líquido, se analizó el sobrenadante obtenido en cada una de las condiciones ensayadas.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- a) Peso (g) del tubo vacío y el tubo con muestra + solución de tratamiento:
 - Tubo vacío: 1,543 g
 - Tubo muestra + solución tratamiento: 1,932 g

b) Peso (g) de cada tubo centrifugado (Tabla 57):

Tabla 57. Peso (g) resultante de cada sobrenadante tras el tratamiento.

	1 Peso (g)	2 Peso (g)	3 Peso (g)	4 Peso (g)	5 Peso (g)
Réplica 1	1,819	1,778	1,744	1,739	1,68
Réplica 2	1,811	1,792	1,734	1,73	1,659
Réplica 3	1,81	1,78	1,756	1,722	1,687
Réplica 4	1,796	1,772	1,758	1,724	1,672
Promedio	1,809	1,78	1,748	1,728	1,674
CV	0,526	0,473	0,645	0,445	0,731

1. 4 tubos en centrífuga CI 402: 13000 rpm - 11735 g - 10 min
2. 4 tubos en centrífuga CI 796: 13000 rpm - 9960 g - 10 min
3. 4 tubos en centrífuga CI 796: 10000 rpm - 5890 g - 10 min
4. 4 tubos en centrífuga CI 796: 8000 rpm - 3770 g - 10 min
5. 4 tubos en centrífuga CI 796: 4000 rpm - 940 g - 10 min

Si se compara la misma velocidad de centrifugación y mismo periodo de tiempo con la centrífuga de mayor radio máximo, se obtuvo una diferencia de 0,029 g frente a la centrífuga con menor radio. Si se analizan las diferentes velocidades manteniendo el mismo periodo de tiempo y en la misma centrífuga se obtenía una diferencia de peso de 0,106 g en velocidades comprendidas entre 13000 y 4000 rpm (Tabla 57).

Aunque existan mínimas diferencias en cuanto al sobrenadante obtenido medido mediante peso, se recomienda, a ser posible, usar una centrífuga cuyo rango contemple las 10000 x g y que el tiempo del proceso sea de 10 minutos tal y como recomienda Bio-Rad y como ha sido evaluado en numerosos estudios^{47,80,113}.

5. ANÁLISIS DEL SISTEMA DE CAPTURA TIPO SANDWICH MEDIANTE LA TÉCNICA CLIA.

Una vez diseñado y desarrollado el sistema de captura tipo sandwich, este se evaluó con muestras reales en paralelo junto el kit de ELISA comercial. Se ensayaron los 30 sobrenadantes resultantes del tratamiento de sendas muestras de suero (Tabla 58).

Tabla 58. Ensayo captura tipo sandwich en técnica de CLIA y ELISA.

Muestra / Técnica	CLIA	Bio-Rad		
	RLU	DO	Índice	Interpretación
R-322-061	2,511	1,314	1,615	Positivo
R-322-053	1,019	1,214	1,492	Positivo
R-322-049	38,255	3,501	4,304	Positivo
R-322-045	1,132	0,745	0,916	Positivo
R-322-040	40,498	3,258	4,005	Positivo
R-322-025	0,91	0,651	0,8	Positivo

Muestra / Técnica	CLIA	Bio-Rad		
	RLU	DO	Índice	Interpretación
R-322-011	1,01	0,486	0,597	Positivo
R-322-006	1,105	0,688	0,846	Positivo
R-321-031	3,099	1,747	2,148	Positivo
R-321-054	1,044	0,662	0,814	Positivo
R-321-071	32,278	3,56	4,376	Positivo
R-321-079	6,791	1,539	1,892	Positivo
R-397-090	1,299	0,523	0,643	Positivo
R-397-096	0,359	0,243	0,299	Negativo
R-398-002	0,772	0,405	0,498	Negativo
R-397-077	0,249	0,06	0,074	Negativo
R-397-082	0,237	0,057	0,07	Negativo
R-291-043	0,227	0,068	0,084	Negativo
R-291-048	0,882	0,369	0,454	Negativo
R-291-050	0,196	0,083	0,102	Negativo
R-291-053	0,188	0,076	0,093	Negativo
R-291-056	0,241	0,053	0,065	Negativo
R-291-057	0,938	0,4	0,492	Negativo
R-288-050	0,653	0,26	0,32	Negativo
R-291-031	0,94	0,543	0,667	Positivo
R-291-035	0,355	0,159	0,195	Negativo
R-291-036	0,621	0,455	0,559	Positivo
R-291-040	0,422	0,187	0,23	Negativo
R-398-006	1,685	1,564	1,923	Positivo
R-321-085	37,993	4,432	5,448	Positivo

En la primera columna aparece representada la identificación de cada muestra, en la siguiente los valores RLU obtenidos para la técnica CLIA y a continuación, los valores DO e índices para la técnica ELISA. En último lugar, aparece la interpretación cualitativa de los resultados de Bio-Rad basándonos en el criterio de interpretación definido en las instrucciones del fabricante, índice $\geq 0,5$.

Volviendo a los resultados obtenidos y al análisis comparativo de la técnica CLIA frente a la clasificación cualitativa aportada por Bio-Rad, se obtuvo una curva ROC (Figura 74) donde el área debajo de la curva fue de 0,977 (Error estándar = 0,027 – 95% IC 0,844-0,992).

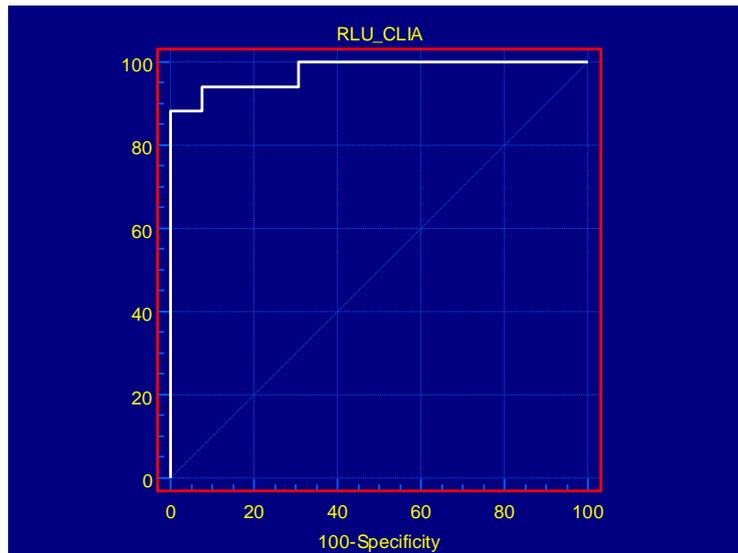


Figura 74. Curva ROC de estudio comparativo CLIA vs. ELISA.

Por otro lado, se muestra el diagrama de puntos interactivo (Figura 75) cuyo punto de corte óptimo (línea horizontal) aparece para un valor RLU de 0,9 para obtener una sensibilidad del 94,1% y una especificidad del 92,3%.

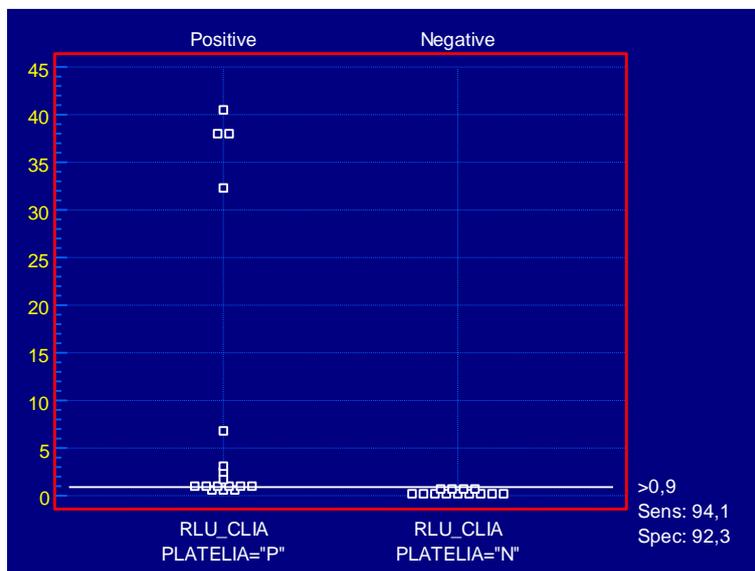


Figura 75. Diagrama de puntos interactivo del estudio comparativo CLIA vs. ELISA.

Y, por último, se presenta el conjunto de datos donde, para cada valor de punto de corte, se muestran los valores de sensibilidad, especificidad, -LR, +LR, PPV y NPV correspondientes (ANEXO I).

El análisis demostró que la técnica CLIA presentaba validez diagnóstica aportando una notable capacidad discriminativa.

Con el fin de analizar el grado de acuerdo entre ambas técnicas, se aplicó el coeficiente kappa de Cohen. Para ello se aplicó el punto de corte en cuanto a RLU que se había definido en el análisis ROC, es decir 0,9, y se consideran positivas las muestras con RLU superiores a dicho valor y negativas aquellas en las que el valor fue menor. Teniendo en cuenta esto y el criterio de interpretación de Bio-Rad (índice $\geq 0,5$), el cual se había usado para llevar a cabo el análisis ROC, se obtuvo una tabla de contingencia (Tabla 59) mediante la cual se llevó a cabo dicho cálculo.

Tabla 59. Distribución de muestras según su clasificación en cada técnica.

		Bio-Rad		
		Positivo	Negativo	Total
CLIA	Positivo	16	1	17
	Negativo	1	12	13
	Total	17	13	30

A través de la misma se obtuvo el valor del coeficiente kappa de Cohen, el error estándar y el rango de valores tomando un intervalo de confianza del 95%.

kappa =	0,864
Error estándar =	0,093
95% IC =	0,682 a 1,046

El valor obtenido para el conjunto de datos analizados, kappa = 0,864, indicó un grado de acuerdo o concordancia “*casi perfecta*” entre ambas técnicas (Tabla 60).

6. VALIDACIÓN DEL KIT POR LOS DIFERENTES SISTEMAS AUTOMATIZADOS.

6.1. ANÁLISIS DEL MÉTODO EN EL SISTEMA VIRCLIA®

Se definieron tres métodos para el desarrollo de la técnica, las diferencias entre ellos se basaban en el orden de dispensación de muestra y controles y en la cantidad de ciclos de lavado que se aplicaron sobre la punta que lleva a cabo el manejo de líquidos.

Tabla 60. Métodos VIRCLIA®.
(M: muestra; CAL: calibrador; CN: control negativo)

	AG_GM	AG_GM2	AG_GM3
ORDEN DISPENSACIÓN	M-CAL-CN	M-CAL-CN	CAL-CN-M
LAVADO	NORMAL	DOBLE	DOBLE

El orden de dispensación es el orden que siguió la punta para aspirar-dispensar cada reactivo en el pocillo A, destinado para el calibrador, pocillo B, destinado para la muestra y pocillo C, destinado para el control negativo. El orden reflejado se respetó para la dispensación de todos los reactivos contenidos en la monodosis los cuales son necesarios para que se lleve a cabo la reacción inmunológica completa. Por tanto, en el método AG_GM y AG_GM2, la dispensación fue en orden pocillo B/pocillo A/pocillo C; por otro lado, para el método AG_GM3, se modificó siendo pocillo A/pocillo C/pocillo B. En cuanto al proceso de lavado, el denominado "NORMAL" fue copiado exactamente de los métodos empleados para los kits de detección de anticuerpos. El denominado "DOBLE" consistió en contener el doble de ciclos de lavado que la condición tomada como referencia, "NORMAL".

En la Tabla 61 se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de estos tres métodos, haciendo 3 determinaciones de cada uno de ellos.

Tabla 61. Evaluación métodos en sistema VIRCLIA®.
(Columna 2 a 10: Valores RLU)

	AG_GM	AG_GM2	AG_GM3	AG_GM	AG_GM2	AG_GM3	AG_GM	AG_GM2	AG_GM3	AG_GM CV (%)	AG_GM2 CV (%)	AG_GM3 CV (%)
Calibrador	4,78	3,88	4,86	4,17	4,15	4,35	4,67	3,86	3,22	7,16	4,08	20,22
Ag <13kDa 0,5µg/ml	5,07	4,77	4,54	4,42	4,82	4,53	4,55	4,67	4,64	7,38	1,53	1,30
Control negativo	0,25	0,24	0,19	0,23	0,23	0,22	0,26	0,22	0,30	5,64	4,31	23,35

Los valores CV hacen destacar, por su mínima variabilidad, el método denominado AG_GM2. Los valores de CV fueron inferiores, tanto para el calibrador, como para la muestra control negativo, que los que se obtuvieron por parte de los otros dos métodos.

6.2. ANÁLISIS DEL MÉTODO NORMAL Y DEL MÉTODO SIN AGITACIÓN EN EL SISTEMA VIRCLIA®

Una vez definido el orden de dispensación de reactivos y del proceso de lavado de la punta, se llevó a cabo el análisis del método con y sin agitación. Para ello, se ensayó en primer lugar el calibrador. 24 monodosis fueron dispuestas en el sistema, para cubrir todas las posiciones, y se empleó el test AG_GM2 normal (con agitación); a continuación, sobre el mismo instrumento, para evitar la variabilidad que pudiera existir debida al mismo, se volvieron a montar otras 24 monodosis donde se empleó el test AG_GM2 sin agitación.

Los resultados, expresados en RLU, así como los valores obtenidos de CV (%) se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 62. Evaluación método AG_GM2 normal y sin agitación.
(RLU CAL: RLU Calibrador)

	AG_GM2 sin agitación	AG_GM2 normal
	RLU CAL	RLU CAL
Réplica 1	3,258	6,036
Réplica 2	3,617	5,352
Réplica 3	3,888	5,419
Réplica 4	3,888	5,802
Réplica 5	4,320	5,266
Réplica 6	3,882	5,466
Réplica 7	4,091	5,392
Réplica 8	4,486	4,338
Réplica 9	4,279	6,010
Réplica 10	3,921	5,788
Réplica 11	3,760	5,034
Réplica 12	3,743	4,512
Réplica 13	4,359	4,242
Réplica 14	4,734	3,992
Réplica 15	3,949	4,230
Réplica 16	4,514	4,199
Réplica 17	4,673	4,087
Réplica 18	4,211	4,062
Réplica 19	4,594	3,635
Réplica 20	4,951	3,352
Réplica 21	4,640	3,395
Réplica 22	4,870	3,232
Réplica 23	4,752	3,160
Réplica 24	4,823	3,312
Promedio	4,3	4,6
CV (%)	10,7	21,0

Se obtuvo un promedio de RLU similar para ambos métodos y un coeficiente de variación en torno al doble con el método AG_GM2 normal. Basándonos en los valores RLU obtenidos en las primeras réplicas del ensayo y en las últimas, se apreció un fenómeno de deriva en el método AG_GM2 normal que se corrigió cuando se eliminó la agitación (Tabla 62). La diferencia de señal entre la primera posición respecto a la última para el test AG_GM2 normal estuvo en 2,72 frente a 1,57 aportado por el test AG_GM2 sin agitación.

La tendencia del calibrador en el test AG_GM2 normal presentó una deriva marcada empezando en valor RLU 6 y terminando en torno a RLU 3 en la última posición del ensayo. En cuanto al test sin agitación, la tendencia fue más estable, como muestra el valor CV (%), y se apreció ligeramente cierta contraderiva (Figura 76).

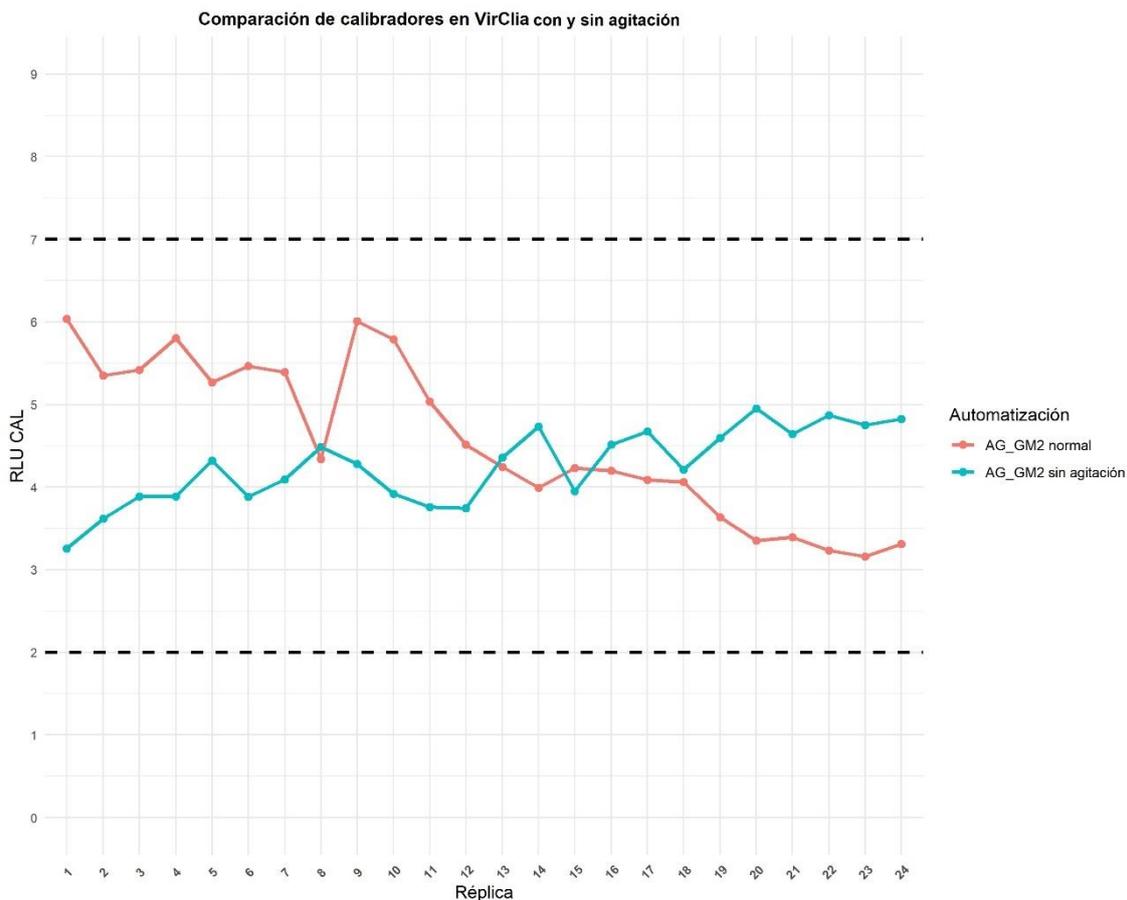


Figura 76. Tendencia calibrador por los métodos AG_GM2 normal y sin agitación.

A continuación, se compararon ambos métodos con dos muestras reales, una negativa y otra positiva, con RLU en torno al punto de corte de la técnica, según la curva ROC realizada anteriormente en el ensayo manual (muestra A-90-030 cuyo índice aparece señalado en rojo en la Tabla 63). Esto se llevó a cabo con el objetivo de analizar los valores normalizados de índice para cada una de ellas en ambos métodos para garantizar que la clasificación cualitativa de las mismas no fuera dependiente del tipo de método que se emplee. Las dos mismas muestras se dispusieron en diferentes posiciones del instrumento cubriendo las posiciones de la 1 a la 24.

Tabla 63. Evaluación del método AG_GM2 normal y sin agitación con muestras reales. (Valores RLU Cal: RLU calibrador; RLU Muestra e índice)

Alícuota	Posición	AG_GM2 sin agitación			AG_GM2 normal		
		RLU Cal	RLU Muestra	Índice	RLU Cal	RLU Muestra	Índice
A-83-040	Posición 1	3,567	0,222	0,062	5,057	0,148	0,029
A-90-030	Posición 2	3,497	1,020	0,292	5,273	1,212	0,230
A-83-040	Posición 12	3,676	0,146	0,04	3,989	0,114	0,029
A-90-030	Posición 13	3,314	1,116	0,337	3,860	1,091	0,283
A-83-040	Posición 23	4,186	0,136	0,033	2,958	0,094	0,032
A-90-030	Posición 24	4,633	1,364	0,294	2,767	0,938	0,339

No se observó cambio en la interpretación cualitativa de las muestras, por tanto, esta no dependía del método ni de la posición donde se llevó a cabo su montaje. En esta experiencia se observó, al igual que en la anterior, la notable deriva aportada por el test normal y la ligera contraderiva del test sin agitación. También merece la pena destacar que, el fenómeno de deriva fue más acentuado en el calibrador que en la muestra positiva evaluada en el test AG_GM2 normal, pero esto no influyó en la clasificación de la misma (Tabla 63).

El valor $R^2=0,969$ obtenido en la Figura 77 muestra una buena correlación entre ambos métodos.

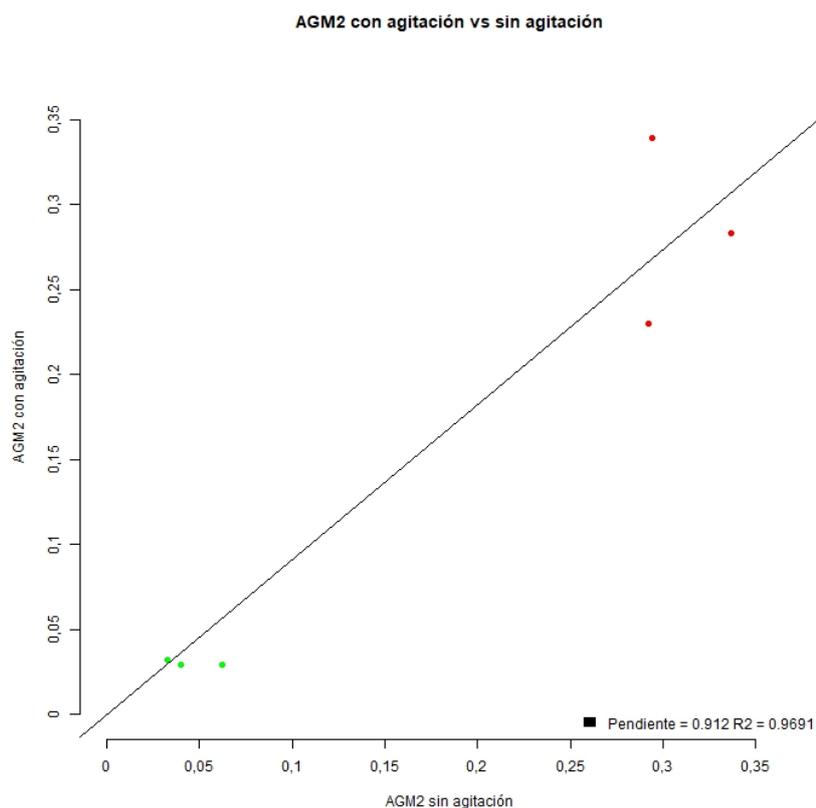


Figura 77. Correlación valores índice de muestras reales evaluadas por método AG_GM2 normal y sin agitación.

(Las muestras negativas son representadas a través de puntos de color verde y muestras positivas son representadas a través de puntos de color rojo)

Tras obtener resultados favorables en el ensayo anterior, se ensayaron ambos métodos con un mayor número de muestras (N=81). Cada muestra, fue montada en el mismo sistema automatizado y en la misma posición en ambos métodos para evitar así la variabilidad aportada intraensayo e interensayo, los resultados obtenidos son referidos en la Tabla 64.

Tabla 64. Evaluación del método AG_GM2 normal (N) y sin agitación (SA) con muestras reales. (N=81) (Valores RLU Cal: RLU calibrador; RLU Muestra e índice; Muestras negativas señaladas en verde y muestras positivas señaladas en rojo)

Alícuota	AG_GM2 Sin agitación (SA)			AG_GM2 normal (N)		
	RLU Cal SA	RLU Muestra SA	Índice SA	RLU Cal N	RLU Muestra N	Índice N
A-83-007	3,786	0,195	0,051	4,899	0,138	0,028
A-83-008	3,300	0,127	0,039	4,781	0,094	0,020
A-83-009	3,490	0,108	0,031	4,767	0,085	0,018
A-83-010	3,322	0,155	0,047	4,655	0,170	0,036
A-83-011	3,209	0,101	0,032	4,221	0,069	0,016
A-83-012	3,360	0,126	0,037	4,294	0,068	0,016
A-83-013	3,206	0,119	0,037	4,518	0,072	0,016
A-83-014	2,863	0,125	0,044	4,247	0,071	0,017
A-83-015	3,099	0,105	0,034	4,159	0,063	0,015
A-83-016	2,670	0,098	0,037	3,954	0,058	0,015
A-83-017	3,265	0,119	0,036	3,660	0,064	0,018
A-83-018	3,065	0,110	0,036	3,326	0,057	0,017
A-83-019	3,536	0,112	0,032	3,532	0,066	0,019
A-83-020	3,828	0,503	0,131	3,329	0,508	0,153
A-83-021	3,508	0,111	0,032	3,185	0,079	0,025
A-83-022	4,027	0,139	0,034	2,986	0,062	0,021
A-83-023	4,071	2,802	0,688	3,115	3,038	0,975
A-83-024	4,496	0,112	0,025	2,796	0,066	0,024
A-83-025	3,741	0,154	0,041	2,699	0,088	0,033
A-83-026	4,225	0,106	0,025	2,751	0,065	0,024
A-83-027	4,001	0,101	0,025	2,538	0,072	0,028
A-83-028	4,330	0,119	0,027	2,754	0,068	0,025
A-83-029	4,610	1,145	0,248	2,529	0,740	0,293
A-83-030	5,189	0,106	0,020	2,412	0,065	0,027
A-83-031	3,983	0,119	0,030	5,379	0,082	0,015
A-83-032	4,168	0,155	0,037	5,035	0,081	0,016
A-83-033	3,832	8,971	2,341	5,338	15,049	2,819
A-83-034	3,895	5,470	1,404	5,328	9,294	1,744
A-83-035	3,683	0,117	0,032	4,957	0,073	0,015
A-83-036	3,574	0,129	0,036	4,788	0,105	0,022
A-83-037	3,291	0,111	0,034	5,812	0,108	0,019
A-83-038	3,804	0,119	0,031	4,834	0,071	0,015
A-83-039	3,823	0,114	0,030	4,395	0,074	0,017
A-83-040	4,318	0,110	0,025	4,183	0,071	0,017
A-83-041	3,754	0,105	0,028	3,901	0,086	0,022
A-83-042	3,929	0,128	0,033	4,231	0,067	0,016
A-83-043	4,192	0,099	0,024	3,729	0,079	0,021
A-83-044	3,959	0,114	0,029	3,717	0,069	0,019
A-83-045	3,999	0,123	0,031	3,510	0,066	0,019
A-83-046	4,322	0,092	0,021	3,451	0,086	0,025
A-83-047	4,142	6,036	1,457	3,208	5,685	1,772

RESULTADOS

Alícuota	AG_GM2 Sin agitación (SA)			AG_GM2 normal (N)		
	RLU Cal SA	RLU Muestra SA	Índice SA	RLU Cal N	RLU Muestra N	Índice N
A-83-049	4,876	0,131	0,027	2,853	0,063	0,022
A-83-050	4,294	0,095	0,022	2,853	0,069	0,024
A-83-051	5,094	0,147	0,029	2,575	0,077	0,030
A-83-052	4,934	0,084	0,017	2,493	0,078	0,031
A-83-053	4,429	0,146	0,033	2,452	0,075	0,031
A-83-054	4,616	0,090	0,020	2,320	0,068	0,029
A-109-076	3,368	0,274	0,081	4,943	0,175	0,035
A-109-092	3,831	0,196	0,051	5,213	0,111	0,021
A-109-093	3,740	0,156	0,042	4,813	0,107	0,022
A-109-095	3,598	0,191	0,053	4,796	0,143	0,030
A-110-001	3,277	0,096	0,029	4,781	0,106	0,022
A-110-005	3,615	0,110	0,030	4,469	0,076	0,017
A-120-023	3,186	0,131	0,041	4,173	0,090	0,022
A-122-021	3,372	0,124	0,037	4,059	0,069	0,017
A-120-027	4,039	0,195	0,048	3,966	0,146	0,037
A-122-027	3,474	0,169	0,049	3,857	0,086	0,022
A-122-029	3,528	0,103	0,029	3,453	0,070	0,020
A-122-025	3,369	0,195	0,058	3,548	0,124	0,035
A-122-023	4,405	0,239	0,054	2,740	0,199	0,073
A-120-043	3,428	0,196	0,057	2,701	0,177	0,066
A-109-078	3,638	4,843	1,331	2,664	2,838	1,065
A-120-097	3,708	0,148	0,040	2,683	0,121	0,045
A-122-031	3,840	12,441	3,240	2,624	6,691	2,550
A-122-033	3,754	4,262	1,135	4,947	5,009	1,012
A-122-035	4,202	22,645	5,389	4,859	23,102	4,754
A-120-025	3,966	1,117	0,282	5,012	1,624	0,324
A-109-097	3,900	0,540	0,138	4,513	0,691	0,153
A-121-057	4,593	1,303	0,284	4,122	1,293	0,314
A-121-030	3,989	18,521	4,643	4,381	17,249	3,937
A-121-012	3,882	1,690	0,435	4,013	1,768	0,441
A-120-092	4,189	5,725	1,367	3,929	5,903	1,502
A-120-088	4,219	4,676	1,108	3,830	3,387	0,884
A-120-078	4,005	3,079	0,769	3,532	3,097	0,877
A-120-074	4,829	1,971	0,408	3,516	1,608	0,457
A-120-066	4,023	3,883	0,965	3,256	3,892	1,196
A-90-026	4,655	0,128	0,027	3,134	0,095	0,030
A-90-027	4,321	17,336	4,012	3,184	9,958	3,128
A-90-028	3,995	2,586	0,647	3,088	1,618	0,524
A-90-029	3,823	0,137	0,036	2,817	0,089	0,032
A-90-030	4,767	1,137	0,238	2,763	0,629	0,228
Promedio	3,897	-	-	3,800	-	-
CV (%)	13,23	-	-	23,77	-	-

El promedio de RLU del calibrador fue similar para ambos métodos y el CV indicó una diferencia de 10 puntos con respecto a la condición sin agitación. De las 21 muestras positivas evaluadas, no existió modificación en el criterio de interpretación cualitativa para ninguna de ellas incluso en aquellas cuya positividad rondaba el punto de corte de la técnica (Tabla 64).

El gráfico de líneas que se muestra a continuación muestra la tendencia de deriva en la RLU del calibrador para el test normal (RLU Cal N) donde en cada ciclo de 24 monodosis se apreció cómo experimentaba caída respecto a la posición inicial de cada corrida. La RLU del calibrador del método sin agitación (RLU Cal SA) presentó cierta contraderiva pero guardó mayor estabilidad (Figura 78).

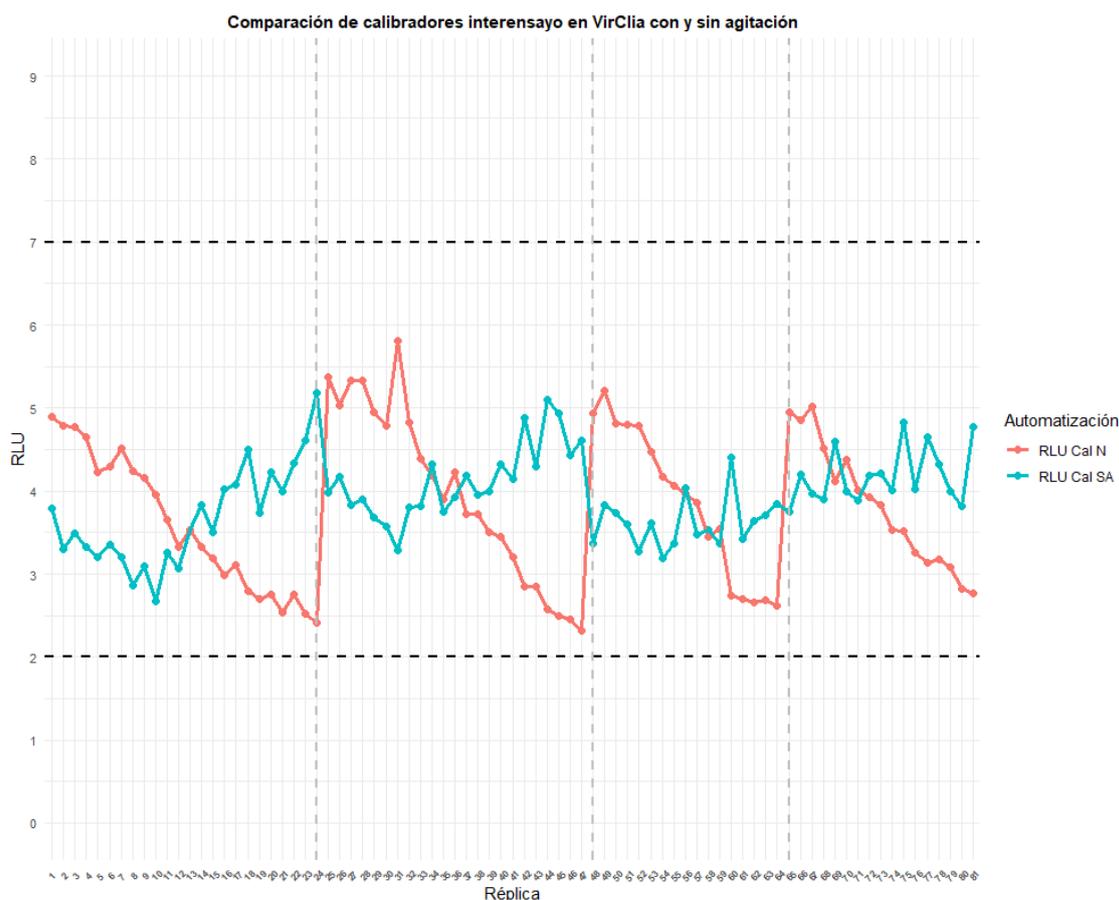


Figura 78. Tendencia calibrador para ambos métodos en sistema VIRCLIA®.

En cuanto a la interpretación de las muestras, basada en los valores de índice, no se observó modificación debida al método. La tendencia de los valores índice presentaba elevada analogía y se presentó como líneas prácticamente superpuestas en la totalidad de las muestras. Solo en 4 de ellas, las cuales presentan valores saturados de índice, donde no está comprometida la sensibilidad, se apreció una ligera diferencia (muestras nº 64, 66, 70, 78). La correlación de los valores índice mostró una elevada similitud entre ambos métodos estando el valor R^2 en 0,977 (Figura 79).

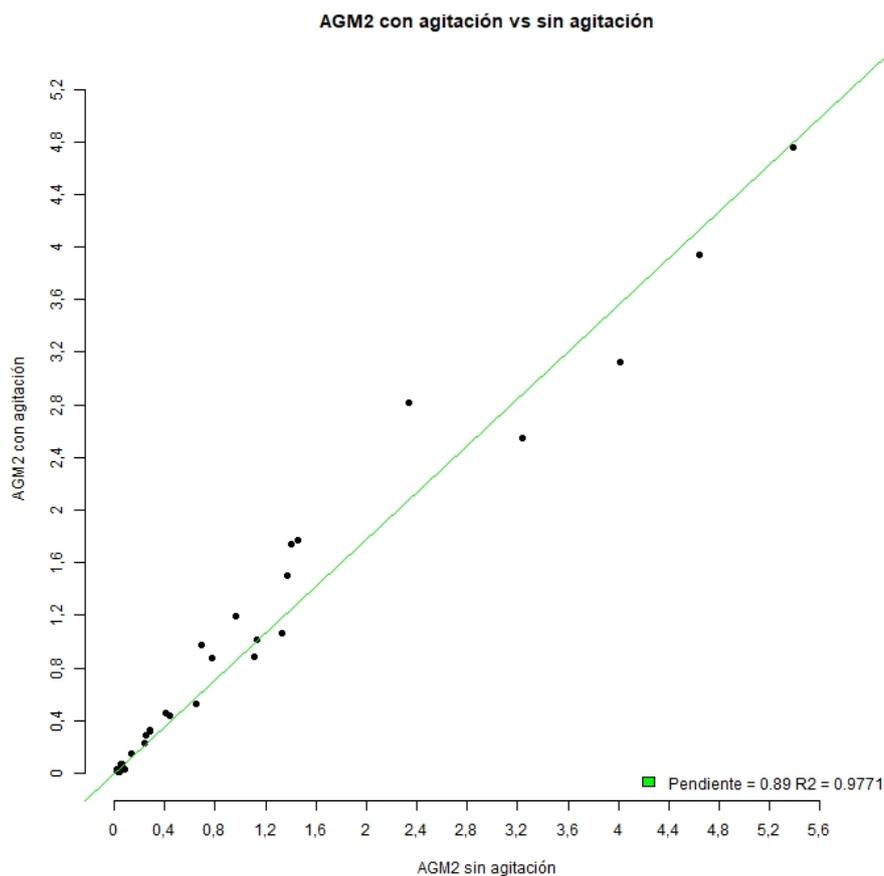


Figura 79. Correlación valores índice de muestras para ambos métodos en sistema VIRCLIA®.

6.3. ANÁLISIS DEL MÉTODO EN EL SISTEMA VIRCLIA® PLUS CON RESPECTO AL VIRCLIA®.

En el caso de VIRCLIA® PLUS, los valores RLU obtenidos se presentan en otra escala debido al tipo de unidades que aporta el lector y al tipo de software que procesa dichos resultados.

Muestras caracterizadas como negativas y positivas (las muestras señaladas en verde corresponden a muestras negativas y en rojo corresponden a muestras positivas) se ensayaron en VIRCLIA® PLUS y VIRCLIA® en paralelo y se analizaron los valores índices obtenidos. La normalización de los resultados RLU mediante el cálculo de los valores de índice hace que, aunque la escala de resultados sea distinta entre ambos instrumentos, dichos valores sean similares y comparables. La Tabla 65 presenta la evaluación de ambos métodos.

Tabla 65. Evaluación del método AG_GM2 sin agitación VIRCLIA® y del método para VIRCLIA® PLUS con muestras reales.

(Muestras negativas señaladas en verde y muestras positivas señaladas en rojo)

Alícuota	AG_GM2 VIRCLIA®			VIRCLIA® PLUS		
	RLU Cal	RLU Muestra	Índice	RLU Cal	RLU Muestra	Índice
A-83-045	3,88	0,23	0,06	281466,5	5915,7	0,02
A-83-046	3,09	0,12	0,04	236352,9	6287,4	0,03
A-83-047	3,19	0,11	0,04	247190,3	7493,5	0,03
A-83-048	4,42	0,1	0,02	227161,2	8593,9	0,04
A-90-027	2,96	16,17	5,46	230443,5	725098,5	3,15
A-120-066	3,69	2,25	0,61	224769,3	193769,1	0,86
A-90-026	3,61	0,31	0,09	236573,4	22542,1	0,1
A-120-074	3,17	2,15	0,68	227653,3	134771,7	0,59
A-122-031	3,58	14,84	4,15	225899,1	711322,5	3,15
A-120-092	3,88	7,73	1,99	223338,5	441604,8	1,98
A-120-088	4,13	4,07	0,98	212130,1	242048,1	1,14
A-90-029	3,84	0,09	0,02	247971,5	5936,7	0,02
Promedio	3,62	-	-	235079,13	-	-
CV (%)	12,32	-	-	7,55	-	-

El coeficiente de variación obtenido por el método diseñado para VIRCLIA® PLUS fue más favorable aún que el de no agitación para VIRCLIA®. En cuanto a la interpretación cualitativa de las muestras, ninguna presentaba modificación en la misma independientemente del sistema que se empleó. Se observó que, a mayores valores RLU e índices, el sistema VIRCLIA® presentaba mayor amplitud de lectura por lo que dichos valores fueron más altos que en el sistema VIRCLIA® PLUS. De todos modos, esto no afectó en la clasificación ya que se trataba de muestras sobradamente positivas. El nivel de similitud en índices no saturados, guardó mayor correlación entre ambos. La comparación global entre ambos instrumentos muestra una correlación en $R^2 = 0,952$ (Figura 80). La pendiente de la recta indica lo descrito en el párrafo anterior, el fenómeno de la saturación del sistema. Se obtuvieron lecturas más altas en el sistema VIRCLIA® respecto a VIRCLIA® PLUS, lo que se tradujo en valores índice más elevados.

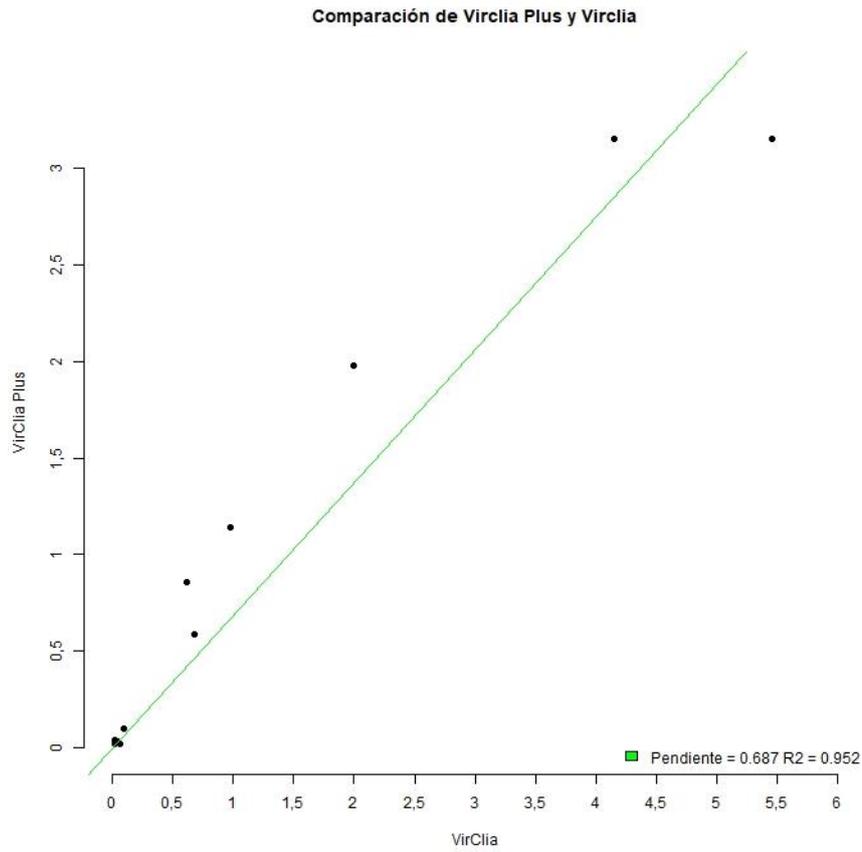


Figura 80. Correlación entre valores índice en el sistema VIRCLIA® y VIRCLIA® PLUS.

La tendencia del calibrador mostró estabilidad y no se apreció el fenómeno de deriva en el sistema VIRCLIA® PLUS (Figura 81). Los valores se expresaron en la escala de 100.000, reflejándose en la gráfica como 100K.

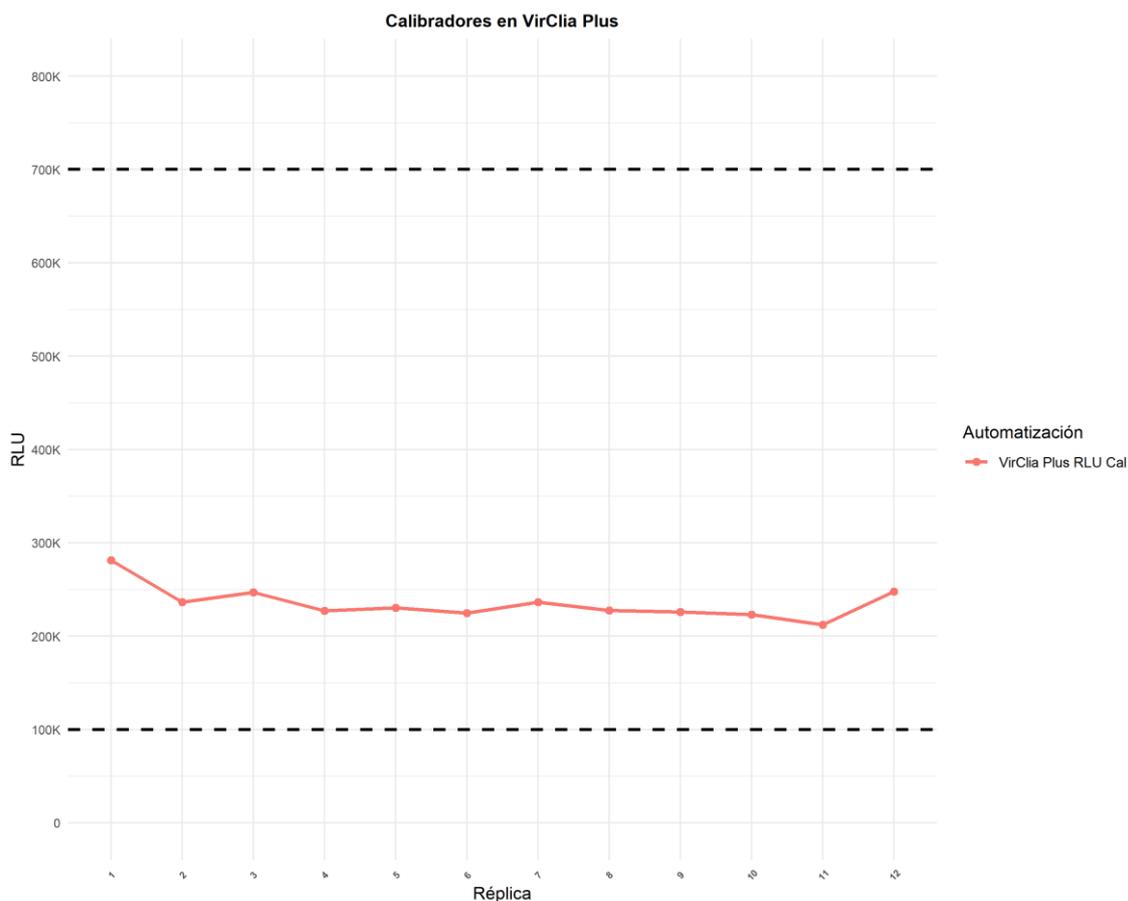


Figura 81. Tendencia calibrador para método en sistema VIRCLIA® PLUS.

6.4. ANÁLISIS DEL MÉTODO EN EL SISTEMA VIRCLIA® LOTUS CON RESPECTO AL VIRCLIA®.

Muestras caracterizadas como negativas y positivas fueron evaluadas en paralelo en ambos sistemas, se analizaron los valores índices obtenidos mediante correlación, así como la tendencia que siguieron los calibradores. Para cada muestra se presenta su valor RLU, su valor índice y el valor RLU de calibrador resultante en dicha monodosis (Tabla 66).

Tabla 66. Evaluación del método AG_GM2 sin agitación VIRCLIA® y del método para VIRCLIA® LOTUS con muestras reales.

Alícuota	AG_GM2 VIRCLIA®			VIRCLIA® LOTUS		
	RLU Cal	RLU Muestra	Índice	RLU Cal	RLU Muestra	Índice
A-83-007	5,39	0,11	0,02	6,53	0,10	0,02
A-83-008	4,89	0,21	0,04	5,52	0,17	0,03
A-83-009	4,51	0,31	0,07	6,38	1,52	0,24
A-83-010	4,48	0,07	0,02	6,21	0,09	0,01
A-83-011	4,26	0,15	0,03	5,94	0,11	0,02
A-83-012	3,96	0,09	0,02	5,56	0,09	0,02

Alícuota	AG_GM2 VIRCLIA®			VIRCLIA® LOTUS		
	RLU Cal	RLU Muestra	Índice	RLU Cal	RLU Muestra	Índice
A-83-013	3,96	0,10	0,02	5,55	0,11	0,02
A-83-014	3,71	0,07	0,02	6,41	0,11	0,02
A-83-015	3,83	0,07	0,02	5,38	0,09	0,02
A-83-016	3,89	0,09	0,02	5,72	0,10	0,02
A-83-017	3,24	0,10	0,03	6,16	0,15	0,03
A-83-018	3,34	0,08	0,02	5,48	0,14	0,03
A-83-019	5,46	0,07	0,01	5,67	0,09	0,02
A-83-020	5,10	2,27	0,45	6,07	2,64	0,44
A-83-021	4,38	0,07	0,02	5,23	0,12	0,02
A-122-031	6,94	31,11	4,49	5,59	20,24	3,62
A-122-033	6,86	13,43	1,96	5,24	11,09	2,12
A-122-035	5,70	51,60	9,05	5,90	32,30	5,47
A-120-025	5,80	4,26	0,74	5,60	6,18	1,10
A-121-057	4,98	4,12	0,83	5,35	4,83	0,90
A-121-030	5,61	62,63	11,17	6,15	40,56	6,60
A-121-012	5,20	6,87	1,32	6,71	7,51	1,12
A-120-092	4,67	19,49	4,18	6,25	17,50	2,80
A-120-088	4,52	12,39	2,74	6,46	12,64	1,96
A-120-078	4,73	10,60	2,24	5,43	8,46	1,56
A-120-074	4,10	5,63	1,37	5,58	6,78	1,21
A-120-066	5,90	6,73	1,14	4,35	8,62	1,98
A-90-026	4,93	0,09	0,02	5,69	0,17	0,03
A-90-027	5,18	35,80	6,92	5,26	25,19	4,79
A-90-028	5,60	5,32	0,95	5,24	6,04	1,15
A-90-029	4,76	11,04	2,32	4,81	11,34	2,36
A-90-030	4,59	2,66	0,58	5,12	3,24	0,63
Promedio	4,83	-	-	5,70	-	-
CV (%)	18,44	-	-	9,29	-	-

El coeficiente de variación aportado por el calibrador en VIRCLIA® LOTUS fue menor que el que se presentó en el sistema VIRCLIA®. En cuanto a la clasificación cualitativa de las muestras, ninguna cambió su interpretación al cambiar de instrumento y/o método. Se notifican resultados RLU e índices más elevados en determinadas muestras en el sistema VIRCLIA debido a su mayor amplitud de lectura. El sistema VIRCLIA® LOTUS, al igual que ocurre en VIRCLIA® PLUS, satura a valores RLU más bajos por lo que en muestras con RLU elevadas se notifica mayor diferencia.

La tendencia que siguieron los valores índices en ambos instrumentos mostró analogía excepto en aquellas muestras descritas anteriormente donde los valores RLU y, por tanto, valores índices eran más elevados por la amplitud de rango en el sistema VIRCLIA®. En cuanto al valor R^2 , indica una buena correlación entre ambos ($R^2 = 0,963$). El valor de la pendiente, $y=0,6576$, indica lo descrito en cuanto a valores saturados de índice donde las muestras A-122-031, A-122-035, A-121-030, A-120-092 y A-90-027 son las que inclinan la recta hacia el lado de VIRCLIA® (Figura 82).

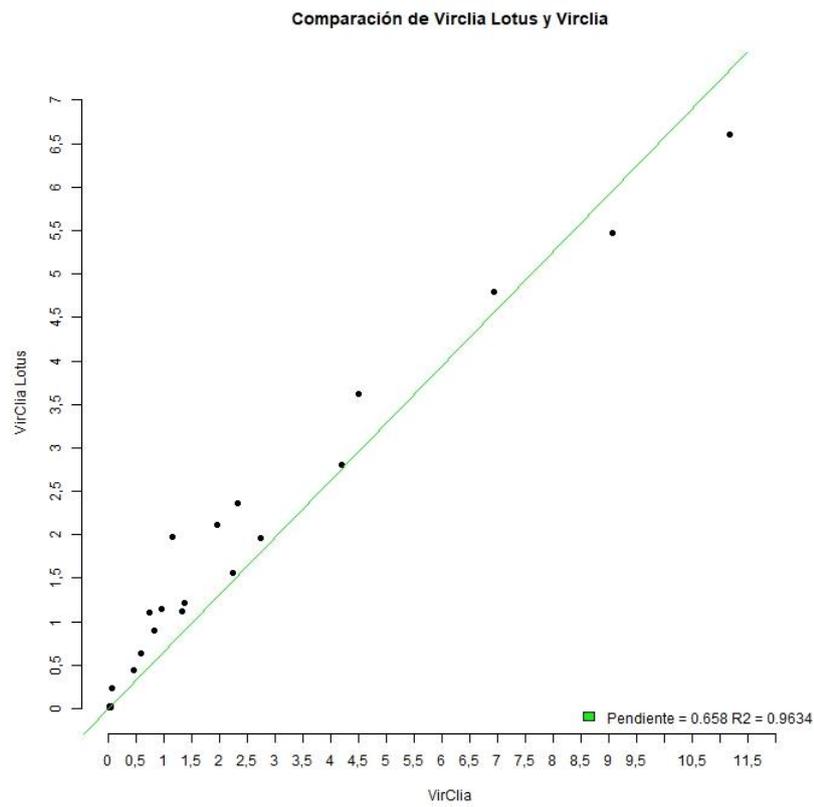


Figura 82. Correlación entre valores índice en el sistema VIRCLIA® y VIRCLIA® LOTUS.

La tendencia seguida por el calibrador en VIRCLIA® LOTUS mostró estabilidad y no existió fenómeno de deriva (Figura 83).

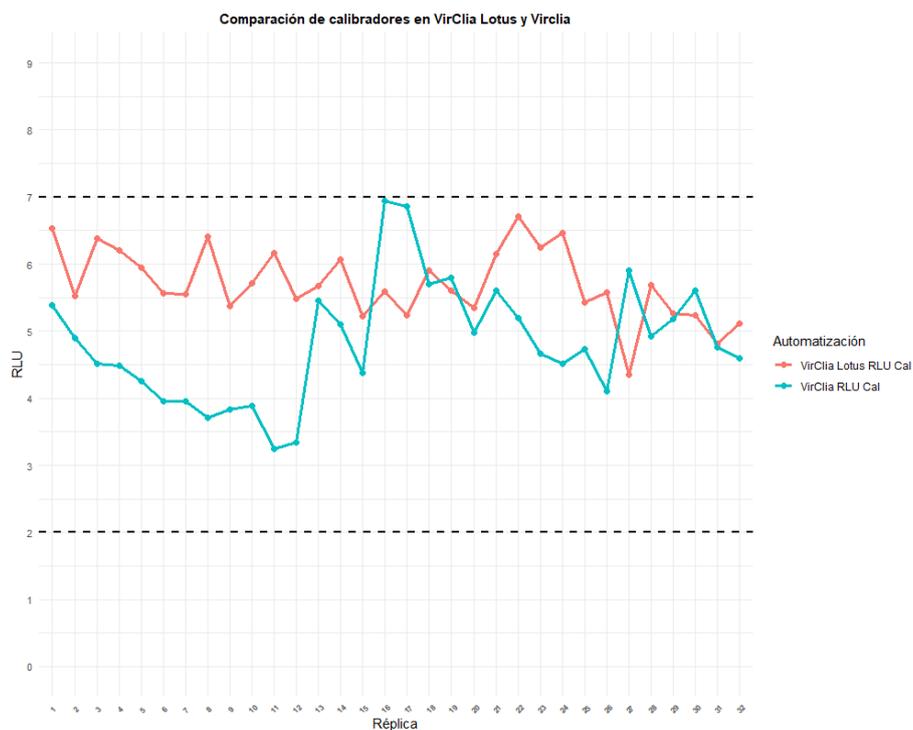


Figura 83. Tendencia calibrador para método en sistema VIRCLIA® y VIRCLIA® LOTUS.

6.5. COMPARACIÓN DE LOS TRES SISTEMAS AUTOMATIZADOS EN PARALELO.

Un panel, compuesto por muestras negativas y positivas dispuestas de manera intercalada, fue montado por los tres sistemas en paralelo. Se analizaron los valores RLU e índices aportados por las muestras y se observó que no existía modificación en la clasificación cualitativa en ninguna de ellas (Tabla 67).

Tabla 67. Comparación de los tres sistemas automatizados.

Muestra	VIRCLIA®		VIRCLIA® LOTUS		VIRCLIA® PLUS	
	RLU	Índice	RLU	Índice	RLU	Índice
8325132	3,970	1,037	6,249	1,197	355641,3	1,045
8325133	0,086	0,022	0,062	0,013	13627,6	0,058
8325169	48,193	11,018	27,663	5,931	2243789,1	8,159
8395806	0,068	0,017	0,07	0,014	13964,3	0,046
8325832	3,825	1,007	4,962	1,055	239393,7	0,907
8328427	21,834	5,096	18,984	4,062	1221546,2	4,509
8395776	0,068	0,020	0,099	0,022	16049,6	0,060
8325137	42,592	10,209	24,687	5,801	1969927,4	6,480
8325798	0,305	0,073	0,627	0,138	44666,3	0,136
8325803	0,131	0,029	0,23	0,048	17974,6	0,058
8328441	1,261	0,265	2,494	0,559	129959,2	0,528
8325858	0,131	0,034	0,063	0,011	11304,3	0,036
8328450	0,178	0,037	0,061	0,013	13128,5	0,039
8325148	3,720	0,741	6,022	1,428	313439,7	1,065
8325159	0,825	0,181	0,814	0,175	69015,8	0,173
8395782	8,770	2,284	11,445	2,519	729890,7	2,295
8325139	0,160	0,046	0,071	0,016	17644,2	0,057
8395808	1,102	0,288	1,473	0,35	83997,2	0,294
8328398	26,528	6,630	20,616	4,356	2034248,3	6,438
8325836	0,125	0,032	0,05	0,012	17869,6	0,058
8328436	1,429	0,326	3,707	0,824	294207,9	0,977
8395783	0,104	0,025	0,055	0,011	13985,3	0,038
8395461	0,127	0,029	0,078	0,019	16021,6	0,054
8325854	9,181	2,324	11,112	2,894	860220,2	2,878

Los índices de las muestras clasificadas como negativas se señalan en negro, las muestras dudosas en verde y las muestras positivas en rojo (Tabla 67). Existió una buena correlación entre los sistemas, obteniéndose un $R^2 \geq 0,9$, analizando los valores normalizados de índice (Figura 84, 85 y 86).

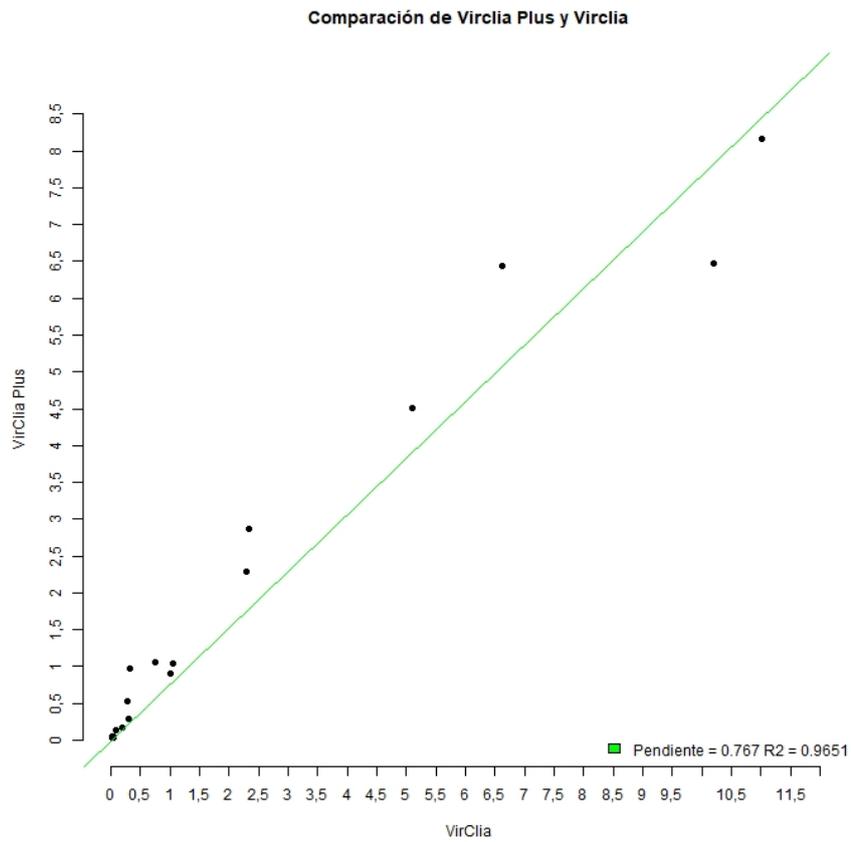


Figura 84. Correlación de los sistemas VIRCLIA® PLUS y VIRCLIA®.

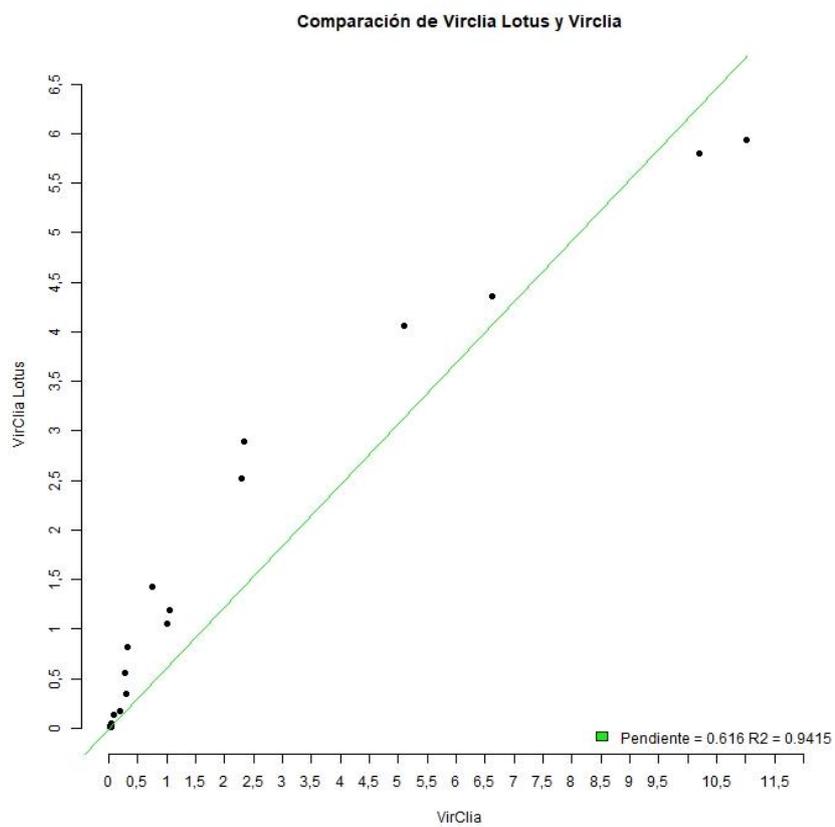


Figura 85. Correlación de los sistemas VIRCLIA® LOTUS y VIRCLIA®.

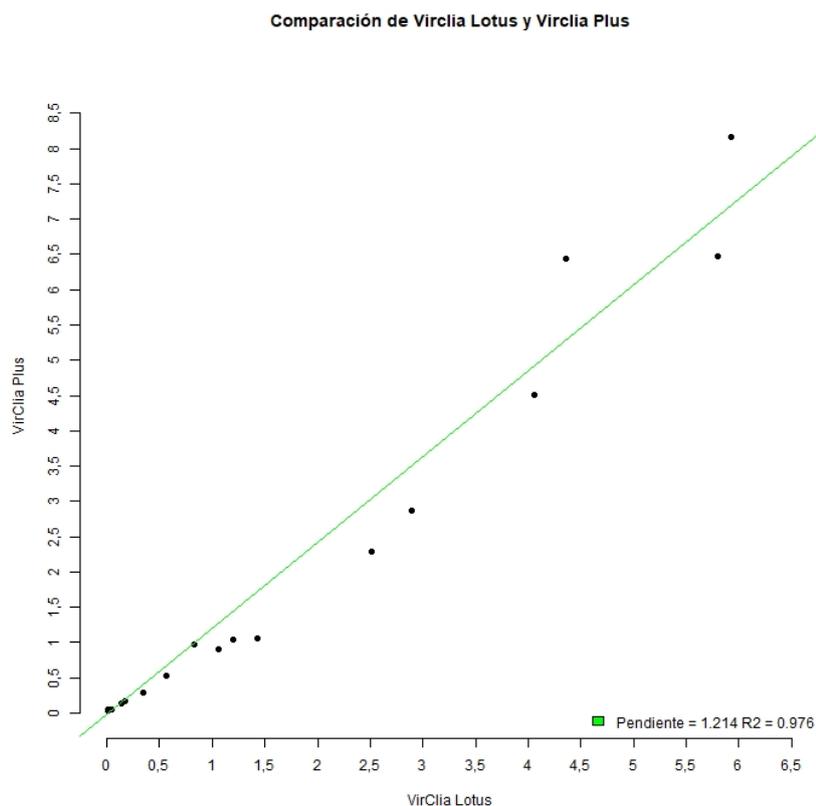


Figura 86. Correlación de los sistemas VIRCLIA® PLUS y VIRCLIA® LOTUS.

El test Wilcoxon reflejó que no existían diferencias significativas entre los tres sistemas automatizados (VIRCLIA® vs. VIRCLIA® LOTUS p-valor=0,9664; VIRCLIA® vs. VIRCLIA® PLUS p-valor=0,2087; VIRCLIA® LOTUS vs. VIRCLIA® PLUS p-valor=0,1747).

Se concluye que los tres instrumentos son válidos para el montaje del kit de Virclia desarrollado y, en cuanto al sistema VIRCLIA®, se recomienda que, cuando sea un número de muestras reducido, se emplee el método AG_GM2 normal ya que este es compatible con el resto de referencias, las cuales presentan agitación de manera común en sus métodos. De este modo, se puede proceder a su montaje de manera urgente por la compatibilidad del método con el resto de parámetros que se vayan a evaluar. Tal y como está definido el método, en caso de montaje de un número reducido de muestras, estas irán dispuestas en las primeras posiciones del instrumento, de tal manera que los valores RLU no se vean afectados por la deriva. Si, por el contrario, se prevé montar ensayos completos, con 24 tiras, se recomienda el uso del método AG_GM2 sin agitación, eliminando así el fenómeno de deriva aportado por la agitación para garantizar la homogeneidad en el calibrador y, por tanto, valores normalizados de índice adecuados en todas las posiciones. En cuanto al valor de RLU del calibrador, en todos los sistemas y por todos los métodos definidos se ha conseguido cumplir con la especificación establecida de obtener un $CV \leq 20\%$.

7. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO Y FUNCIONAMIENTO ANALÍTICO.

7.1. RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO.

Se puso en marcha un estudio interno con el objetivo de analizar el funcionamiento y rendimiento analítico del kit desarrollado en su formato de monodosis. Para ello se ensayaron muestras de diferente naturaleza hacia las que se dirige este kit de diagnóstico.

El estudio se llevó a cabo en paralelo en la técnica de CLIA y en la técnica ELISA, y se usaron todos los componentes presentes en cada uno de los kits. Una vez obtenidos los valores de DO para la técnica ELISA y los valores de RLU para la técnica CLIA, se trabajó con los valores de índice para el análisis ya que estos muestran normalización según el valor obtenido por el control de la técnica.

Clasificadas las muestras cualitativamente para el kit de ELISA empleado como referencia, se llevó a cabo un análisis ROC que estableció el punto de corte del kit desarrollado de VirClia, y se calculó la clasificación cualitativa para dicho kit.

Se ensayaron un total de 518 muestras, conjunto muestral que se dividió según la naturaleza de la matriz en: 206 lavados broncoalveolares (LBA), 289 sueros y 23 plasmas. Los resultados brutos del estudio, así como la clasificación diagnóstica para cada tipo de muestra según el criterio de interpretación de Bio-Rad y del definido para el nuevo kit desarrollado, se muestran en el ANEXO II.

Con el kit de ELISA empleado como referencia se obtuvieron 217 positivos y 301 negativos. El área debajo de la curva (AUC) indicaba que el kit en evaluación presentaba un óptimo rendimiento diagnóstico con un valor de 0,944 (Error estándar = 0,011 – 95% IC = 0,920 – 0,962) (Figura 87). Según la clasificación del kit de ELISA y los valores índices del kit de CLIA, la curva ROC mostró que el equilibrio óptimo entre verdaderos positivos y falsos positivos estaba en un índice $\geq 0,2$. Se obtuvo una sensibilidad del 82,5% y una especificidad del 92% (Figura 88). Los datos brutos obtenidos en el presente análisis se muestran en el ANEXO III.

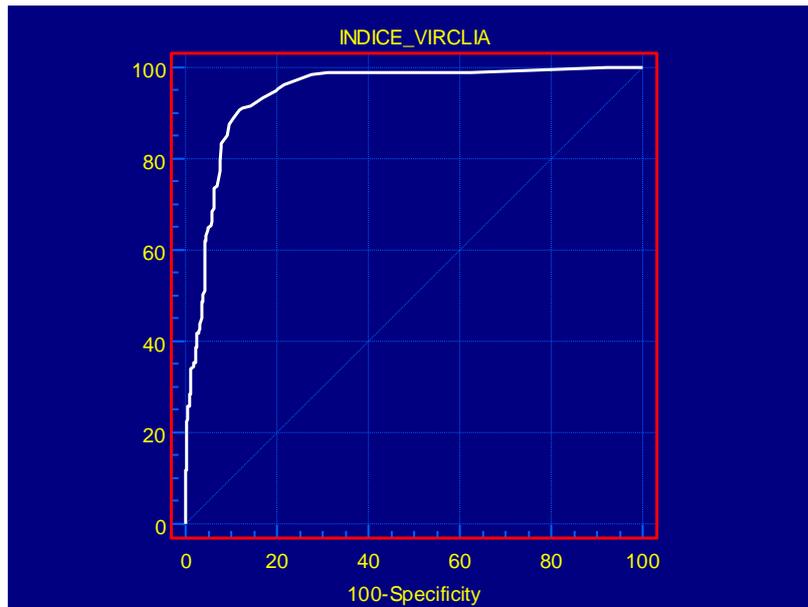


Figura 87. Curva ROC de la técnica CLIA vs. ELISA.

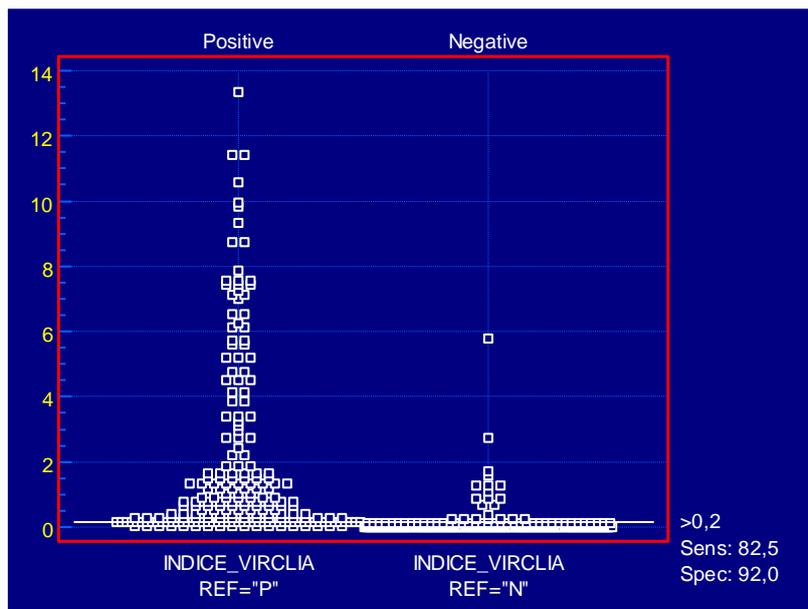


Figura 88. Diagrama interactivo de puntos donde se define el punto de corte óptimo para la técnica CLIA.

En nuestro caso, tomando como partida el punto de corte definido como óptimo a través del análisis de curva ROC, se definió una zona gris que albergaba índices entre 0,16 y 0,2. Estas muestras fueron consideradas “dudosas” o “zona gris” y se recomendará que sean repetidas en otro montaje o que se evalúe una segunda muestra del paciente si es posible.

Definidos los criterios de interpretación y llevado a cabo el análisis de consenso entre ambas técnicas en la columna denominada “Correlación” (ANEXO II), se obtuvo la proporción de verdaderos

positivos, verdaderos negativos, falsos positivos, falsos negativos y dudosos (Tabla 68). Mediante estos, se calculó de manera global la sensibilidad y especificidad diagnóstica, el valor predictivo negativo, valor predictivo positivo y las ratios de verosimilitud negativa y positiva (Tabla 69).

Tabla 68. Clasificación de muestras según su interpretación.

Resultados correlación	N
Verdaderos positivos (VP)	180
Falsos positivos (FP)	24
Verdaderos negativos (VN)	268
Falsos negativos (FN)	23
Dudosos o borderline	23
SUMA:	518

Tabla 69. Resultados obtenidos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y ratios de verosimilitud.

Sensibilidad diagnóstica (DS)		
$DS (\%) = (VP/VP+FN) \times 100$	DS (%) =	89
Especificidad diagnóstica (DE)		
$DE (\%) = (VN/VN+FP) \times 100$	DE (%) =	92
Valor predictivo positivo y negativo (VPP - VPN)		
$VPP = 100 \times VP / (VP+FP)$	VPP =	88
$VPN = 100 \times VN / (VN+FN)$	VPN =	92
Ratio de verosimilitud positiva y negativa (PLR - NLR)		
$PLR = Sensibilidad (\%) / 100 - especificidad (\%)$	PLR =	-0,98
$NLR = 100 - sensibilidad (\%) / especificidad (\%)$	NLR =	-0,96

Una vez adquirida la clasificación cualitativa para las muestras por parte de las dos técnicas, se realizó un análisis comparativo para establecer el grado de acuerdo entre ambas. Para ello, con ayuda de la siguiente tabla de contingencia, se obtuvo el coeficiente kappa de Cohen. En VirClia se muestran tres criterios de interpretación por presentar un rango de índices destinado a las muestras dudosas, cosa que no ocurre con Bio-Rad (Tabla 70).

Tabla 70. Distribución cualitativa de las muestras por ambas técnicas.

		VirClia		
		Positivo	Dudoso	Negativo
Bio-Rad	Positivo	180	14	23
	Negativo	24	9	245

kappa =	0,726
Error estándar =	0,03
95% IC =	0,666 a 0,785

El valor obtenido se tradujo en un grado de acuerdo “sustancial” entre ambos kits de diagnóstico.

La correlación entre los valores de índice de ambas técnicas se llevó a cabo a través del coeficiente de correlación de Spearman (ρ) con los siguientes resultados:

$\rho =$	0,870
Error estándar =	0,000
95% IC =	0,847 a 0,889

El resultado obtenido correspondió a una asociación positiva entre ambas.

En cuanto al análisis de significancia estadística, se realizó el test McNemar, el cual proporciona información acerca de la proporción de falsos positivos y falsos negativos. A través de la tabla de contingencia anterior (Tabla 70), se obtuvo p-valor = 1, lo que significa que, con un intervalo de confianza del 95%, no existen diferencias significativas entre la proporción de falsos positivos y falsos negativos.

La representación gráfica de los valores índices obtenidos a través de la técnica de ELISA y la técnica de CLIA se reflejó mediante diagramas de violín, mostrando por un lado el conjunto global de los datos (Figura 89) y, por otro lado, la distribución individualizada de muestras negativas y muestras positivas (Figura 90 y 91). Dentro de cada violín, se muestra un diagrama de caja y bigotes donde están representados Q1 (primer cuartil) y Q3 (tercer cuartil) mediante el recuadro negro y con punto blanco, dentro del mismo, Q2 (mediana). Los bigotes se prolongan de tal manera que los valores considerados normales estarán comprendidos dentro del rango $[Q1-1,5RIC, Q3+1,5RIC]$.

La distribución de los datos fue similar para ambas técnicas; solo se diferenciaba VirClia por su mayor amplitud en el rango de lectura, el cual se tradujo en valores índices más elevados. La mayor densidad poblacional coincide con el punto blanco presente dentro de la caja, el cual representa Q2 o mediana (Figura 89). Los valores índices en Bio-Rad para muestras negativas iba desde 0 hasta 0,5 y para muestras positivas, desde 0,5 hasta índices en torno a 7,5-8 (Figura 90). Para VirClia, los valores índices de las muestras negativas están muy cercanos a 0, siendo representada Q2 en la misma línea que marca el valor 0 y, por otro lado, las muestras positivas se representan mediante un violín que alberga desde 0,2 hasta valores superiores a 12, estando el valor de Q2 o mediana cercano a 1 (Figura 91). Los diagramas individualizados por técnica muestran un sesgo positivo al presentarse el valor de Q2 más cercano a Q1 (Figura 90 y 91).

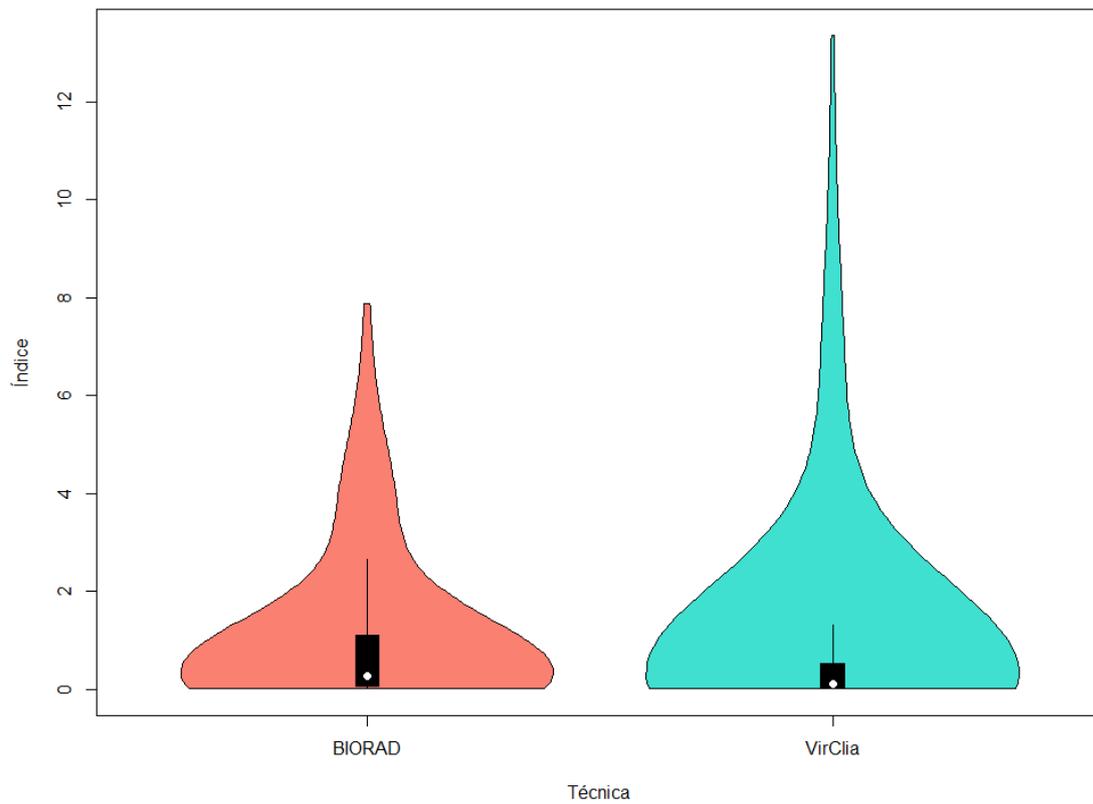


Figura 89. Diagrama de violín. Distribución global de los datos de ambas técnicas en estudio interno.

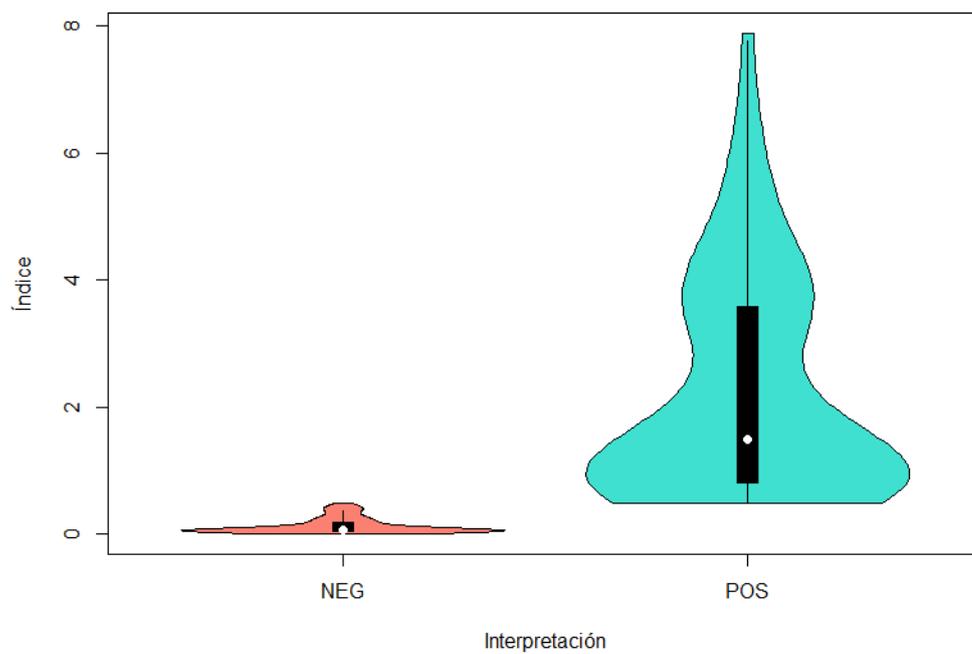


Figura 90. Diagrama de violín. Distribución individualizada de negativos y positivos para la técnica de ELISA (Bio-Rad) en estudio interno.

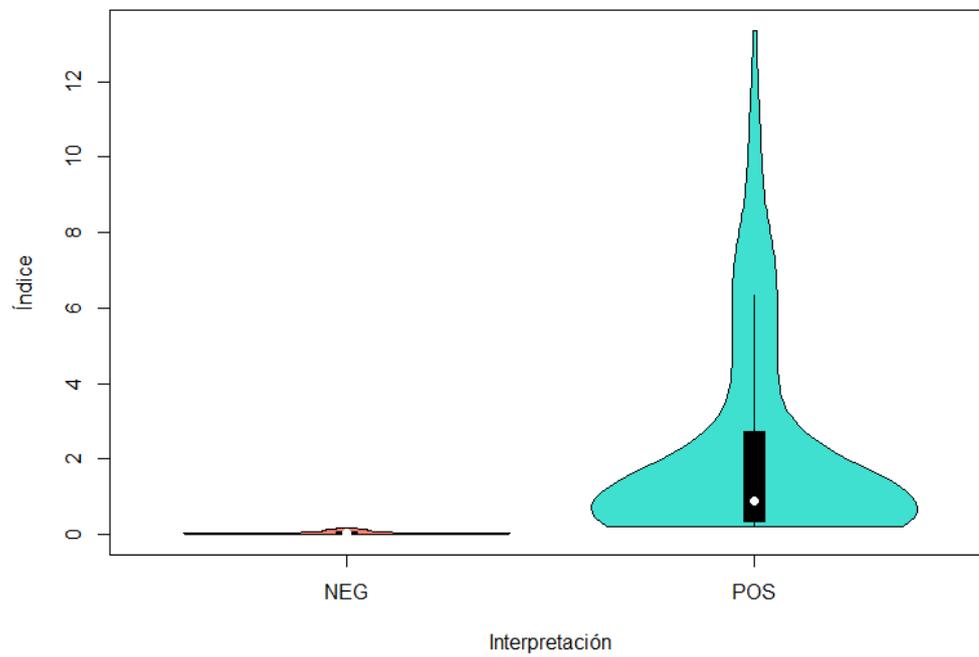


Figura 91. Diagrama de violín. Distribución individualizada de negativos y positivos para la técnica de CLIA (VirClia) en estudio interno.

Los diagramas de violín muestran la amplitud del rango de lectura que presentó la técnica CLIA con respecto al ELISA, con valores índices más elevados, y también, el reducido ruido de fondo aportado por la misma (Figura 90 y 91).

Realizado el estudio global, se planteó realizar un análisis individualizado para cada tipo de muestra, suero y LBA, con el objetivo de establecer, mediante curva ROC, el punto de corte óptimo, así como el rendimiento analítico para cada tipo de matriz. Como siempre, se llevó a cabo la comparación frente al kit de ELISA de Bio-Rad.

Análisis de muestras tipo LBA:

- Rendimiento analítico: expresado en las Tablas 71 y 72.

Tabla 71. Clasificación de muestras LBA según su interpretación.

Resultados correlación	No.
Verdaderos positivos (VP)	64
Falsos positivos (FP)	9
Verdaderos negativos (VN)	124
Falsos negativos (FN)	1
Dudosos o borderline (B)	8
SUMA:	206

Tabla 72. Resultados obtenidos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y ratios de verosimilitud para muestras LBA.

Sensibilidad diagnóstica (DS)		
$DS (\%) = (VP/VP+FN) \times 100$	DS (%) =	98
Especificidad diagnóstica (DE)		
$DE (\%) = (VN/VN+FP) \times 100$	DE (%) =	93
Valor predictivo positivo y negativo (VPP - VPN)		
$VPP = 100 \times VP / (VP+FP)$	VPP =	88
$VPN = 100 \times VN / (VN+FN)$	VPN =	99
Ratio de verosimilitud positiva y negativa (PLR - NLR)		
$PLR = \text{Sensibilidad} (\%) / 100 - \text{especificidad} (\%)$	PLR =	-1,07
$NLR = 100 - \text{sensibilidad} (\%) / \text{especificidad} (\%)$	NLR =	-1,05

- Análisis curva ROC:

El valor para el área debajo de la curva fue 0,974 (Error estándar = 0,014 - 95% IC = 0,941-0,991) (ANEXO IV) (Figura 92), lo cual indica un elevado rendimiento diagnóstico. Comparando los valores índices de las muestras LBA con la clasificación cualitativa de las muestras por parte del kit de Bio-Rad, se obtuvo que el punto óptimo para este tipo de muestra vuelve a estar en índice $\geq 0,2$ (Figura 93), al igual que el definido en la evaluación global, con 70 muestras positivas y 136 muestras negativas según el kit de referencia.

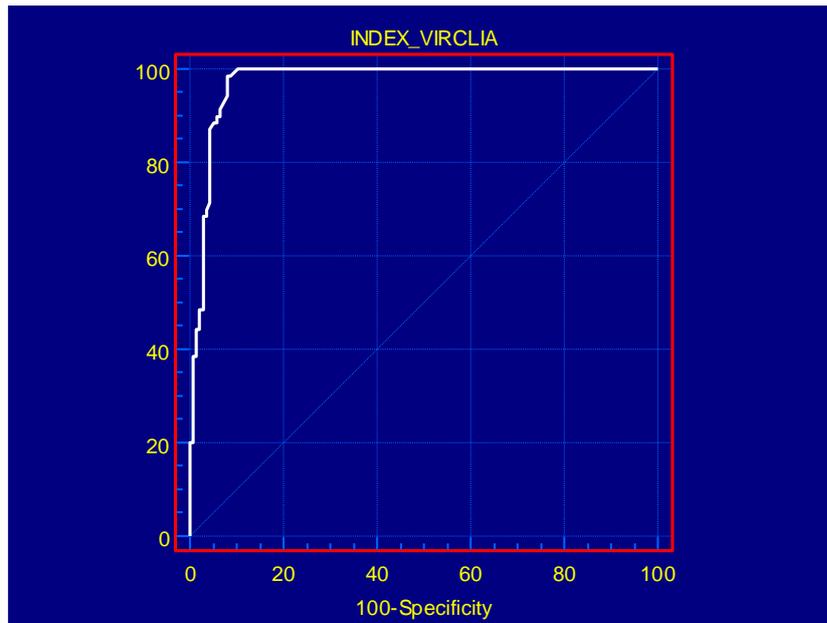


Figura 92. Curva ROC de la técnica CLIA vs. ELISA para muestras LBA.

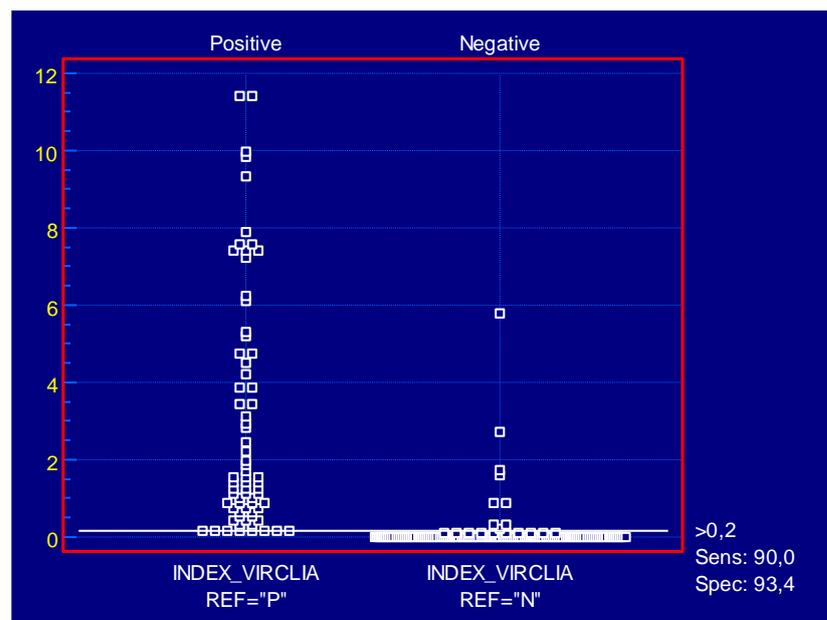


Figura 93. Diagrama interactivo de puntos donde se define el punto de corte óptimo para la técnica CLIA para muestras LBA.

Análisis de muestras tipo suero:

- Rendimiento analítico: descrito en las Tablas 73 y 74.

Tabla 73. Clasificación de muestras suero según su interpretación.

Resultados correlación	No.
Verdaderos positivos (VP)	116
Falsos positivos (FP)	15
Verdaderos negativos (VN)	121
Falsos negativos (FN)	22
Dudosos o borderline (B)	15
SUMA:	289

Tabla 74. Resultados obtenidos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y ratios de verosimilitud para muestras suero.

Sensibilidad diagnóstica (DS)		
$DS (\%) = (VP/VP+FN) \times 100$	DS (%) =	84
Especificidad diagnóstica (DE)		
$DE (\%) = (VN/VN+FP) \times 100$	DE (%) =	89
Valor predictivo positivo y negativo (VPP - VPN)		
$VPP = 100 \times VP / (VP+FP)$	VPP =	89
$VPN = 100 \times VN / (VN+FN)$	VPN =	85
Ratio de verosimilitud positiva y negativa (PLR - NLR)		
$PLR = \text{Sensibilidad} (\%) / 100 - \text{especificidad} (\%)$	PLR =	-0,96
$NLR = 100 - \text{sensibilidad} (\%) / \text{especificidad} (\%)$	NLR =	-0,93

- Análisis curva ROC:

El valor para el área debajo de la curva fue 0,912 (Error estándar = 0,018 – 95% IC = 0,874-0,942) (ANEXO V), lo que indicaba buen rendimiento diagnóstico (Figura 94). En la comparación entre índices de la técnica de CLIA y la clasificación de Bio-Rad, se obtuvo que el punto de corte óptimo para este tipo de muestra estaba en un índice $\geq 0,2$ (Figura 95), al igual que el definido en la evaluación global y para las muestras de LBA. El estudio, con 289 muestras en total, contó con 147 muestras positivas y 142 muestras negativas según el kit de referencia.

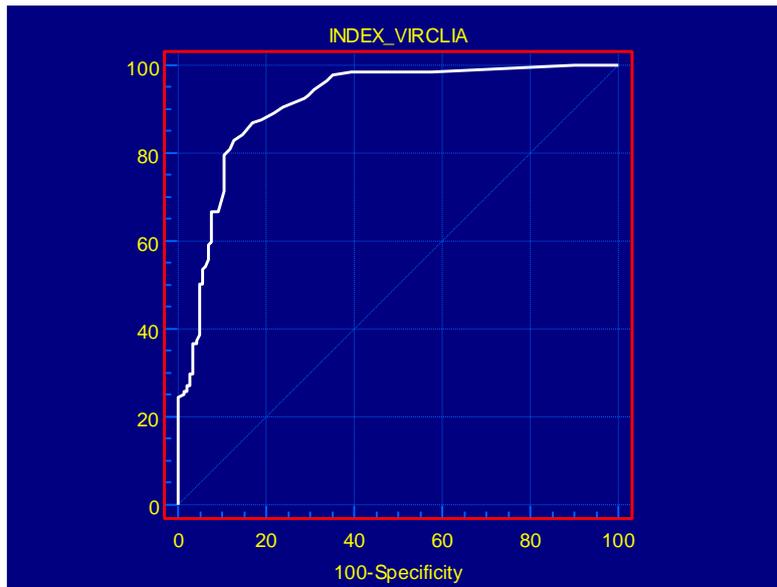


Figura 94. Curva ROC de la técnica CLIA vs. ELISA para muestras suero.

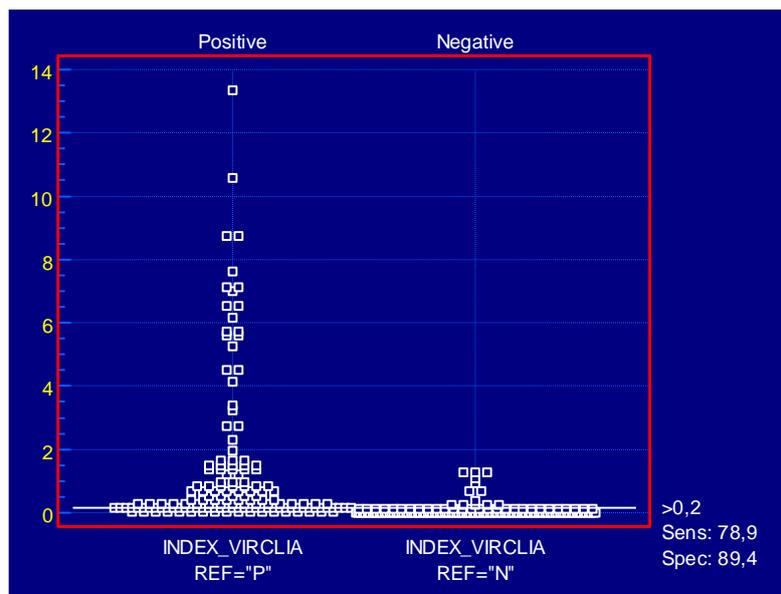


Figura 95. Diagrama interactivo de puntos donde se define el punto de corte óptimo para la técnica CLIA para muestras suero.

Se definió un punto de corte óptimo en índice $\geq 0,2$ para ambos tipos de muestra según se muestra en los diagramas interactivos de puntos (Figura 93 y 95). Obteniendo la clasificación cualitativa, se realizó el estudio analítico frente a Bio-Rad con un 98% de sensibilidad y 93% de especificidad para muestras tipo LBA (Tabla 71 y 72) y un 84% de sensibilidad y 89% de especificidad para muestras tipo suero (Tabla 73 y 74). Estos resultados se asemejan a lo declarado en la bibliografía para otros kits de detección de antígeno de galactomanano donde se refleja que existe una mayor sensibilidad para muestras LBA frente al suero. Los valores AUC para ambos tipos de muestra son equivalentes a lo

obtenido en el análisis global donde se clasificó el test basado en VirClia como un método con un elevado rendimiento diagnóstico (Figura 92 y 94).

Por otro lado, se obtuvieron los datos brutos mostrados en el ANEXO VI, resultantes de un estudio externo multicéntrico llevado a cabo por tres centros mediante el empleo de las dos técnicas de detección de galactomanano. Un total de 327 muestras fueron evaluadas, clasificándose según su naturaleza en 249 sueros y 78 LBA. De las mismas, 120 pertenecían a un grupo de muestras retrospectivas, las cuales presentaban clasificación de aspergilosis probada o probable según los criterios EORTC/MSG definidos en 2019.

Gracias a la clasificación cualitativa obtenida de parte de ambas técnicas (ANEXO VI), se realizó una tabla de contingencia la cual se empleó para el cálculo del grado de acuerdo entre ambas técnicas a través del índice kappa de Cohen (Tabla 75):

Tabla 75. Distribución cualitativa de las muestras por ambas técnicas.

	Positivo VirClia	Dudoso VirClia	Negativo VirClia	Total
Positivo Bio-Rad	75	3	2	80
Negativo Bio-Rad	26	8	213	247
Total	101	11	215	327

kappa (κ) =	0,722
Error estándar =	0,042
95% IC =	0,639 a 0,804

Del total de determinaciones se obtuvieron resultados concordantes en 291 de 327 muestras (89,0%), si contamos las muestras dudosas como positivas y, en 297 de 327 muestras (93,7%), si contamos las muestras dudosas como negativas. Los resultados indicaron que el kit basado en la técnica de CLIA guarda un grado de acuerdo “sustancial” con la técnica ELISA.

La correlación entre los valores de índice de ambas técnicas se llevó a cabo a través del coeficiente de correlación de Spearman (ρ), con una asociación positiva entre ambas técnicas:

ρ =	0,718
Error estándar =	0,000
95% IC =	0,662 a 0,767

En cuanto al análisis de significancia estadística, se realizó el test McNemar a través de la tabla de contingencia anterior (Tabla 75). Dicho test reflejó que, con un intervalo de confianza del 95%, existieron diferencias significativas entre la proporción de falsos positivos y falsos negativos (p -valor = 0,00001383). Dichas discrepancias se analizan más en profundidad a continuación contando con la información aportada por HGM de la clasificación de las muestras según los criterios EORTC/MSG.

A continuación, se muestra el análisis ROC global del kit de VirClia tomando como referencia la clasificación cualitativa obtenida por la técnica de ELISA (Figura 96), con un AUC 0,97 (Error estándar = 0,014 – 95% IC = 0,945-0,985) (ANEXO VII).

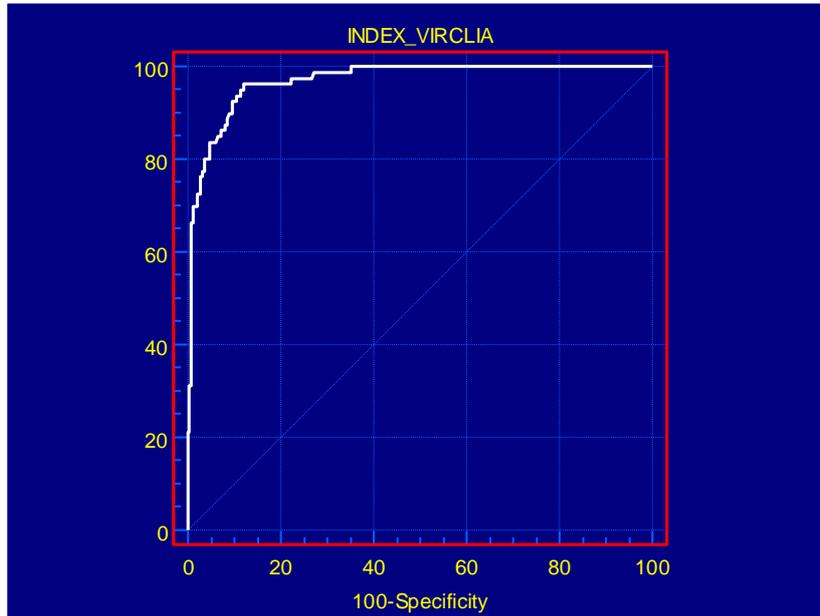


Figura 96. Curva ROC de la técnica CLIA vs. ELISA para el estudio externo.

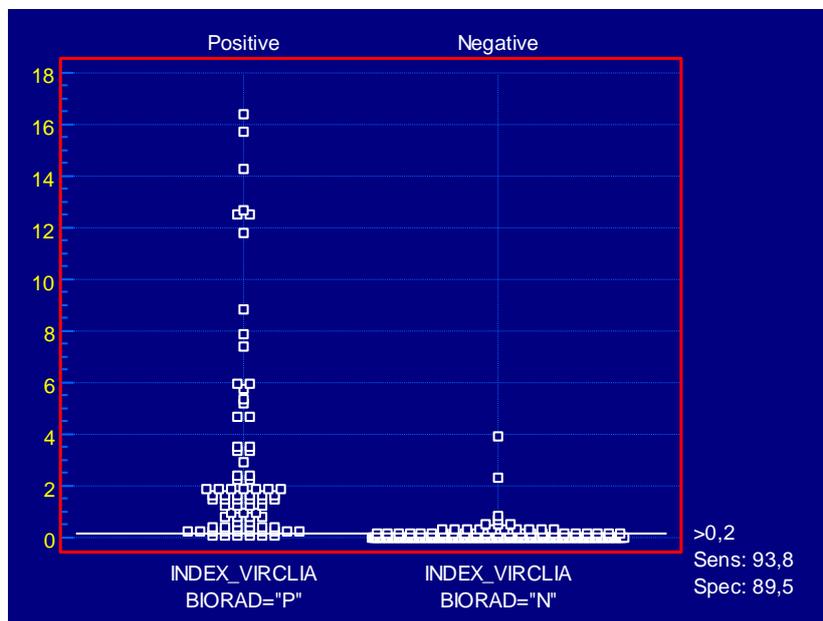


Figura 97. Diagrama interactivo de puntos donde se define el punto de corte óptimo para el estudio externo.

En cuanto a las muestras retrospectivas aportadas por el HGM, 120 en total, se estableció la clasificación según el criterio y clasificación clínica de EORTC/MSG, y con respecto a esta se realizó el cálculo de sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo para ambas técnicas. También se aplicó un análisis ROC (Tabla 76).

Tabla 76. Resultados obtenidos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos para estudio retrospectivo.

Correlación	Bio-Rad	VirClia
Verdadero positivo	60	72
Falso positivo	0	0
Verdadero negativo	25	25
Falso negativo	35	17
Dudoso	0	6
Total	120	120
Sensibilidad (%)	63,2	80,9
Especificidad (%)	100	100
VPP	100	100
VPN	41,7	59,5

Las muestras discrepantes entre ambas técnicas se resolvieron en este caso según la clasificación de EORTC/MSG donde todas ellas contaban con criterio de AI probada o probable. Se obtuvieron 15 muestras que eran negativas por Bio-Rad y positivas por VirClia y 3 muestras que eran positivas por Bio-Rad y negativas por VirClia.

Comparando ambas frente al criterio “gold standard”, los resultados de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN fueron 63,2%, 100%, 100% y 41,7% para Bio-Rad y 80,9%, 100%, 100% y 59,5% para VirClia, respectivamente.

Las áreas debajo de la curva (AUC) resultantes tras los dos análisis ROC mostraron un elevado rendimiento diagnóstico en ambas técnicas tomando como referencia el criterio de EORTC/MSG (Figura 98 y 99), con una AUC = 0,957 (ANEXO VIII: Error estándar = 0,018 – 95% IC = 0,899-0,986) para Bio-Rad y AUC = 0,968 (ANEXO IX: Error estándar = 0,014 – 95% IC = 0,918-0,991) para VirClia.

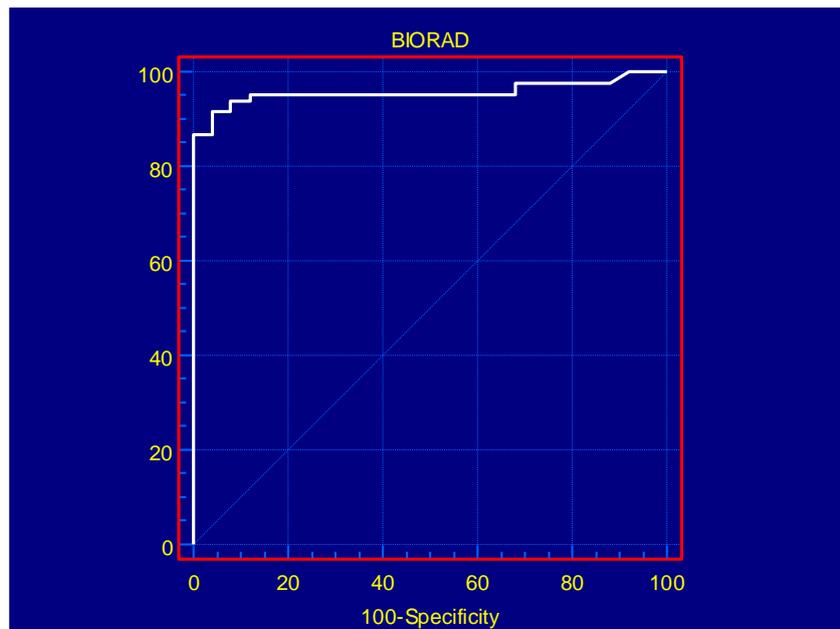


Figura 98. Curva ROC de la técnica ELISA vs. criterios EORTC/MSG.

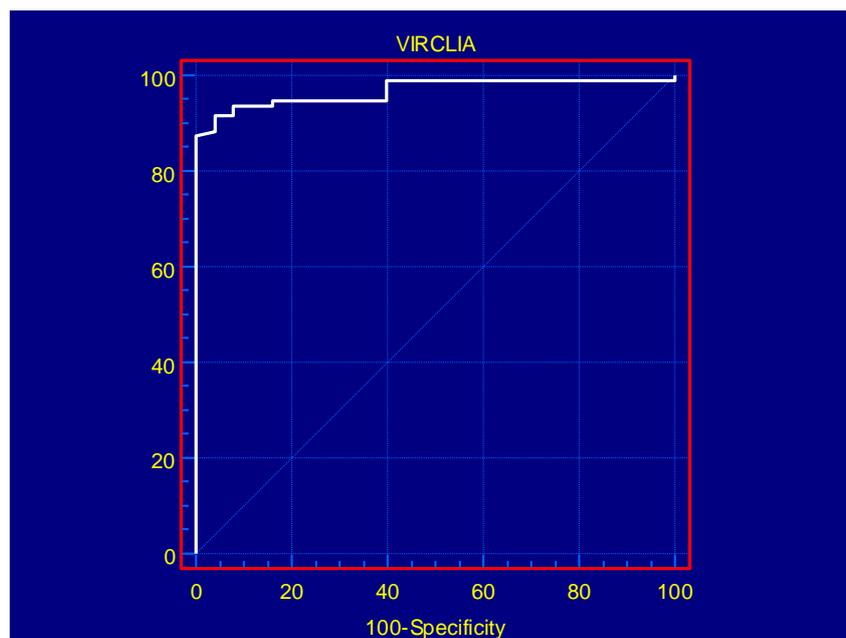


Figura 99. Curva ROC de la técnica CLIA vs. criterios EORTC/MSG.

El análisis ROC del kit de Bio-Rad con respecto a la clasificación según la EORTC/MSG, estableció un punto de corte óptimo en índice 0,1 para obtener una sensibilidad del 91,6% y una especificidad del 92,0% (Figura 100). Fijando el punto de corte en lo recomendado por el fabricante, índice $\geq 0,5$, la sensibilidad fue del 56,6% y la especificidad del 100% (ANEXO VIII).

Por otro lado, se obtuvo un punto de corte óptimo en índice de 0,1 con un 92,6% de sensibilidad y 92,0% de especificidad para el kit de VirClia (Figura 101). Si fijáramos el punto de corte en el definido en la evaluación de funcionamiento realizada y analizada anteriormente, es decir, índice $\geq 0,2$, la sensibilidad sería del 75,8% y la especificidad del 100% (ANEXO IX).

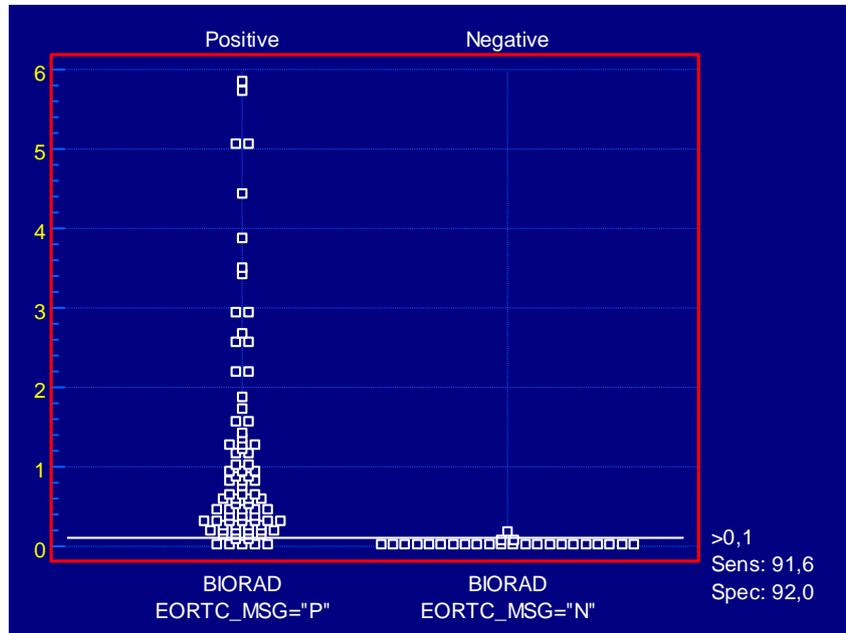


Figura 100. Diagrama interactivo de puntos donde se define el punto de corte óptimo para la técnica ELISA.

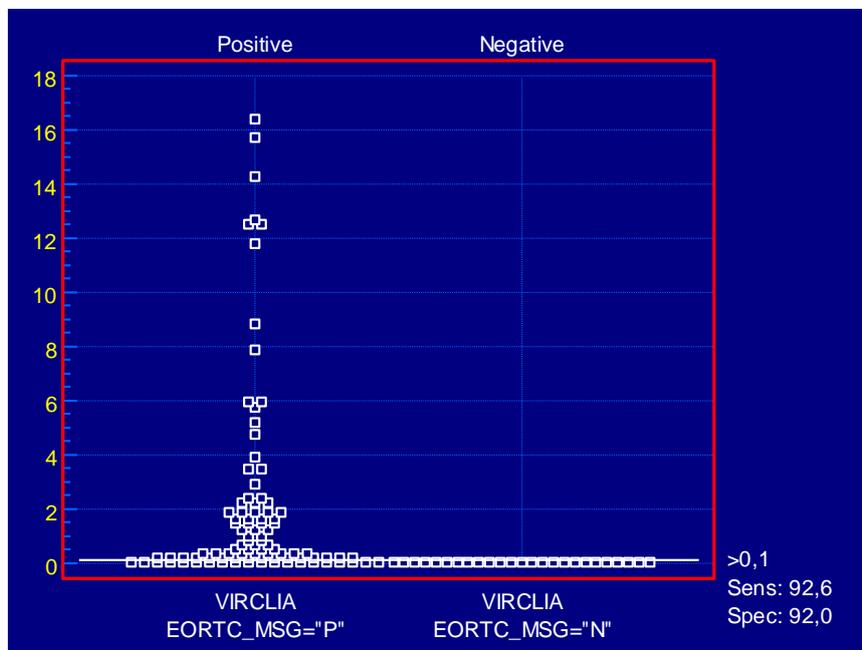


Figura 101. Diagrama interactivo de puntos donde se define el punto de corte óptimo para la técnica CLIA.

La distribución de los valores índice, así como la densidad poblacional de ambas técnicas se muestra a continuación en un diagrama de violín el cual refleja asimetría en el conjunto de datos y la mayor amplitud en el rango de lectura característica de la técnica CLIA (Figura 102).

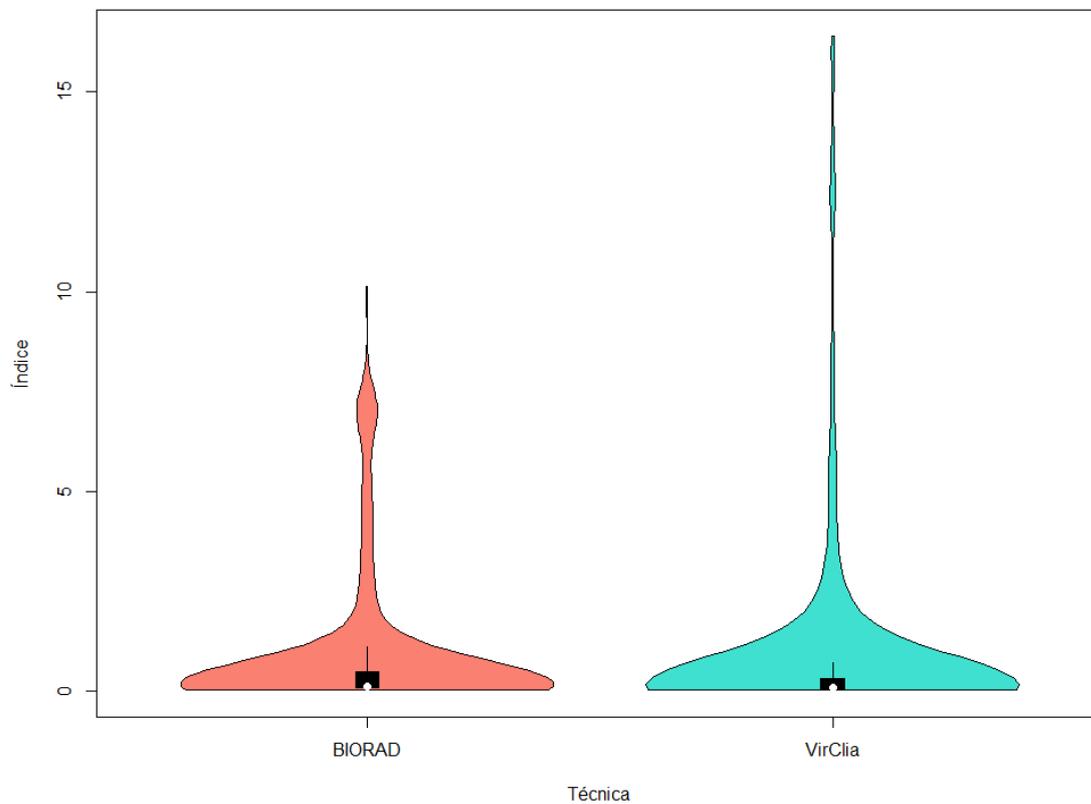


Figura 102. Diagrama de violín. Distribución global de los datos de ambas técnicas en estudio externo.

Para este conjunto de datos, se observó que la distribución de índices para muestras positivas se encontraba entre 0,5 y 10 para Bio-Rad y entre 0,2 y 15 para VirClia, con los valores de la mediana en torno a 2 y en torno a 1,5, respectivamente, coincidiendo con la zona del violín con mayor amplitud. Asimismo, en este estudio, existía sesgo positivo para la técnica ELISA, reflejado por la posición de Q2 dentro de la caja, el cual está más cercano al Q1, y no se muestra sesgo para la técnica CLIA, con Q2 aproximadamente en el centro de la caja para los dos tipos de muestra (Figura 103 y 104).

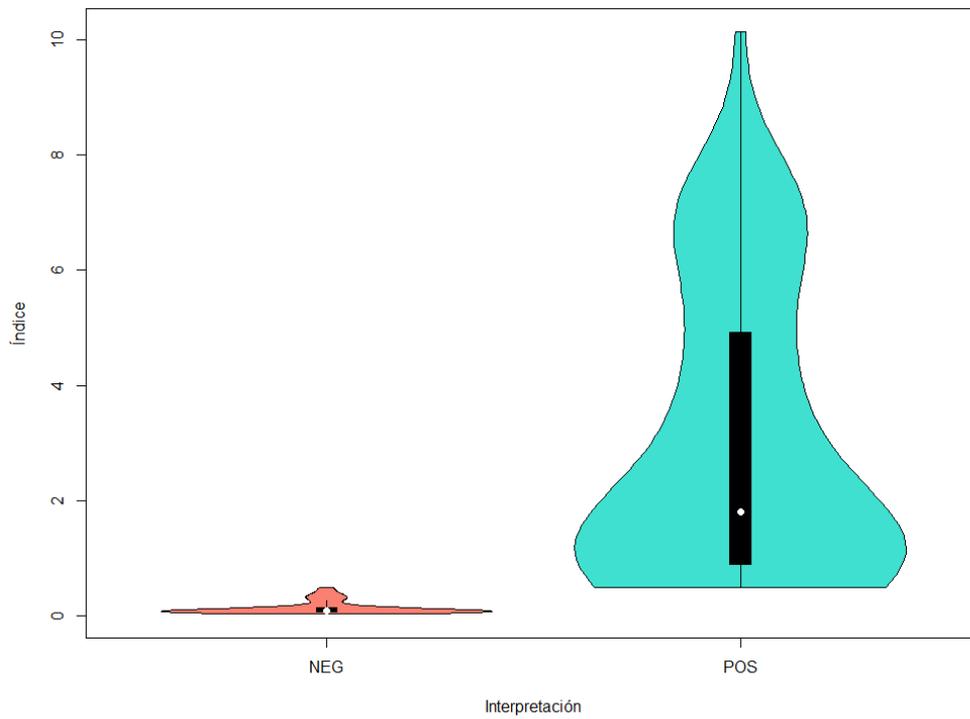


Figura 103. Diagrama de violín. Distribución individualizada de negativos y positivos para la técnica ELISA (Bio-Rad) en estudio externo.

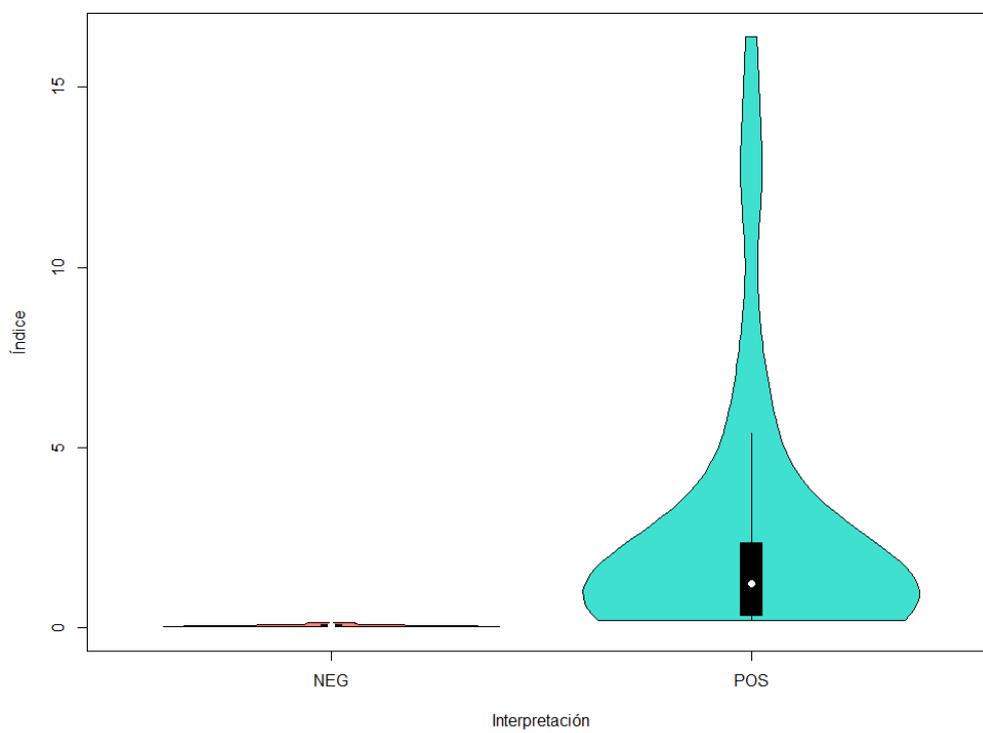


Figura 104. Diagrama de violín. Distribución individualizada de negativos y positivos para la técnica CLIA (VirClia) en el estudio externo.

7.2. FUNCIONAMIENTO ANALÍTICO.

7.2.1. REPETITIVIDAD Y REPRODUCIBILIDAD.

Los controles del kit y dos muestras, una negativa (muestra Neg. = A-83-029) y otra positiva (muestra Pos. = A-120-025), fueron empleados para el análisis de la repetitividad y reproducibilidad de la técnica. El ensayo consistió en obtener los valores RLU de dos réplicas de cada una de las muestras, de cada día y en cada sistema automatizado durante un periodo de tiempo de 20 días. Mediante dichos valores RLU podrán calcularse los coeficientes de variación para el análisis de cada tipo de precisión.

Los datos brutos se localizan en el ANEXO X mientras que los resultados de desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (CV%) para cada condición se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 77. Análisis de repetitividad y reproducibilidad.

Muestra	Promedio	Repetitividad (Intraensayo)		Reproducibilidad					
		SD (S_r)	CV%	Precisión interensayo		Precisión entre días		Precisión entre instrumentos	
				SD (S_{rr})	CV%	SD (S_{dd})	CV%	SD (S_T)	CV%
Calibrador	4,94	0,38	7,60	0,26	5,18	0,16	3,29	0,42	8,59
Muestra Neg.	0,48	0,06	12,21	0,08	15,94	0,04	8,44	0,09	18,21
Muestra Pos.	9,10	0,43	4,73	0,19	2,09	0,08	0,92	0,48	5,26
Control Neg.	0,22	0,03	14,67	0,06	27,81	0,03	14,61	0,06	27,84

Los coeficientes de variación mostraron menor variabilidad en la muestra positiva y en el control calibrador que en la muestra negativa y control negativo (Tabla 77). En este sentido, destacar la importancia de los bajos niveles de CV obtenidos para el calibrador, los cuales oscilaron en el rango 3-9 para los diferentes análisis, ya que es el responsable, junto con la RLU obtenida de la muestra, de proporcionar el valor de índice para cada una de ellas. Si se cuenta con mayor variabilidad aportada por este control, hay riesgo de obtener resultados falsos positivos y/o falsos negativos ya que en RLU cercanas al punto de corte de la técnica, dependiendo del valor RLU que presente el calibrador, la clasificación se vería modificada.

Se cumple, por tanto, con la especificación definida para este ensayo donde el CV debe ser $\leq 20\%$ (línea discontinua Figura 105) para muestras positivas y calibrador (Figura 105). Respecto a la muestra negativa y control negativo, no se obtuvo un cambio en la significación cualitativa en ningún caso.

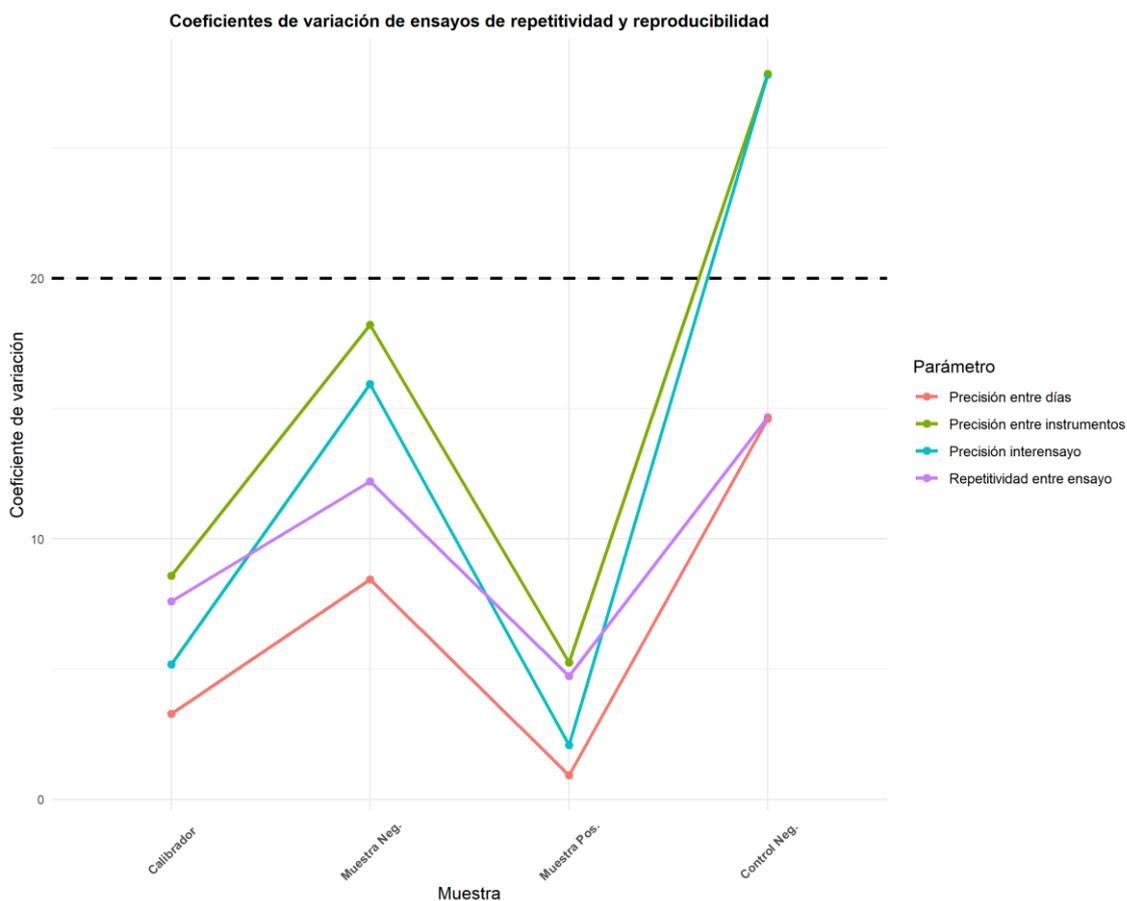


Figura 105. Resultados expresados en CV (%) del estudio de repetitividad y reproducibilidad del kit de VirClia.

7.2.2. REACCIÓN CRUZADA E INTERFERENCIAS.

7.2.2.1. HONGOS.

Este estudio tiene como objetivo analizar la existencia de reacción cruzada frente a distintas especies del género *Aspergillus* y frente a otros géneros caracterizados por presentar galactomanano como componente de su pared celular. Los sobrenadantes obtenidos, según el protocolo definido en el apartado Material y Métodos, procedentes de los diferentes géneros de hongos, se diluyeron en agua destilada al título más concentrado indicado en la bibliografía, 1/1000. Una vez obtenida la dilución, se ensayaron por el kit de VirClia mediante sistema automatizado.

Los resultados expresados en RLU y valor de índice, así como la interpretación para cada una de las muestras, se detallan a continuación:

Tabla 78. Reactividad frente a diferentes géneros de hongos.

Especie/Género	VirClia Lote 20C073003		
	RLU	Índice	Interp.
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3,08	0,62	Positivo
<i>Penicillium spp.</i>	1,77	0,36	Positivo
<i>Aspergillus terreus</i>	1,73	0,35	Positivo
<i>Aspergillus niger</i>	2,67	0,54	Positivo
<i>Aspergillus flavus</i>	1,07	0,22	Positivo
<i>Cladosporium spp.</i>	0,18	0,04	Negativo
<i>Fusarium oxysporum</i>	0,08	0,02	Negativo
<i>Fusarium solani</i>	0,1	0,02	Negativo
<i>Paecilomyces variotii</i>	0,1	0,02	Negativo
<i>Trichophyton interdigitale</i>	0,09	0,02	Negativo
<i>Trichoderma virens</i>	0,13	0,03	Negativo
<i>Histoplasma capsulatum</i>	1,56	0,32	Positivo
<i>Candida albicans</i>	0,43	0,09	Negativo

Tomando como positivos aquellos con índice $\geq 0,2$, se presentó reactividad por parte de todas las especies del género *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger* y *A. flavus*), por *Penicillium spp.* y por *Histoplasma capsulatum*. El resto de especies aportaron señales mínimas de RLU las cuales rondaron el valor intrínseco del fondo del sistema. *Candida albicans* es la única que cuadruplicó su resultado respecto al resto, pero siendo este muy inferior al punto de corte de la técnica.

7.2.2.2. FÁRMACOS.

Se han evaluado concentraciones terapéuticas de piperacilina-tazobactam a 600 $\mu\text{l/ml}$, como antibiótico betalactámico recomendado en pacientes hospitalizados, así como amoxicilina y amoxicilina-clavulánico a 100 $\mu\text{l/ml}$. También se ha analizado ciclofosfamida a 100 $\mu\text{l/ml}$ como fármaco antineoplásico e inmunosupresor común. Se realizaron diluciones de los fármacos utilizando suero humano negativo y LBA humano negativo. El suero negativo y el LBA usados como matriz de la dilución, fueron probados sin adición de ninguno de los agentes para descartar una posible interferencia debida a la naturaleza de las muestras empleadas. Las muestras obtenidas se trataron con solución de tratamiento de galactomanano presente en el kit y se procesaron mediante el kit de VirClia (Tabla 79).

Tabla 79. Interferencia de fármacos en el kit de VirClia.
(N/A: No aplica; Interp.: Interpretación)

Fármaco	VirClia Lote 20C073005					
	Suero			LBA		
	RLU	Índice	Interp.	RLU	Índice	Interp.
AMOXICILINA 100 µg/ml	0,197	0,04	Negativo	0,121	0,023	Negativo
CICLOFOSFAMIDA 100 µg/ml	0,153	0,025	Negativo	0,137	0,025	Negativo
TAZOBACTAM 600 µg/ml	0,152	0,031	Negativo	0,148	0,027	Negativo
AMOXICILINA CLAVULÁNICO 100 µg/ml	0,198	0,048	Negativo	0,403	0,119	Negativo
PIPERACILINA 600 µg/ml	0,216	0,04	Negativo	0,086	0,016	Negativo
Referencia matriz suero	0,163	0,034	Negativo	N/A	N/A	N/A
Referencia matriz LBA	N/A	N/A	N/A	0,16	0,036	Negativo

Ninguno de los fármacos evaluados a las concentraciones mencionadas dio lugar a ninguna reactividad con el kit de VirClia. La reactividad en términos de RLU fue muy similar en todos ellos excepto en la matriz LBA con amoxicilina clavulánico donde se vio ligeramente aumentada, aunque su valor permaneció por debajo del punto de corte. El suero y LBA negativos usados como matriz del estudio tampoco dieron lugar a ninguna interferencia con el kit.

A pesar de obtener carencia de reactividad cruzada, se recomienda que se preste especial atención a pacientes que presenten tratamientos con antibióticos betalactámicos. Puede ocurrir que algunos lotes fabricados de este tipo de medicamentos incluyan trazas de material fúngico dando lugar a interferencias en la prueba.

7.2.2.3. OTRAS INFECCIONES.

Un total de 104 muestras de suero, de diferentes patologías, fueron evaluadas por el kit de VirClia. Basándonos en las prestaciones declaradas en el insert del kit de Bio-Rad, se estudiaron otras infecciones no relacionadas con AI como posible fuente de obtención de reacción cruzada.

Las muestras seleccionadas fueron previamente caracterizadas como positivas por un kit de diagnóstico basado en la detección de anticuerpos o declaradas como tal por su proveedor externo. Los parámetros elegidos, así como los resultados expresados en valor RLU y clasificación cualitativa para cada determinación, se muestran detallados en el ANEXO XI.

En la siguiente tabla (Tabla 80), a modo de resumen, se reflejan las patologías seleccionadas, el origen de las muestras y la reactividad cruzada encontrada por el kit de detección de galactomanano.

Tabla 80. Reacción cruzada debida a otras patologías no relacionadas con AI.
Colección Vircell: muestras desfibrinadas procedentes del Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Granada (CRTS), Granada; BIOMNIS: Eurofins Biomnis, Francia.

Microorganismo/Patología	Origen	Reactividad
Mycoplasma	Colección VIRCELL	0/15 (0%)
Citomegalovirus	Colección VIRCELL	1/14 (7,14%)
Toxoplasma	Colección VIRCELL	0/17 (0%)
Rubeola	Colección VIRCELL	0/13 (0%)
Sífilis	Colección VIRCELL	0/15 (0%)
Hepatitis C	Adquiridas externamente - BIOMNIS	0/9 (0%)
Hepatitis E	Colección VIRCELL	0/8 (0%)
Factor reumatoide	Colección VIRCELL	0/8 (0%)
Anticuerpos antinucleares (ANA)	Adquiridas externamente - BIOMNIS	0/5 (0%)

Del total de muestras evaluadas solo se obtuvo reacción cruzada en una de ellas, es decir, un 0,96% de falsos positivos. Esta fue debida a una de las 14 muestras clasificadas como positivas para la infección por Citomegalovirus, es decir, un 7,14%. El resto de muestras presentaron valores RLU en torno al fondo aportado por la técnica, estando el promedio en 0,034.

7.2.2.4. HAMA.

Muestras caracterizadas previamente como HAMA mediante el kit Human anti-mouse Ig (HAMA), Biologend, Inc. – Ref. 438307, se ensayaron sobre el kit de detección de galactomanano (lote 20C073005). Los criterios de interpretación fueron los definidos para el kit, es decir, considerar positividad en índices $\geq 0,2$. En la Tabla 81 se exponen los datos obtenidos en este estudio.

Tabla 81. Análisis de la interferencia de anticuerpos HAMA sobre el kit de VirClia.

Muestra	Especificidad	Valor obtenido	Método	Interpretación
		(Índice)		
A-100-044	HAMA	1240	ELISA	Positivo
	Galactomanano	0,026	VirClia	Negativo
A-101-024	HAMA	1303	ELISA	Positivo
	Galactomanano	0,024	VirClia	Negativo
A-111-048	HAMA	473	ELISA	Positivo
	Galactomanano	0,034	VirClia	Negativo
A-93-058	HAMA	8458	ELISA	Positivo
	Galactomanano	0,031	VirClia	Negativo

De las 4 muestras ensayadas, no se obtuvo ningún resultado positivo (especificidad 100%) con valores de índice muy lejanos al punto de corte de la técnica.

7.2.2.5. INTERFERENCIAS ENDÓGENAS.

Tres muestras de suero, una negativa y dos con distinto nivel de positividad, se ensayaron por triplicado con cada una de las sustancias interferentes a las concentraciones que se reflejan en la tabla. En paralelo, una alícuota de cada una de las muestras se dispuso sin aditivo actuando como condición "control". Los resultados brutos se muestran en el ANEXO XII y, en la siguiente tabla (Tabla 82), aparecen los valores promedios de RLU y el grado de interferencia expresado en porcentaje para cada muestra y para cada sustancia interferente.

Tabla 82. Interferencia debida a sustancias endógenas.

Muestra positiva alta:

	Control (sin aditivo)	6 g/l Bilirrubina	8,5 g/l Hemoglobina	5,8 g/l Colesterol	5,5 g/l Tributirina	60g/l γ- globulina	60g/l Albúmina
Promedio (RLU)	14,65	15,28	12,38	12,81	16,53	15,37	14,22
Promedio test - Promedio control (RLU)	-	0,63	-2,26	-1,84	1,89	0,72	-0,43
% Interferencia	-	4,32	-15,45	-12,53	12,88	4,94	-2,93

Muestra positiva baja:

	Control (sin aditivo)	6 g/l Bilirrubina	8,5 g/l Hemoglobina	5,8 g/l Colesterol	5,5 g/l Tributirina	60g/l γ- globulina	60g/l Albúmina
Promedio (RLU)	4,02	4,69	4,36	3,25	3,66	3,71	3,57
Promedio test - Promedio control (RLU)	-	0,67	0,34	-0,77	-0,36	-0,32	-0,45
% Interferencia	-	16,6	8,4	-19,06	-8,95	-7,85	-11,16

Muestra negativa:

	Control (sin aditivo)	6 g/l Bilirrubina	8,5 g/l Hemoglobina	5,8 g/l Colesterol	5,5 g/l Tributirina	60g/l γ- globulina	60g/l Albúmina
Promedio (RLU)	0,04	0,06	0,16	0,06	0,05	0,24	0,08
Promedio test - Promedio control (RLU)	-	0,02	0,11	0,02	0,01	0,19	0,04
Resultado	Sin cambio en la interpretación						

Los resultados de porcentaje de interferencia son tomados como valores absolutos. Las especificaciones definidas se cumplieron, es decir, se obtuvo un grado de interferencia $\leq 25\%$ para muestras positivas y no se experimentó cambio en la interpretación de la muestra negativa. El porcentaje más cercano a la especificación establecida se reflejó en la muestra positiva baja, con un 19,06% para una concentración de 5,8g/l de colesterol. En cuanto a las muestras negativas, el promedio de RLU obtenida se mostró muy alejado del punto de corte de la técnica para todas las sustancias endógenas.

7.2.2.6. LIDOCAÍNA EN MUESTRAS DE LBA.

Se evaluaron diluciones seriadas de lidocaína en solución salina cubriendo el rango de 0,15 a 5% (p/v) sobre el kit de VirClia (lote 20C073005). Los resultados en valores RLU e índices se muestran en la Tabla 83:

Tabla 83. Interferencia de lidocaína en muestras LBA.

Concentración Lidocaína	RLU	Índice	Interp.
5,00%	0,33	0,09	Negativo
2,50%	0,16	0,04	Negativo
1,25%	0,08	0,03	Negativo
0,60%	0,09	0,03	Negativo
0,30%	0,11	0,04	Negativo
0,15%	0,06	0,02	Negativo
0%	0,06	0,02	Negativo

La muestra que presentó mayor concentración de lidocaína es la que presentó mayor valor RLU, pero este, traducido en índice, quedó muy por debajo del punto de corte definido para la técnica. La siguiente dilución empleada mostró una caída aproximadamente a la mitad con respecto a la primera y a partir de ahí, se apreciaron RLU constantes con valores análogos al ruido de fondo propio del sistema.

7.2.3. ESTABILIDAD.

El estudio de estabilidad se basó, por un lado, en el análisis bajo condiciones forzadas y, por otro lado, sometido a condiciones reales de conservación y almacenamiento.

En primer lugar, se estudió la estabilidad forzada de 3 lotes los cuales se habían dispuesto durante 12 y 7 días a 36-38°C. La condición empleada como referencia fue la de las monodosis conservadas el mismo periodo de tiempo a 2-8°C (Tabla 84).

Tabla 84. Estudio estabilidad acelerada 3 lotes.

	Lote 1			Lote 2			Lote 3		
	2-8°C	36-38°C		2-8°C	36-38°C		2-8°C	36-38°C	
	Inicial	7 días	12 días	Inicial	7 días	12 días	Inicial	7 días	12 días
Calibrador	2,35	2,79	3,22	2,41	2,1	3,01	2,5	2,14	2,28
Control negativo (CN)	0,03	0,08	0,02	0,07	0,04	0,49	0,08	0,04	0,05
% caída señal Calibrador	0	-19	-37	0	13	-25	0	14	9
Interpretación CN	No cambia la interpretación								

Se analizó el porcentaje de caída de señal para el calibrador del kit y estos no fueron iguales ni superiores al 20%, por lo que se cumplió la especificación establecida para este ensayo. En cuanto al control negativo, en ningún caso se notificó cambio en la interpretación del mismo (Figura 106).

En segundo lugar, se llevó a cabo el estudio de la estabilidad de la monodosis abierta en uno de los lotes. Consistió en analizar una monodosis que había estado abierta durante 12 horas a temperatura ambiente antes de ser usada. La condición empleada como referencia, como en el ensayo anterior, fue aquella monodosis que había estado cerrada y conservada a 2-8°C (Tabla 85).

Tabla 85. Estudio estabilidad monodosis abierta.

	Lote 1	
	2-8°C	Tª ambiente
	Inicial	12 horas
Calibrador	2,35	2,46
Control negativo (CN)	0,03	0,06
% caída señal Calibrador	0	-5
Interpretación CN	No cambia la interpretación	

El porcentaje de caída de señal obtenido para el calibrador mostró un valor negativo (-5%) lo que indica que el valor RLU obtenido para la monodosis abierta fue ligeramente superior a la condición tomada como referencia. Se cumplió la especificación establecida de obtener un porcentaje de caída de señal $\leq 20\%$ y no experimentar cambio en la interpretación para el control negativo (Figura 106).

En tercer lugar, se llevó a cabo la estabilidad de transporte consistente en analizar cómo afectan variaciones de temperatura a los reactivos del kit de un lote. Los ciclos de temperatura, antes de ser evaluadas, fueron: -80°C durante 24 horas, 2 horas a temperatura ambiente y 5 y 7 días a 36-38°C. Como en casos anteriores, la condición de referencia fue la que había permanecido durante todo el periodo de tiempo a 2-8°C (Tabla 86).

Tabla 86. Estudio estabilidad de transporte.

	Lote 1		
	2-8°C	36-38°C	
	Inicial	5 días	7 días
Calibrador	2,35	2,77	2,85
Control negativo (CN)	0,03	0,05	0,06
% caída señal Calibrador	0	-18	-21
Interpretación CN	No cambia la interpretación		

El porcentaje de caída de señal obtenido presentó valor negativo para la condición de 5 y 7 días, lo que significa que se habían obtenido RLU superiores para esos días con respecto a la condición tomada como referencia. Al medir degradación, se aceptarán dichos valores. Por otro lado, el control negativo no presentó modificación en su interpretación (Figura 106).

Por último, en el caso de la estabilidad real del kit, se ensayó sobre 3 lotes, y la especificación establecida fue que el valor RLU de calibrador permaneciera entre el rango establecido, RLU 2-7 y, para el control negativo, que la RLU fuera inferior a 2. Los tres lotes fueron ensayados a tiempo 0, que fue la fecha en la que se fabricaron, y a tiempo 7, 12 y 15 meses, siendo esta última la fecha de caducidad del kit (Tabla 87). La evaluación de cada condición fue secuencial y no se llevó a cabo en paralelo como en los casos anteriores de estabilidad forzada.

Tabla 87. Estudio estabilidad real 3 lotes.
(CAL: calibrador; CN: control negativo; M: meses)

	Lote 1 (20C073003)				Lote 2 (21C073001)				Lote 3 (21C073002)			
	2-8°C				2-8°C				2-8°C			
	Inicial	7M	12M	15M	Inicial	7M	12M	15M	Inicial	7M	12M	15M
CAL	5,43	5,86	4,9	5,5	4,4	6,01	4,55	3,64	4,33	5,47	5,06	3,6
CN	0,19	0,14	0,29	0,45	0,06	0,07	0,1	0,09	0,07	0,22	0,16	0,42
CAL RLU 2-7	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
CN <2	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple

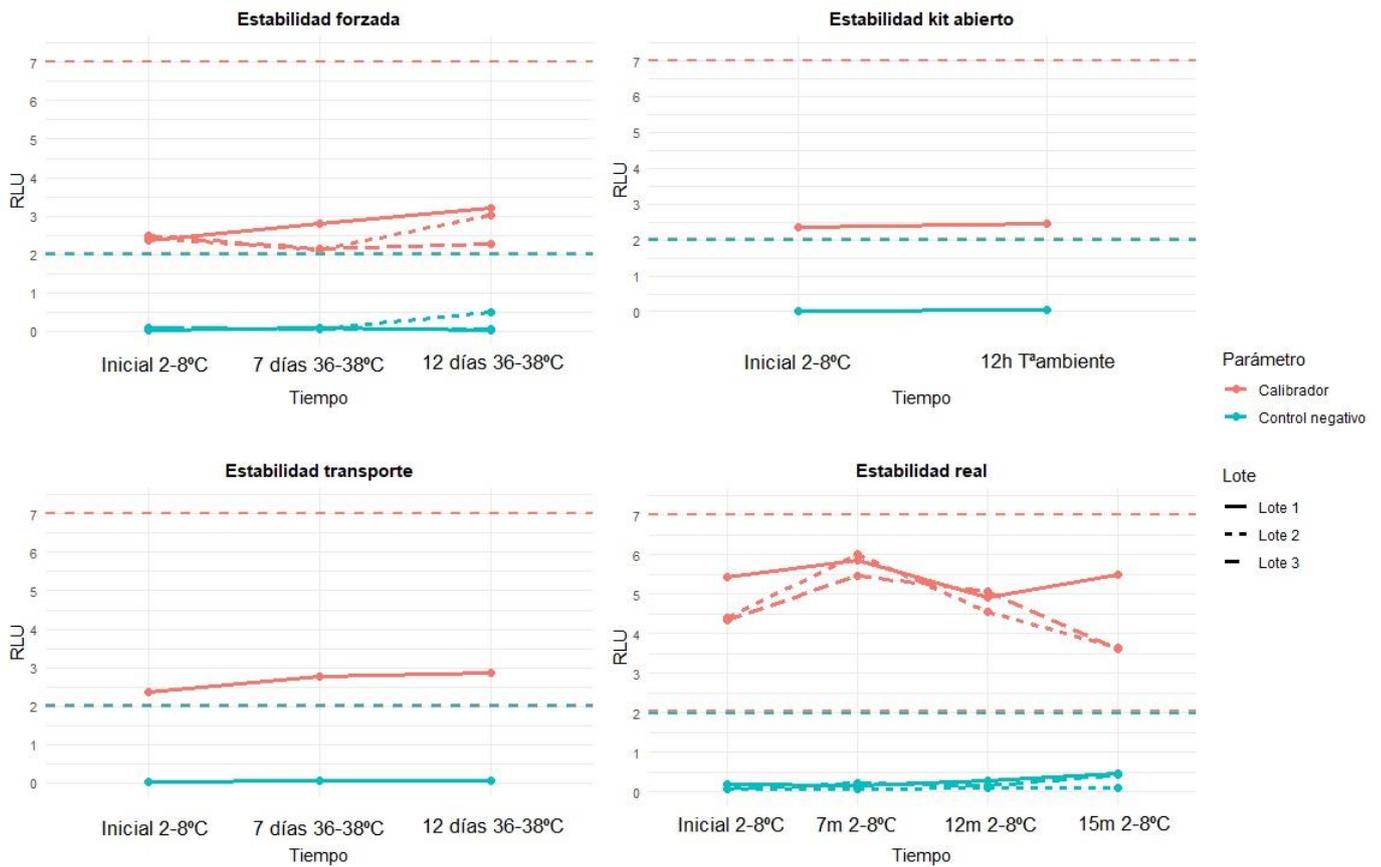


Figura 106. Estudio de estabilidad forzada y real del kit de VirClia.
(12h: 12 horas; 7m: 7 meses, 12m: 12 meses, 15m: 15 meses)

Se cumplió la especificación establecida para el calibrador y control negativo del kit para los tres lotes estudiados (Figura 106). Si se calcula el porcentaje de caída de señal del calibrador del mes 15 con respecto al tiempo 0, se observa que, en dichos lotes, se obtuvo una caída de señal por debajo del 20% (Lote 1: -1,3%; Lote 2: 17,3 y Lote 3: 16,9%). Esta especificación, que fue definida para el estudio de estabilidad forzada, se cumplió y apoyó lo reflejado en la referencia bibliográfica en la que se basa¹⁸⁶.

8. COMPARACIÓN DE DIFERENTES KITS DE DIAGNÓSTICO.

8.1. INMUNOCROMATOGRAFÍA.

a) Límite de detección.

- Titulación de antígeno de galactomanano de bajo peso molecular <13kDa sobre kit IMMY (Figura 107) y VirClia.
- Titulación de antígeno de glicoproteína sobre kit OLM (Figura 108) y VirClia.



Figura 107. IMMY sōna *Aspergillus*.



Figura 108. AspLFD OLM.

En la Tabla 88 se presentan los resultados obtenidos con VirClia en la titulación de los antígenos utilizados.

Tabla 88. Titulación Ag glicoproteína y bajo peso molecular (<13 kDa) en VirClia.
(Concent. Ag: concentración Ag)

Concent. Ag	Ag glicoproteína		Ag <13 kDa	
	RLU	Índice	RLU	índice
0,25 µg/ml	17,53	5,19	14,98	3,94
0,125 µg/ml	8,21	2,71	6,92	2,13
0,06 µg/ml	3,43	0,92	3,35	0,97
0,03 µg/ml	1,55	0,45	1,48	0,49
0,015 µg/ml	0,81	0,21	0,92	0,20

Se obtuvo positividad en los resultados en la última concentración evaluada (0,015 $\mu\text{g/ml}$), (índices señalados en rojo) por parte del kit de VirClia para los dos tipos de antígeno (Tabla 88). En el kit de IMMY, se apreció línea de muy baja intensidad a la concentración de 0,03 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 107) y para el kit de OLM, el límite podría estar en 0,06 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 108). Según estos datos, el kit de VirClia fue capaz de detectar positividad a niveles inferiores que los dos kits basados en inmunocromatografía.

b) Ensayo con muestras reales.



Tres muestras negativas y tres muestras positivas de suero fueron evaluadas por el kit IMMY. En paralelo se incluyó el control negativo y el control positivo suministrados en el kit.

- 1: Control negativo
- 2: Control positivo
- 3: Muestra negativa: A-83-033
- 4: Muestra negativa: A-83-008
- 5: Muestra negativa: A-83-028
- 6: Muestra positiva: A-122-031
- 7: Muestra positiva: A-120-025
- 8: Muestra positiva: A-122-035

Se obtuvieron resultados negativos para la muestra 4 y 5 y se observó una línea muy tenue en la muestra 3. Las muestras 6, 7 y 8 mostraron positividad (Figura 109).

Figura 109. Muestras reales sobre kit de inmunocromatografía IMMY.

Por otro lado, las mismas muestras fueron evaluadas por el kit de OLM obteniéndose resultados negativos para las tres primeras y para la A-120-025, la cual presentaba clasificación positiva, y resultados positivos para la A-122-031 y A-122-035 (Figura 110).



Figura 110. Muestras reales sobre kit de inmunocromatografía OLM.

Los resultados de VirClia mostraron concordancia con la clasificación previa de las muestras (Bio-Rad), con resultados negativos en las tres primeras muestras (valores de índice señalados en negro), y en las siguientes, resultados positivos (valores de índice señalados en rojo). Los valores índices, tanto en las muestras negativas y positivas, distaron bastante del punto de corte establecido lo que significa una buena discriminación entre ambas (Tabla 89).

Tabla 89. Muestras reales sobre kit de VirClia.

Alícuota	RLU	Índice
A-83-033	0,23	0,05
A-83-008	0,07	0,02
A-83-028	0,03	0,01
A-122-031	49,59	10
A-120-025	5,24	0,91
A-122-035	74,87	12,58

Se observó una correcta clasificación cualitativa por parte del kit de VirClia con los datos previamente obtenidos de Bio-Rad, es decir, una concordancia del 100%. En cuanto al kit de IMMY, se observó concordancia a excepción del primer negativo donde se apreció una línea tenue (Figura 109) bajando así la especificidad. En cuanto a OLM, se obtuvo lo contrario a IMMY, es decir, peor sensibilidad, al perder uno de los positivos evaluados (Figura 110).

8.2. INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO.

Un panel de 24 muestras de suero fue evaluado por el kit de Bio-Rad, Euroimmun y VirClia siguiendo las instrucciones de uso del fabricante. Los resultados se expresan en DO e índice para Bio-Rad y Euroimmun, por basarse en la técnica ELISA, y en RLU e índice para VirClia, cuyo fundamento es la técnica CLIA (Tabla 90).

Tabla 90. Panel de muestras reales de suero evaluado por Bio-Rad, Euroimmun y VirClia.

Nº	Muestra	BIO-RAD Lote 1D0081		EUROIMMUN Lote E210506AD		VirClia Lote 22C073003	
		DO	Índice	DO	Índice	RLU	Índice
1	8325132	1,083	1,29	0,282	0,671	4,834	0,89
2	8325133	0,066	0,07	0,090	0,214	0,076	0,016
3	8325169	3,702	4,43	1,314	3,129	24,491	5,253
4	8395806	0,074	0,08	0,210	0,500	0,063	0,014
5	8325832	1,054	1,26	0,500	1,190	5,047	0,966
6	8328427	2,741	3,28	0,933	2,221	17,836	3,266
7	8395776	0,032	0,03	0,112	0,267	0,064	0,013
8	8325137	3,376	4,04	1,321	3,145	24,326	4,329
9	8325798	0,143	0,17	0,040	0,095	0,499	0,106
10	8325803	0,361	0,43	0,092	0,219	0,166	0,031
11	8328441	0,936	1,12	0,247	0,588	1,735	0,372
12	8325858	0,037	0,04	0,189	0,450	0,474	0,094
13	8328450	0,030	0,03	0,134	0,319	0,06	0,012
14	8325148	1,339	1,6	0,299	0,712	4,771	0,913
15	8325159	0,181	0,21	0,217	0,517	0,821	0,187
16	8395782	1,727	2,06	0,842	2,005	7,552	1,563
17	8325139	0,042	0,05	0,059	0,140	0,072	0,014
18	8395808	0,385	0,46	0,216	0,514	1,15	0,259
19	8328398	2,950	3,53	1,122	2,671	21,014	4,829
20	8325836	0,133	0,15	0,152	0,362	0,057	0,012
21	8328436	0,796	0,95	0,432	1,029	2,896	0,65
22	8395783	0,042	0,05	0,174	0,414	0,061	0,013
23	8395461	0,026	0,03	0,163	0,388	0,082	0,018
24	8325854	2,347	2,81	0,632	1,505	7,813	1,837

Los valores señalados en rojo en las columnas índice de los tres ensayos corresponden a los resultados positivos según el criterio de interpretación de cada casa comercial. Bio-Rad y Euroimmun no disponen de zona gris por lo que solo, en el caso de VirClia, se señala en verde aquella muestra clasificada como dudosa.

Se realizó, por un lado, el análisis de concordancia entre los tres inmunoensayos enzimáticos a través del cálculo del índice kappa de Cohen y, por otro lado, la correlación entre ellos.

Para el cálculo del índice kappa, se elaboraron las siguientes tablas de contingencia (Tabla 91 y 92):

Tabla 91. Tabla contingencia Bio-Rad vs. Euroimmun y Bio-Rad vs. VirClia.

		Bio-Rad		
		Positivo	Negativo	Total
Euroimmun	Positivo	11	5	16
	Negativo	0	8	8
	Total	11	13	24
VirClia	Positivo	11	1	12
	Dudoso	0	1	1
	Negativo	0	11	11
	Total	11	13	24

Tabla 92. Tabla contingencia Euroimmun vs. VirClia.

		Euroimmun		
		Positivo	Negativo	Total
VirClia	Positivo	12	0	12
	Dudoso	1	0	1
	Negativo	3	8	11
	Total	16	8	24

El mayor grado de acuerdo se obtuvo en la comparación de Bio-Rad y VirClia ($\kappa=0,92$), es decir grado de acuerdo “casi perfecto”; en cuanto a Euroimmun, el grado de acuerdo fue similar tanto si comparamos dicho inmunoensayo con Bio-Rad como con VirClia ($\kappa=0,595$ y $\kappa=0,6$, respectivamente), siendo este “moderado” (Tabla 93). Las discrepancias fueron debidas a la peor especificidad por parte de Euroimmun.

Tabla 93. Índice kappa de Cohen obtenido tras la comparación de Bio-Rad, Euroimmun y VirClia.

	Euroimmun vs. Bio-Rad	VirClia vs. Bio-Rad	Euroimmun vs. VirClia
kappa	0,595	0,92	0,6
Error estándar	0,161	0,079	0,159
95% IC	0,278-0,911	0,766-1,074	0,288-0,912

A continuación, a través de los valores índice obtenidos, se analizó la correlación entre los tres kits (Figuras 111, 112, 113).

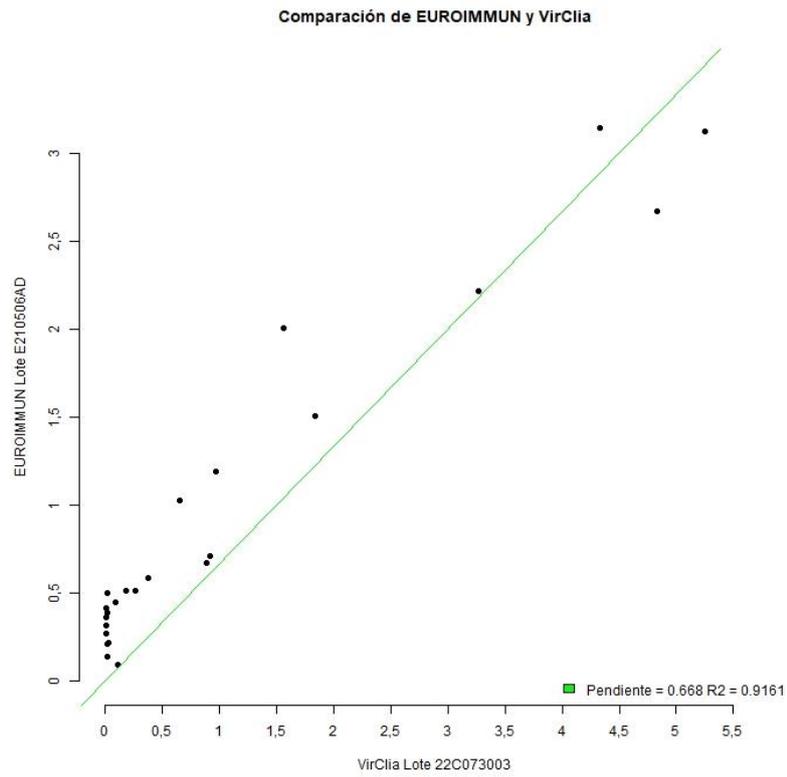


Figura 111. Correlación Euroimmun vs. VirClia.

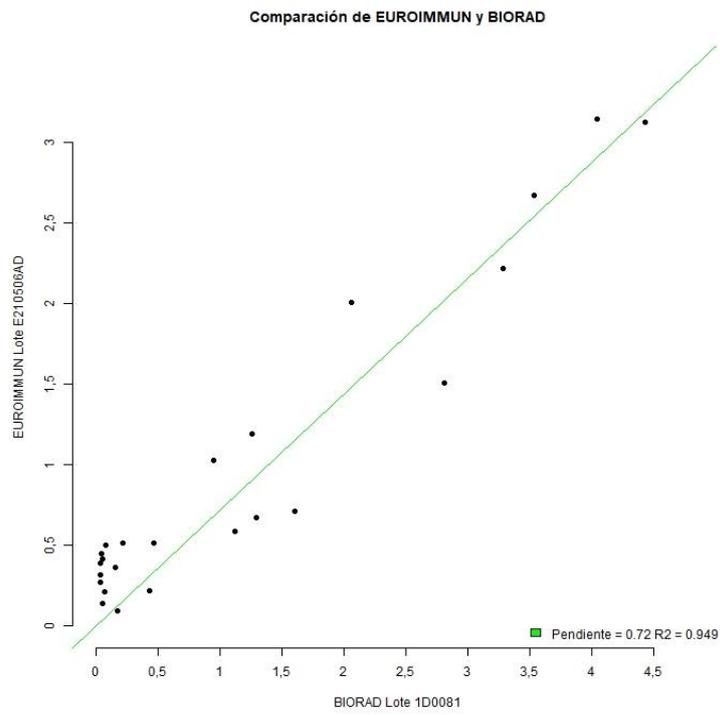


Figura 112. Correlación Bio-Rad vs. Euroimmun.

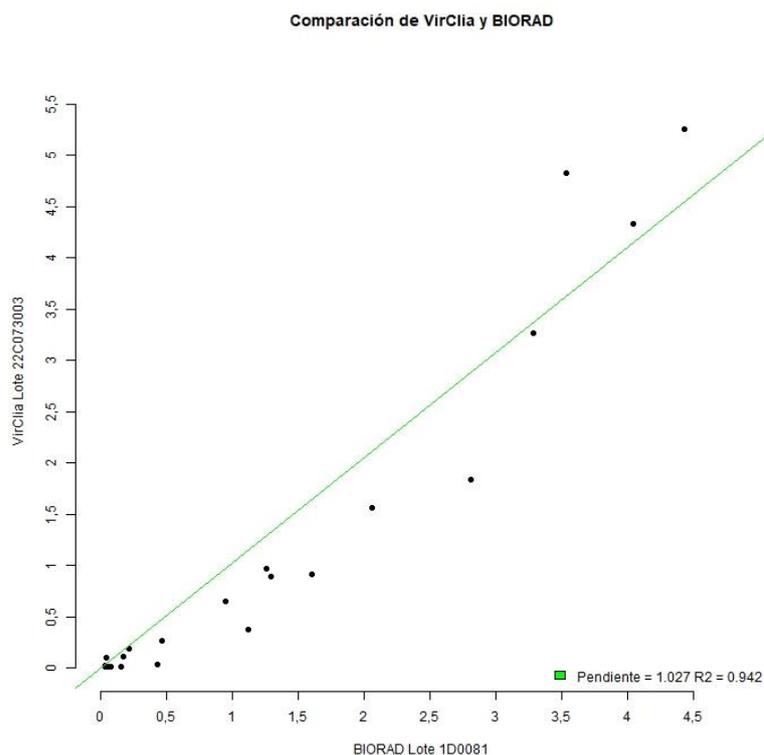


Figura 113. Correlación VirClia vs. Bio-Rad.

Se obtuvo una elevada relación entre ellos, demostrada por el coeficiente de determinación R^2 para ambas técnicas con respecto a Bio-Rad. La comparación Euroimmun y VirClia muestra una correlación ligeramente por encima de 0,9, y en cuanto a nivel de ajuste, la pendiente de la recta refleja que este es menor incluso que el que se observa en la comparación Euroimmun - Bio-Rad ($\gamma=0,668$) (Figura 111). Por otra parte, si se analiza la pendiente de la recta (γ), se refleja un menor grado de ajuste entre los índices obtenidos por Bio-Rad y Euroimmun ($\gamma=0,7197$) (Figura 112) que en la comparación Bio-Rad y VirClia ($\gamma=1,0273$) (Figura 113).

9. ESTRATEGIAS PARA LA CONCENTRACIÓN DE MUESTRAS.

9.1. UNIÓN DE ANTICUERPO MONOCLONAL A RESINAS Y PARTÍCULAS MAGNÉTICAS.

Una de las estrategias usadas se basó en la conjugación del mAB a resina y/o partículas magnéticas. Una vez llevado a cabo el proceso, tuvo lugar la evaluación de las fracciones obtenidas mediante la técnica CLIA. Por un lado, se aplicó un ensayo de captura tipo sandwich para analizar la capacidad de concentración de Ag y, por otro, mediante técnica CLIA indirecta, sensibilizando las placas con las

fracciones obtenidas, se analizó si había existido pérdida de mAB en dichas eluciones una vez llevado a cabo el proceso de cromatografía.

En el caso de la resina preactivada de Sefarosa, se evaluaron distintos tampones de elución y se obtuvieron 6 eluciones o fracciones. Se muestra como “-Col” aquella fracción que no ha sido sometida a la resina, como “E1” y sucesivas las eluciones, y como “+Col” la elución recogida después del proceso de lavado llevado a cabo tras la unión resina-mAB (Tabla 94).

Tabla 94. Valores RLU y diferencias de señal resultantes del ensayo de captura y ensayo indirecto basado en CLIA tras el proceso de cromatografía basado en la unión de mAB a resina.

Tampón elución	Fracción/Elución	CL21-CL21HRP (Captura)	Anti-rata IgG+IgM (Indirecto)	Diferencia señal
UREA	-Col	1,763	N/A	0
	+Col	0,63	0,329	-1,133
	E1	0,668	0,359	-1,095
	E2	1,268	0,329	-0,495
	E3	1,666	0,377	-0,097
	E4	1,598	0,499	-0,165
	E5	2,13	0,697	0,367
GLICINA	E6	2,299	0,689	0,536
	-Col	2,991	N/A	1,228
	+Col	0,56	0,359	-1,203
	E1	1,096	0,349	-0,667
	E2	12,841	0,649	11,078
	E3	10,652	0,497	8,889
	E4	8,344	0,331	6,581
CITRATO	E5	5,543	0,654	3,78
	E6	3,55	0,325	1,787
	-Col	2,127	N/A	0,364
	+Col	0,691	0,446	-1,072
	E1	2,433	0,51	0,67
	E2	9,017	0,618	7,254
	E3	10,204	0,527	8,441
E4	8,091	0,462	6,328	
E5	6,048	0,437	4,285	
E6	4,568	0,674	2,805	

No se observó reacción de la inmunoglobulina anti-rata IgG+IgM sobre las fracciones dispuestas en placa por lo que suponemos que no hubo pérdida de mAB tras el proceso de cromatografía. Por otro lado, dentro de los diferentes tampones de elución, el tampón con Urea presentó señales planas y no hay evidencias de concentración de la muestra empleada, con un valor de “-Col” igual o superior a todas las eluciones excepto a las dos últimas, E5 y E6, siendo estas ligeramente superiores a la misma. En cuanto al tampón Glicina y Citrato, el valor de “-Col” fue inferior o similar a la elución E1 en ambos casos, lo que significa que no hubo concentración en la primera elución resultante; en cambio, a partir de la elución 2, se observaron señales RLU más elevadas, con diferencias de señal superiores en E2, E3 y E4 para el tampón de elución basado en Glicina frente al de Citrato (Tabla 94 y Figura 114).

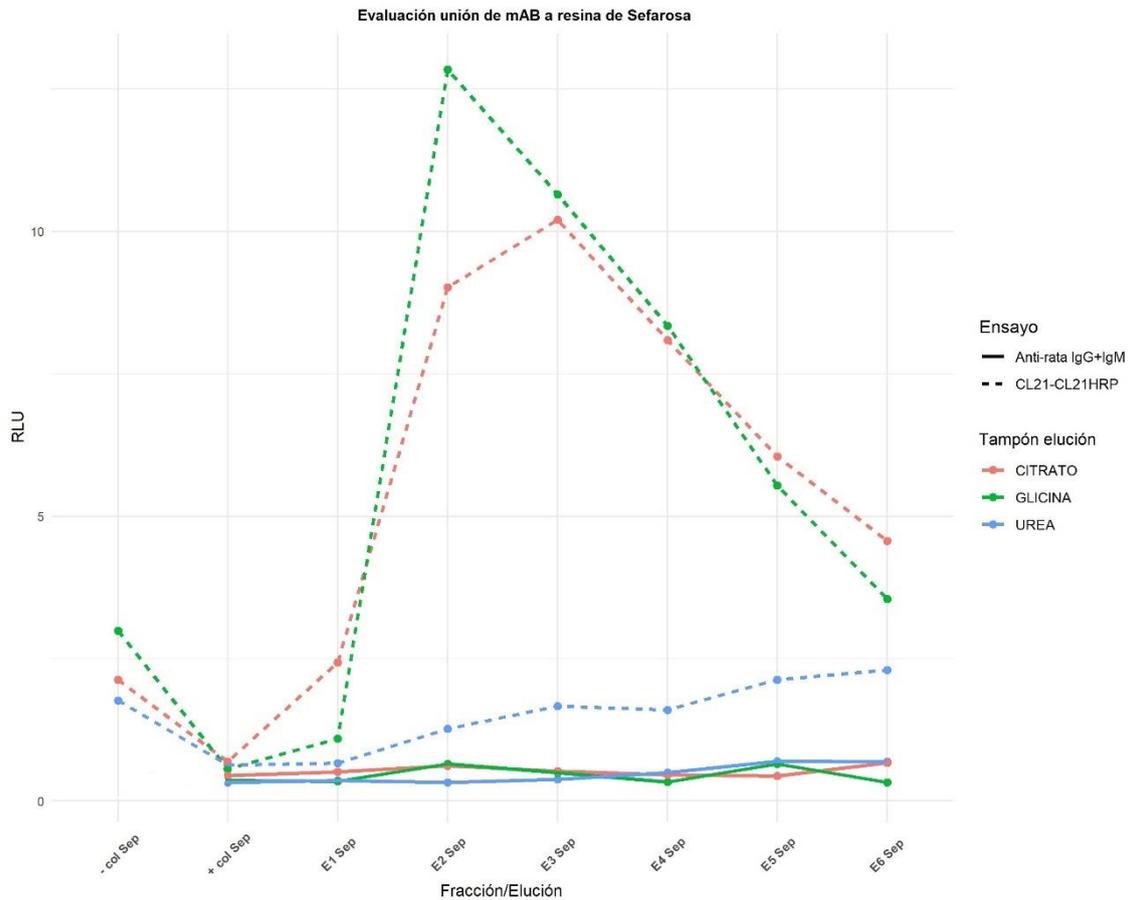


Figura 114. Evaluación unión de mAB a resina de Sefarosa. Resultados expresados en RLU para el ensayo basado en captura (líneas continuas) y para el ensayo indirecto (líneas discontinuas).

En cuanto a la unión de mAB a partículas magnéticas, se llevó a cabo un ensayo donde se evaluaron distintos volúmenes de partículas magnéticas y, al igual que en el caso anterior, se analizó la pérdida de mAB mediante ensayo indirecto. Los resultados se expresaron en valores RLU y se muestra el valor de “-Col”, antes de ser sometido al proceso de cromatografía, las 6 eluciones y “+Col”. En la columna de la derecha, se muestra la diferencia de señal obtenida a partir de la RLU de cada elución y el valor de “-Col” (Tabla 95).

Tabla 95. Valores RLU y diferencias de señal resultantes del ensayo de captura y ensayo indirecto basado en CLIA tras el proceso de cromatografía basado en la unión de mAB a partículas magnéticas.

Volumen partículas (μ l)	Fracción/Elución	CL21-CL21HRP (Captura)	Anti-rata IgG+IgM (Indirecto)	Diferencia señal
	-Col	2,115	N/A	0
100	+Col	1,547	0,432	-0,568
	E1	0,371	0,411	-1,744
	E2	1,431	0,432	-0,684
	E3	0,726	0,51	-1,389
	E4	0,621	0,359	-1,494
	E5	0,33	0,329	-1,785
	E6	0,196	0,421	-1,919
200	+Col	3,223	0,379	1,108
	E1	4,713	0,326	2,598
	E2	1,599	0,333	-0,516
	E3	0,574	0,348	-1,541
	E4	0,668	0,411	-1,447
	E5	0,185	0,497	-1,93
	E6	0,856	0,697	-1,259
300	+Col	2,804	0,496	0,689
	E1	14,517	0,639	12,402
	E2	22,812	0,509	20,697
	E3	17,028	0,566	14,913
	E4	11,913	0,618	9,798
	E5	8,501	0,372	6,386
	E6	6,227	0,353	4,112

Al igual que en el caso anterior, no se observó pérdida de mAB en las eluciones resultantes. En cuanto al ensayo de captura, que evaluó si hubo concentración de la muestra o no, se observó concentración en mayor medida en las eluciones E1, E2, E3 y E4 aplicando un volumen de 300 μ l de partículas magnéticas, siendo estas las únicas donde se obtuvieron diferencias de señales positivas con respecto a “-Col”. El valor RLU obtenido para todas las eluciones, con dicho volumen de partículas, fue mayor que en la condición tomada de partida (“-Col”). Para el resto de volúmenes de partículas, no se observó concentración, con un valor de “+Col” similar a “-Col” (Tabla 95 y Figura 115).

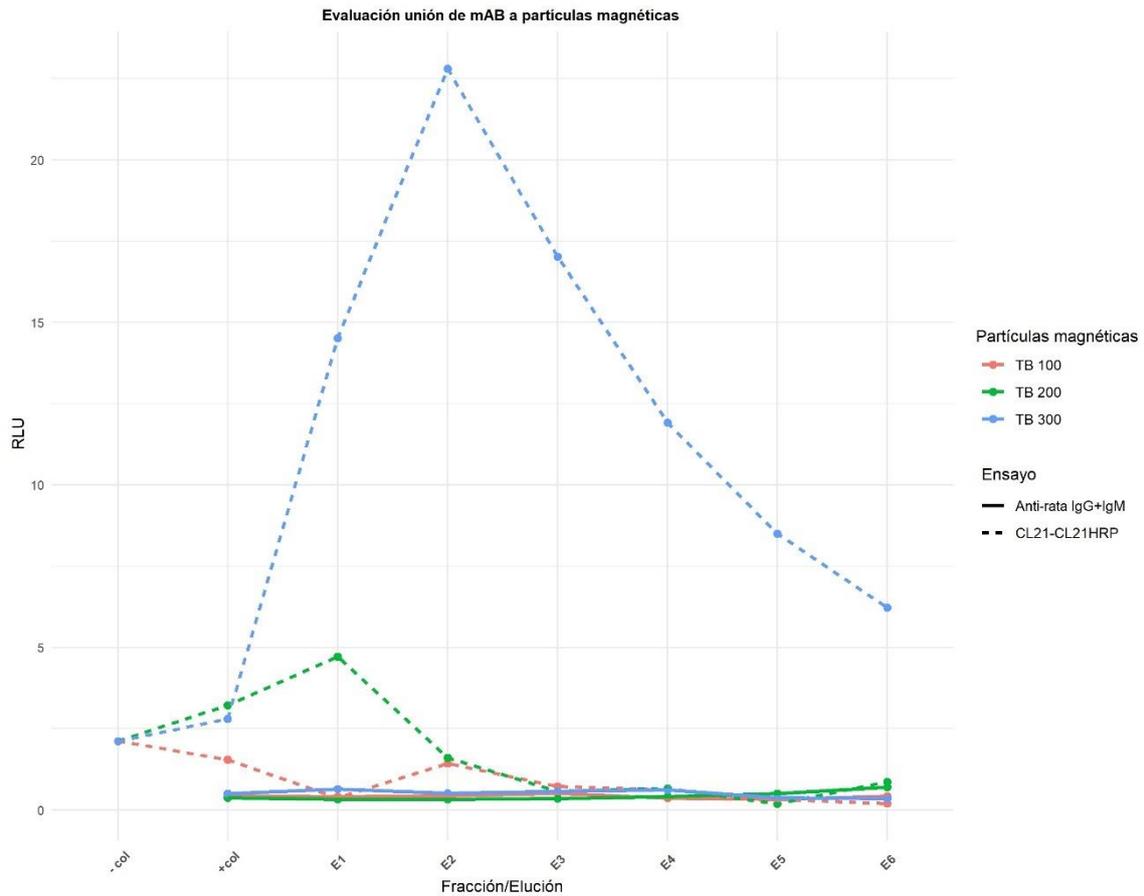


Figura 115. Evaluación unión de mAB a partículas magnéticas. Resultados expresados en RLU para el ensayo basado en captura (líneas continuas) y para el ensayo indirecto (líneas discontinuas).

9.2. UNIÓN DE ANTÍGENO A LECTINAS.

La otra estrategia puesta en práctica tuvo como objetivo el uso de lectinas aprovechando su alta especificidad hacia azúcares. En primer lugar, se analizó la reactividad de lectinas biotinadas sobre placa antigenada. Para ello, se dispusieron dichas lectinas a una concentración determinada, 20 µg/ml, sobre placa con antígeno de bajo peso molecular (Tabla 96). Como las lectinas llevan marca de biotina, mediante estreptavidina peroxidada se pudo revelar la reacción. Dicha reacción se llevó a cabo a través de la técnica CLIA.

Tabla 96. Reactividad de lectinas de distinta naturaleza frente a antígeno de bajo peso molecular.

LECTINA	RLU
1: CONCAVALINA A 20 µg/ml	77,025
2: AGLUTININA DE SOJA 20 µg/ml	8,885
3: AGLUTININA DE GERMEN DE TRIGO 20 µg/ml	34,104
4: AGLUTININA DE DOLICHOS BIFLORUS 20 µg/ml	46,153
5: AGLUTININA I DE ULEX EUROPEAUS 20 µg/ml	36,58
6: AGLUTININA DE CACAHUETE 20 µg/ml	74,08
7: LECTINA I DE GRIFFONIA SIMPLICIFOLIA 20 µg/ml	14,797
8: AGLUTININA I DE RICINUS COMMUNIS 20µg/ml	6,015
9: LEUCOAGLUTININA DE PHASEOLUS VULGARIS 20µg/ml	18,523
10: ERITROAGLUTININA DE PHASEOLUS VULGARIS 20µg/ml	23,074
11: AGLUTININA DE GERMEN DE TRIGO SUCCINILADO 20µg/ml	17,578
12: AGLUTININA DE SOPHORA JAPONICA 20µg/ml	5,451
13: AGLUTININA DE LENS CULINARIS 20µg/ml	16,959
14: AGLUTININA DE PISUM SATIVUM 20µg/ml	18,317
15: LECTINA DE ERYTHINA CRISAGALLI 20µg/ml	20,698
16: JACALINA 20µg/ml	33,475
17: LECTINA DE SOLANUM TUBEROSUM 20µg/ml	4,164
18: LECTINA DE LYCOPERSICON ESCULENTUM 20µg/ml	12,035
19: LECTINA DE DATURA STRAMONIUM 20µg/ml	26,477
20: LECTINA II DE GRIFFONIA SIMPLICIFOLIA 20µg/ml	2,589
21: LECTINA DE VICIA VILLOSA 20µg/ml	15,962
BLANCO	1,413

El fondo de la reacción, expresado en la tabla de arriba como “blanco”, fue la señal aportada por tampón neutro con BSA al 1% (p/v), sin presencia de lectina, más estreptavidina conjugada con peroxidasa. Dicho fondo se representó mediante línea discontinua en la siguiente gráfica, que refleja reacción en mayor o menor medida por parte de todas las lectinas evaluadas, notablemente superior para la concaivalina A (nº1), la aglutinina de germen de trigo (nº3), aglutinina de Dolichos biflorus (nº4), aglutinina de Ulex europeaus (nº5), aglutinina de cacahuete (nº6) y jacalina (nº16) (Figura 116).

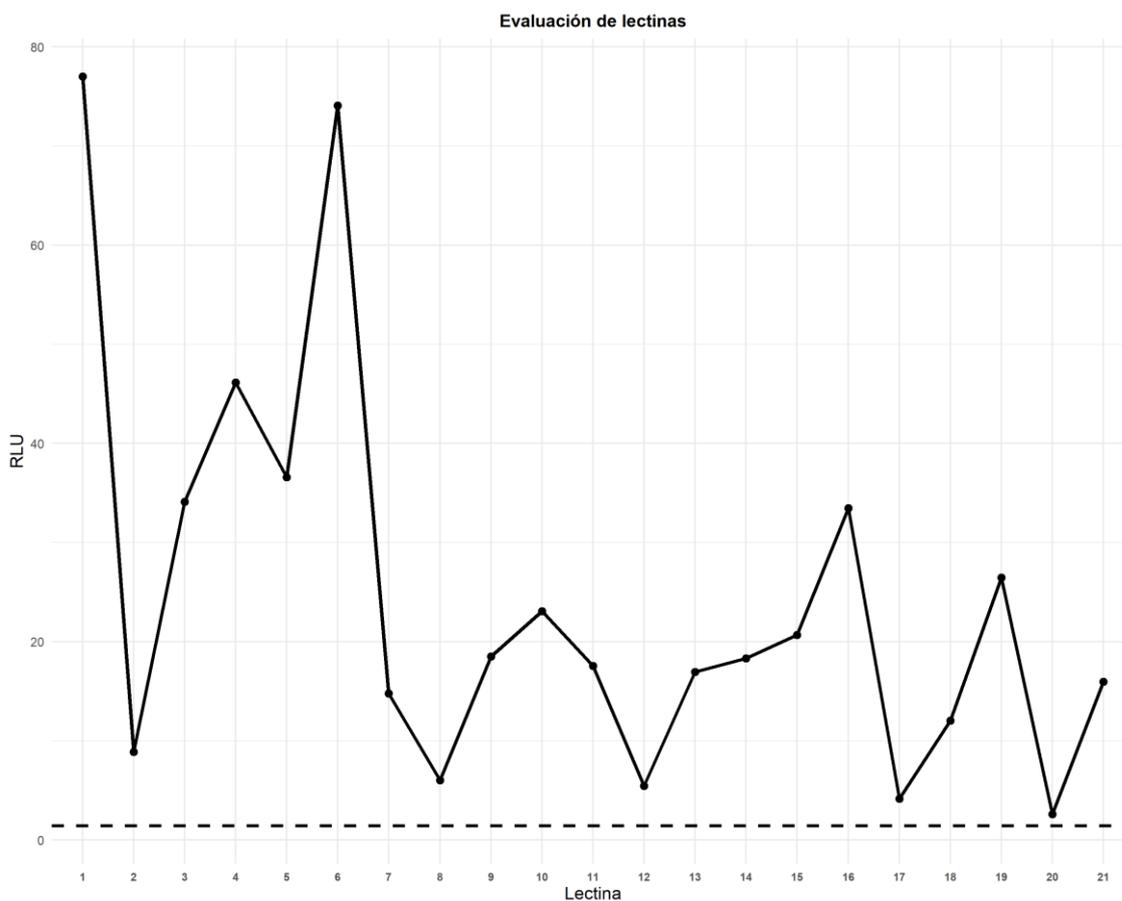


Figura 116. Reactividad lectinas frente a antígeno de bajo peso molecular.

El Dpto. de Proteómica analizó la disponibilidad de resinas comerciales, teniendo en cuenta los resultados anteriores, y adquirió la resina de concanavalina A (ConA) y aglutinina de germen de trigo (WGA, Wheat Germ Agglutinin). En un primer ensayo, se empleó como tampón de elución GlcNAC, azúcar por el que dichas resinas presentan alta afinidad. Este se dispuso a una concentración elevada para desplazar al antígeno de galactomanano que se había unido previamente. Lo que se encontró fue que, en el ensayo de captura, el azúcar presente en el tampón de elución fue detectado y, por tanto, no pudo valorarse la concentración por parte de la resina de concanavalina A ni WGA, ya que dicho tampón aportó interferencia (Tabla 97 y Figura 117).

Tabla 97. Valores RLU y diferencias de señal resultantes del ensayo de captura basado en CLIA tras el proceso de cromatografía basado en la unión de antígeno a lectinas.

Lectina	Fracción/Elución	RLU	Diferencia señal
	-Col	0,471	0
ConA	+Col	0,666	0,195
	E1	17,394	16,923
	E2	8,677	8,206
	E3	3,626	3,155
	E4	5,953	5,482
	E5	2,427	1,956
	E6	1,96	1,489

Lectina	Fracción/Elución	RLU	Diferencia señal
WGA	+Col	0,904	0,433
	E1	15,98	15,509
	E2	19,125	18,654
	E3	19,625	19,154
	E4	18,895	18,424
	E5	22,045	21,574
	E6	19,615	19,144
Tampón unión		0,645	0,174
Tampón elución		18,095	17,624

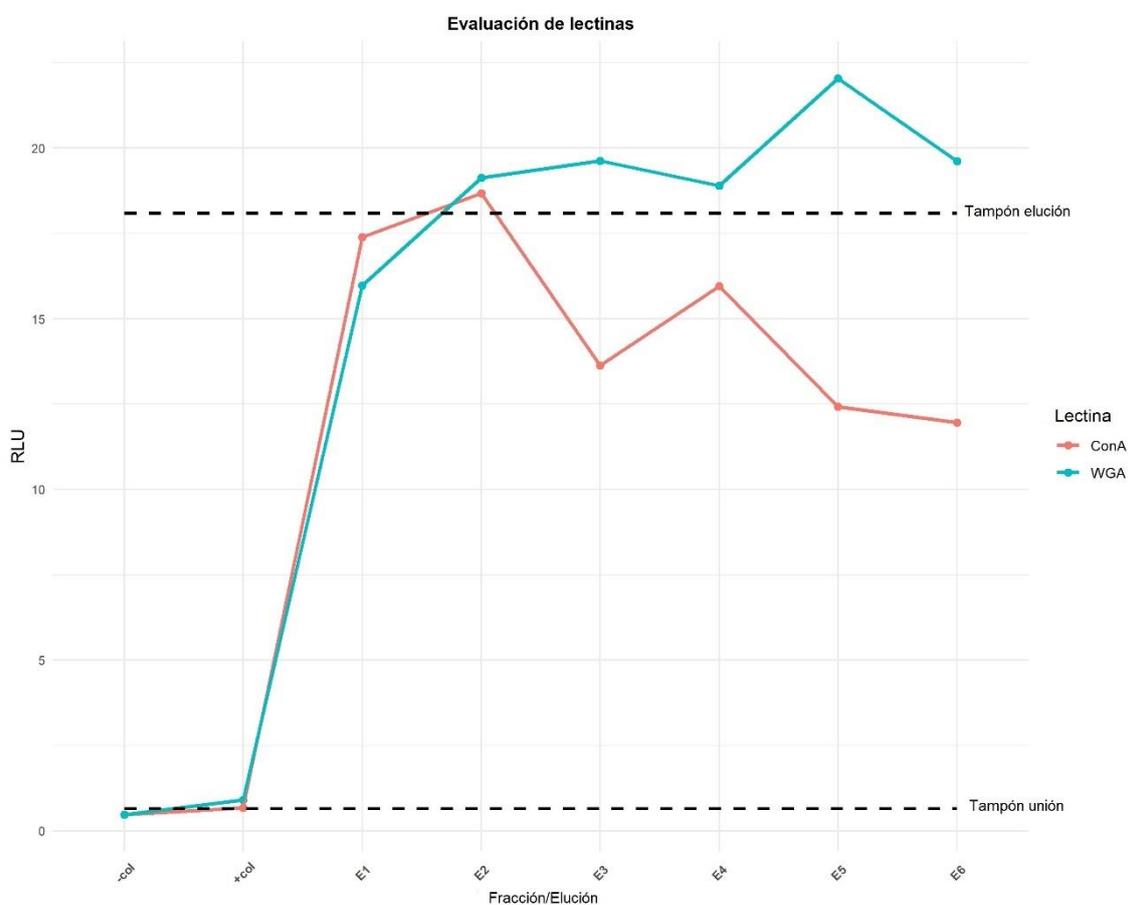


Figura 117. Evaluación unión de antígeno a lectinas. Resultados expresados en RLU para cada una de las fracciones/eluciones (líneas continuas en color), así como del tampón de unión y elución (líneas discontinuas).

Obtenidos los resultados anteriores, se ensayaron otras condiciones donde se modificó la composición del tampón de unión y de elución para evitar reacciones inespecíficas debidos a los mismos (Tabla 98).

Tabla 98. Valores RLU y diferencias de señales resultantes del ensayo de captura tras el proceso de cromatografía basado en el uso de resinas de lectinas.

RESINA/UNION/ELUCION	Fracción/Elución	RLU	Diferencia señal
WGA/ACETICO/ACETICO	-Col	0,310	0,000
WGA/ACETICO/ACETICO	+Col	0,327	0,017
WGA/ACETICO/ACETICO	E1	0,748	0,438
WGA/ACETICO/ACETICO	E2	0,908	0,598
WGA/ACETICO/ACETICO	E3	0,648	0,338
WGA/ACETICO/ACETICO	E4	0,713	0,403
WGA/ACETICO/ACETICO	E5	0,917	0,607
WGA/ACETICO/ACETICO	E6	0,842	0,532
WGA/ACETICO/BORATO	-Col	0,241	0,000
WGA/ACETICO/BORATO	+Col	0,294	0,053
WGA/ACETICO/BORATO	E1	0,196	-0,045
WGA/ACETICO/BORATO	E2	0,263	0,022
WGA/ACETICO/BORATO	E3	0,191	-0,050
WGA/ACETICO/BORATO	E4	0,178	-0,063
WGA/ACETICO/BORATO	E5	0,149	-0,092
WGA/ACETICO/BORATO	E6	0,158	-0,083
CONA/ACETICO/BORATO	-Col	0,279	0,000
CONA/ACETICO/BORATO	+Col	0,771	0,492
CONA/ACETICO/BORATO	E1	10,451	10,172
CONA/ACETICO/BORATO	E2	10,046	9,767
CONA/ACETICO/BORATO	E3	7,327	7,048
CONA/ACETICO/BORATO	E4	6,440	6,161
CONA/ACETICO/BORATO	E5	5,827	5,548
CONA/ACETICO/BORATO	E6	5,599	5,320
CONA/PBS+CATIONES/BORATO	-Col	0,272	0,000
CONA/PBS+CATIONES/BORATO	+Col	0,697	0,425
CONA/PBS+CATIONES/BORATO	E1	7,366	7,094
CONA/PBS+CATIONES/BORATO	E2	8,570	8,298
CONA/PBS+CATIONES/BORATO	E3	7,632	7,360
CONA/PBS+CATIONES/BORATO	E4	7,305	7,033
CONA/PBS+CATIONES/BORATO	E5	7,171	6,899
CONA/PBS+CATIONES/BORATO	E6	7,274	7,002
Tampón AC. ACÉTICO		1,250	N/A
PBS + CATIONES		0,323	N/A
BORATO		0,358	N/A

En cuanto al análisis de la diferencia de señal aportada por cada elución y la condición “-Col”, se observó concentración por la lectina de ConA con tampón ácido acético como tampón de unión y tampón borato como tampón de elución, presentando un mayor nivel en E1 y E2. Por otro lado, también se observaron evidencias de concentración con PBS+Cationes como tampón de unión y tampón borato como elución, pero esta se reflejó repartida a lo largo de las 6 eluciones recogidas con una señal RLU similar en todas ellas. El análisis de los tampones de elución y unión mostró una ligera señal aportada por el tampón de ácido acético y una señal nula para PBS+Cationes y tampón Borato. Hubo signos de concentración, y esta se reflejó a lo largo de las 6 eluciones de cada condición (Tabla 98). Por otro lado, en cuanto a la resina WGA, no hubo evidencias de concentración en ninguna

de las dos condiciones evaluadas, con valores de RLU inferiores al ruido de fondo aportado por los tampones de elución y unión (Figura 118).

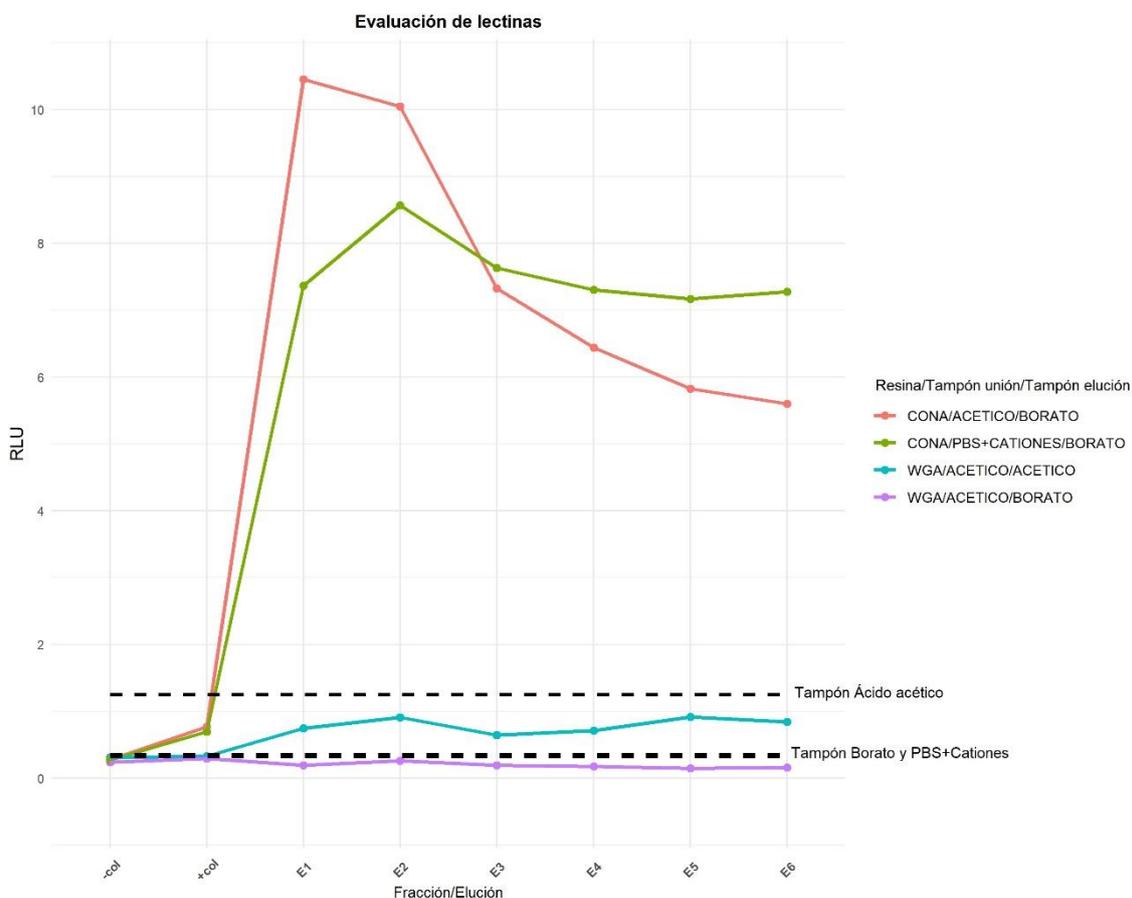


Figura 118. Evaluación concentración basada en el uso de lectinas. Resultados expresados en RLU para las distintas condiciones evaluadas (líneas continuas) y para los tampones de unión y elución (líneas discontinuas).

Para una aplicación práctica en usuario final, lo ideal sería obtener señales RLU más elevadas en las primeras eluciones, para garantizar la concentración de la muestra y disminuir el número de pasos, de forma que se consiga la concentración en 1 o como máximo, 2 eluciones.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Las micosis invasivas son causadas mayoritariamente por *Candida* y *Aspergillus*. Afectan principalmente a enfermos inmunodeprimidos, cada vez más numerosos debido a un aumento en el número de trasplantes y a supervivencias más prolongadas en enfermos de cáncer. Pueden aparecer también en enfermos con un menor grado de inmunodepresión como aquellos con tratamientos prolongados con corticosteroides, enfermos de EPOC o con otras patologías respiratorias como, por ejemplo, las ocasionadas por infecciones víricas como Influenza y SARS-CoV-2.

Dada la gravedad de las micosis invasivas, su diagnóstico de laboratorio requiere de pruebas rápidas que permitan la instauración de tratamientos eficaces en tiempos útiles. Las técnicas convencionales para el diagnóstico de aspergilosis invasiva (AI), como el cultivo o el análisis histológico, tienen las desventajas de ser poco sensibles y dar resultados en tiempos prolongados, lo cual retrasa la aplicación del tratamiento. Mediante un examen microscópico se pueden obtener resultados en un corto periodo de tiempo, aunque con tasas de sensibilidad del 50%⁴⁷. Las imágenes radiológicas no son características de este tipo de infección y su aparición no es frecuente en pacientes no neutropénicos¹⁵⁰.

Los biomarcadores más empleados en el diagnóstico son el β -D-glucano y el galactomanano (GM). El β -D-glucano es un elemento que forma parte de la pared de la mayor parte de los hongos por lo que su detección no es un diagnóstico específico. El GM, es el marcador más empleado por presentarse con gran frecuencia en la pared de *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. Está compuesto por un núcleo de manosa y cadenas laterales de galactofuranosa; estas son las que lo dotan de carácter inmunogénico⁴¹. Es soluble y termoestable y es liberado durante el proceso de invasión. Este componente ha sido el objeto de detección en el kit comercializado por Bio-Rad basado en la técnica de ELISA desarrollada por Latgé¹⁸⁴. El kit de ELISA PLATELIA *Aspergillus* Ag Bio-Rad Laboratories, Inc. es el método diagnóstico más utilizado. Consiste en un inmunoensayo enzimático basado en un sistema de captura tipo sandwich capaz de detectar antígeno de galactomanano en muestras de suero y lavado broncoalveolar (LBA). Un mismo anticuerpo monoclonal (mAB), EB-A2, obtenido en rata, actúa como elemento de captura y elemento detector. Además de servir como complemento de otras técnicas de diagnóstico, ha sido incluido como criterio microbiológico en las definiciones de los tipos de infecciones fúngicas invasivas (IFI) por la EORTC/MSG³. Aunque la duración de la técnica no es demasiado elevada y su alto rendimiento diagnóstico está demostrado por múltiples estudios, conviene mencionar sus inconvenientes principales, el formato de microplaca con pocillos indivisibles y su elevado coste. Además, por cada muestra se necesita el montaje de 4 controles, lo que da lugar al acúmulo de muestras para minimizar el gasto de reactivo, y esto lleva a un diagnóstico tardío.

El objeto de esta tesis ha sido el desarrollo de un kit diagnóstico basado en la técnica de quimioluminiscencia (CLIA) que aporte ventajas sobre el kit de Bio-Rad en términos de facilidad de

uso, rapidez y automatización con similar rendimiento diagnóstico. La técnica CLIA se caracteriza principalmente por su capacidad de amplificación de señal y por una velocidad de reacción más rápida.

El kit desarrollado se ha basado en la detección de antígeno de galactomanano en muestras de suero y LBA. Es un ensayo de captura tipo sandwich, cuyo componente principal es un mAB obtenido en rata. Inicialmente se llevó a cabo un proceso de caracterización, tomando como referencia el mAB EB-A2. Los anticuerpos seleccionados fueron evaluados tanto como elementos de captura como elementos detectores. El mAB elegido, denominado CL21, con isotipo IgM, presentó una elevada fuerza de unión al antígeno y un grado de inhibición del 99% respecto al mAB de Bio-Rad. Esto último puede ser significativo de que ambos mAB se dirigen con alta probabilidad hacia los mismos epítomos. Otra característica fue su alto poder de discriminación con aquellas fracciones antigénicas de diferente naturaleza y peso molecular. Fue el único mAB, de todos los estudiados, que presentó una reactividad notable sobre los antígenos de medio y bajo peso molecular, cubriendo un rango de actividad con antígenos de 13 a 440 kDa. Este mAB, que se usó como elemento de captura, también se conjugó con peroxidasa de rábano picante para ser usado como anticuerpo detector.

Se determinó la concentración adecuada de mAB para sensibilizar la placa y la solución conservante/bloqueante que garantizaba su conservación y el bloqueo de regiones no ocupadas por el mAB. Además, se eligió el tampón empleado para diluir el mAB conjugado con peroxidasa capaz de aportar estabilidad e incrementar la discriminación señal/fondo de la reacción. Se han establecido igualmente los periodos de incubación de la técnica. La definición de cada uno de estos elementos se ha realizado analizando en primer lugar el grado de discriminación y, una vez elegida la condición óptima, por comparación de esta con el resto mediante la aplicación de un test no paramétrico. En todos los casos se encontraron diferencias significativas.

En el diseño de este kit puede sorprender el empleo del mismo mAB como elemento de captura y de detección. En ocasiones cuando se opta por este diseño el mAB conjugado es incapaz de reaccionar frente a epítomos concretos, puesto que estas regiones ya han sido ocupadas por el elemento de captura. Sin embargo, en los ensayos realizados, se vio que la mejor opción era la combinación del mismo mAB para la captura y la detección. Esto puede ser debido al isotipo del mAB, una inmunoglobulina IgM que presenta cinco subunidades y, por otra parte, a la naturaleza y estructura del antígeno de galactomanano que presenta unidades repetidas y favorece así la captura y/o detección.

El empleo de la técnica CLIA, garantiza una mayor amplitud del rango de medida comparando con las técnicas convencionales de ELISA. Esto permite la monitorización de aquellos pacientes en los que se realiza un seguimiento. Si bien el test de ELISA de Bio-Rad, los test inmunocromatográficos o nuestro kit de CLIA son pruebas cualitativas, algunos autores emplean los índices para el estudio de la evolución y respuesta al tratamiento^{46,47,49,76}. Se necesitan más estudios al respecto, pero en estos casos, el mayor rango dinámico del kit de CLIA puede ser una ventaja adicional.

El kit desarrollado se presenta en un formato monodosis que incluye todos los reactivos necesarios listos para su uso, incluidos los controles. Este modo de presentación individualizada garantiza el procesamiento de muestras urgentes sin necesidad de ser acumuladas.

Eliminando del cómputo total el tiempo destinado al pretratamiento de la muestra (común a ambas técnicas) la duración global del kit de Bio-Rad es de 2 horas. La técnica de CLIA emplea periodos de incubación más cortos y, al contrario que Bio-Rad, la incubación de la muestra y el mAB detector se lleva a cabo en dos periodos de incubación independientes. Se consigue así la adecuada captura del antígeno por el mAB inmovilizado en la placa y la detección de aquellos epítomos libres expuestos, a la vez que se elimina la posibilidad del denominado “efecto gancho” o “efecto prozona” cuando la concentración del antígeno es elevada. En estos casos, la formación de complejos antígeno-anticuerpo se ve reducida y esto puede dar lugar a resultados falsos negativos²⁰⁸⁻²¹⁰. El periodo de incubación total de la técnica CLIA es de 50 minutos.

Otro de los objetivos en el desarrollo del kit fue su automatización. La automatización de procesos en el laboratorio de microbiología facilita el trabajo, reduce el número de errores, permite versatilidad en las plantillas y disminuye el tiempo empleado en procesos formativos. El test de CLIA se adaptó a los sistemas automatizados comercializados por VIRCELL S.L. Cada monodosis puede ser procesada de forma automática y reportar datos de la muestra ensayada, del valor de control “cut off” o calibrador y del valor de control negativo. El valor de control “cut off” o calibrador es primordial para la normalización del resultado RLU obtenido para la muestra. Dividiendo la RLU de la muestra entre la RLU del calibrador se calcula el valor de índice y, de acuerdo con la recomendación del fabricante, se establece la clasificación cualitativa de cada muestra. El valor del control negativo, si bien no afecta a la clasificación de la muestra, aporta valor en la validación de la técnica. El valor del control “cut off” o calibrador y el valor del control negativo deben cumplir las especificaciones establecidas por el fabricante, garantizan que la técnica se ha llevado a cabo de forma adecuada y que los resultados obtenidos son óptimos para la interpretación de la muestra. Los valores RLU de los controles nos permiten detectar problemas en los sistemas automatizados por contaminación o por mal funcionamiento. El uso de monodosis desechables del sistema CLIA minimiza la contaminación de reactivos que puede aparecer en los sistemas ELISA. Los tres sistemas automatizados validados para el uso del kit de detección de galactomanano, VIRCLIA[®], VIRCLIA[®] LOTUS y VIRCLIA[®] PLUS, están programados para interpretar los valores de RLU de los controles y de las muestras. En caso de fallo de alguno de los controles se invalidan los resultados obtenidos. Cada método programado se ha ajustado para obtener resultados similares en los tres instrumentos. Debido al fenómeno de deriva observado en el sistema VIRCLIA[®] descrito en “Material y Métodos”, originado por un paso de agitación en este instrumento, se realizó la programación de un nuevo método sin agitación para obtener resultados con una correlación adecuada entre los tres instrumentos. Cuando se realice el montaje de un número reducido de muestras, se empleará el método habitual, donde un número reducido de muestras no se ven afectadas por dicha deriva, siendo este apropiado para muestras urgentes y compatible con el resto de métodos de la línea. En aquellos casos en los que se quieran ensayar 24 pacientes/monodosis al mismo tiempo se debe usar el método que no presenta agitación. Los sistemas VIRCLIA[®] PLUS y VIRCLIA[®] LOTUS constan de un único método, puesto que carecen del paso de agitación y no presentan problemas de deriva.

Finalmente, hay que señalar que el sistema automatizado VIRCLIA® LOTUS cuenta con la opción de “carga continua” y “muestra urgente”. Es decir, en caso de que el instrumento esté en funcionamiento con una carga de trabajo previamente programada, este sistema permite añadir nuevas muestras que comenzarán a ser trabajadas sin necesidad de esperar a que finalice la carga de trabajo anterior. La conclusión del estudio de los valores índices en los tres sistemas automatizados, cuando aplicamos un test estadístico no paramétrico, fue que no existían diferencias significativas entre ellos. Un aspecto importante a tener en cuenta en la automatización es contar con una adecuada higiene. Es necesario seguir estrictamente los procesos de limpieza semanales y mensuales definidos para cada instrumento y controlar la calidad microbiológica del agua destilada empleada en el montaje.

Una vez analizadas las características diferenciales y las ventajas del formato VirClia sobre la técnica de ELISA, se estudió el rendimiento diagnóstico del kit VirClia en comparación con el kit de ELISA de Bio-Rad. Se analizaron muestras de suero y LBA al mismo tiempo por los dos kits para evitar la variabilidad de los resultados ocasionadas por condiciones de conservación^{3,46,47}. Se realizaron dos estudios, uno interno, llevado a cabo en VIRCELL S.L., y otro externo, en 3 hospitales de Madrid. En el estudio interno, se analizaron 518 muestras (206 LBA, 289 sueros y 23 plasmas). Se realizó un análisis ROC con los índices obtenidos por el método VirClia y la interpretación cualitativa de Bio-Rad (punto de corte con un índice > 0,5), encontrándose un AUC = 0,944 (Error estándar=0,011 – 95% IC=0,920-0,962), lo que nos indicó un test con un rendimiento diagnóstico óptimo. El punto de corte se definió en 0,2 con una sensibilidad del 82,5% y una especificidad del 92%, con VPP del 82,2% y VPN del 87,9%. A partir del punto de corte de 0,2 se estableció una “zona gris”. Este rango comprende aquellas muestras clasificadas como “dudosas”. El cálculo, establecido según la experiencia, tomó el punto de corte del análisis ROC y sobre este se restó un 20%. De este modo, se estableció el rango entre 0,16-0,2 de índice. Cuando se obtiene este tipo de resultado se recomienda la repetición del ensayo con una nueva muestra, o con la misma si eso no es posible. Una vez asignada la clasificación cualitativa a cada una de las muestras para la técnica CLIA, se realizó un análisis comparativo con la técnica ELISA de Bio-Rad y se recalcularon los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN. Estos fueron: 89%, 92%, 88% y 92%, respectivamente. El grado de concordancia entre los dos kits fue sustancial ($\kappa=0,726$; Error estándar=0,03 – 95% IC=0,666-0,785).

Se ha estudiado igualmente el efecto de la matriz de la muestra sobre los dos kits. Bio-Rad establece un punto de corte común para muestras de suero y LBA en un índice >0,5, si bien numerosos estudios han establecido un punto de corte superior para muestras tipo LBA, índice >1,0^{75,76,80}, para aumentar así la especificidad de la técnica manteniendo la sensibilidad. Por este motivo, se realizó un estudio pormenorizado de cada tipo de muestra mediante análisis ROC donde este estableció el mismo punto de corte óptimo para ambas, es decir un índice > 0,2, con un AUC=0,974 (Error estándar=0,014 – 95% IC=0,941-0,991) para muestra LBA y un AUC=0,912 (Error estándar=0,018 – 95% IC=0,874-0,942) para muestra de suero, lo que indica un test con valor diagnóstico alto. Una vez asignada la clasificación cualitativa a las muestras, en el estudio frente a Bio-Rad, se obtuvo un 98% de sensibilidad y 93% de especificidad para las muestras de LBA y un 84% de sensibilidad y 89% de especificidad para las muestras de suero. Estos resultados se asemejan a lo declarado en la bibliografía para otros kits de detección de GM donde se obtuvo una mayor sensibilidad para las

muestras LBA frente a las de suero^{123,158}. Solo se han ensayado 23 muestras de plasma y puesto que las 23 han resultado negativas no se ha podido establecer el grado de discriminación ni el punto de corte óptimo para este tipo de matriz.

En el estudio externo multicéntrico se analizaron 327 muestras¹⁹⁷, de las cuales 78 fueron LBA y 249 fueron suero. El análisis del grado de acuerdo y la correlación entre ambas técnicas mostró un grado de acuerdo sustancial y una correlación positiva moderada-fuerte ($k=0,722$ (Error estándar=0,042 – 95% IC=0,639-0,804) y $p=0,718$ (Error estándar=0,000 – 95% IC=0,662-0,767). Estos resultados pueden estar justificados por los valores saturados de DO y RLU en muestras positivas tanto en ELISA como en CLIA. Esta podría ser la razón por la que la concordancia global entre ambas técnicas se ve afectada negativamente. El análisis del rendimiento diagnóstico según la curva ROC realizada con los valores índices de VirClia frente a la clasificación cualitativa de Bio-Rad, mostró un AUC = 0,97 (Error estándar = 0,014 – 95% IC = 0,945-0,985) lo que significa un rendimiento adecuado. Además, merece la pena señalar, que el punto de corte declarado como óptimo a través de este análisis coincide con el obtenido en el estudio interno realizado, es decir, se consideraron positivas las muestras con índices superiores a 0,2. Dentro del presente estudio, se analizaron 120 muestras retrospectivas clasificadas según los criterios EORTC/MSG. Con el objetivo de facilitar la investigación de este tipo de infecciones, los grupos de investigación EORTC y MSG formaron un comité para llegar a un consenso sobre la clasificación de los tipos de infecciones fúngicas invasivas (IFI) en función del grado de inmunodepresión del paciente y de las pruebas diagnósticas. Debido a los avances en las herramientas de diagnóstico y a la aparición de este tipo de infecciones en otros grupos de pacientes, dichos criterios han sido modificados en sucesivas revisiones. Las muestras ensayadas, procedentes del Hospital Gregorio Marañón, se clasificaron según los criterios definidos en 2019. El análisis de este grupo, tomando en este caso como referencia la clasificación de aspergilosis probada/probable, mostró una especificidad igual para Bio-Rad y para VirClia, del 100%, y una sensibilidad mayor para VirClia que para Bio-Rad, 80,9% frente a 63,2%, respectivamente. El análisis ROC de ambas técnicas con respecto a la clasificación EORTC/MSG mostró un elevado rendimiento diagnóstico con un AUC = 0,968 (Error estándar = 0,014 – 95% IC = 0,918-0,991) para VirClia y AUC = 0,957 (Error estándar = 0,018 – 95% IC = 0,899-0,986) para Bio-Rad. En general, se encontraron resultados equivalentes para ambos kits y la sensibilidad de VirClia fue incluso mayor en las muestras con clasificación según los criterios EORTC/MSG.

Según los resultados obtenidos en ambos estudios, se definió el punto de corte para VirClia en un índice $\geq 0,2$. La técnica CLIA se caracteriza por presentar medias de las muestras negativas más bajas y, por tanto, límites de detección inferiores y un mayor rango dinámico. La técnica VirClia permite la obtención de resultados en “zona gris” y la clasificación de estas muestras como “dudosas”. Estas deben de ser interpretadas mediante otras evidencias clínicas, pruebas de laboratorio o reevaluación. Bio-Rad, en cambio, no incluye ninguna “zona gris”, pero en sus instrucciones de uso recomienda interpretar con cautela los resultados cercanos a 0,5, de forma que el valor predictivo es menor en muestras con índices entre 0,5-1,0. No se ha tenido información de datos clínicos u otras técnicas complementarias de las muestras evaluadas a excepción de las 120 muestras clasificadas

según EORTC/MSG. Este fue el motivo por el cual se ha tomado como técnica de referencia el test de ELISA de Bio-Rad.

El rendimiento de la técnica se ha obtenido considerando el conjunto de muestras como población general. Una de las limitaciones fue no contar con población pediátrica donde la AI es la infección fúngica más frecuente⁷⁵. Bio-Rad dispone de estudios para este tipo de población donde se obtiene un rendimiento diagnóstico equivalente empleando el mismo punto de corte que para población adulta^{47,211}. Relacionado con la población infantil, varios autores han declarado reactividad del mAB EB-A2 en niños colonizados por *Bifidobacterium* spp. que dieron lugar a resultados falsos positivos²¹²⁻²¹⁴.

En cuanto a las prestaciones analíticas, se ha determinado la repetitividad y reproducibilidad de VirClia para conocer la variabilidad intra e interensayo. Existen numerosas referencias bibliográficas del kit de Bio-Rad que determinan la variabilidad producida por el tratamiento y/o conservación de las muestras, la capacidad técnica del operador o las condiciones ambientales de laboratorio; a esto hay que añadir la variabilidad intrínseca de la técnica^{128,215,216}, que habitualmente viene determinada por la placa de reacción. Este hecho nos llevó a evaluar diferentes condiciones de sensibilización y a seleccionar aquellas que garantizaran la orientación adecuada del mAB. El análisis de la variabilidad aportada se realizó siguiendo una guía CLSI, empleando 4 muestras, dos negativas y dos con distinto nivel de positividad. Los resultados pusieron de manifiesto que se cumplían las especificaciones establecidas, es decir un CV < 20%; se obtuvo un CV < 9% en el caso de la muestra positiva baja y un CV < 6% en el caso de la muestra positiva alta. La muestra denominada “positiva baja” es el calibrador del kit, que se usa para la normalización de los resultados RLU. Es importante que esta muestra no presente una elevada variabilidad para evitar cambios en la interpretación cualitativa de las muestras. En el análisis de las muestras negativas, se analiza la clasificación cualitativa de la muestra y no el porcentaje de CV pues en valores muy bajos de RLU el porcentaje de variabilidad aumenta notablemente por muy débil que sea la oscilación. Para estas muestras, el objetivo deseado de ausencia de modificación en la significación cualitativa de la muestra se cumple en todos los casos.

El uso de los test inmunocromatográficos se ha extendido durante la pandemia de SARS-CoV2. Hemos examinado el comportamiento de este tipo de test, que proporcionan resultados de una manera rápida. Estos se basan en la conjugación de mAB y/o antígenos a membranas de nitrocelulosa. Se ha realizado un pequeño análisis de los kits de inmunocromatografía comerciales diseñados para el diagnóstico de AI. Para su uso en el laboratorio de microbiología, donde se realiza el diagnóstico de AI, debería asociarse a una lectura digital que permita tener registros de los resultados y evite la subjetividad de una lectura visual¹⁵⁴. Al igual que ocurre en la técnica ELISA, aquellas muestras positivas que se encuentren cercanas al límite superior de detección de la técnica, dan un valor saturado e impiden su uso en el seguimiento del enfermo. La revisión bibliográfica del uso de test inmunocromatográficos señala una sensibilidad mayor en muestras de suero que en LBA con respecto a la técnica ELISA^{154,159,217}. El uso de este tipo de técnicas puede resultar de utilidad para el procesamiento de un número limitado de muestras, pero los formatos micropalca de ELISA o monodosis de VirClia son más adecuados para procesamiento de un número elevado. Se recomienda

su uso como complemento de las técnicas de detección de galactomanano por métodos de ELISA y VirClia y de la técnica PCR^{158,218,219}.

Los dos kits inmunocromatográficos más conocidos en el diagnóstico de AI son sona *Aspergillus* GM de IMMY y AspLFD *Aspergillus* de OLM Diagnostics. La ejecución del primero emplea 30 minutos y requiere pretratamiento de las muestras. El segundo emplea 15 minutos y no necesita pretratamiento de las muestras. Según los datos declarados por el fabricante, el kit de IMMY tiene una sensibilidad del 97% y una especificidad del 98% para muestras de suero (N=32) y del 91% y 92%, respectivamente, para muestras LBA (N=11). En un ensayo posterior, donde el tamaño muestral fue superior (100 muestras), se encontraron sensibilidades y especificidades del 78,6-80,5% y 74-83% para suero y LBA, respectivamente²²⁰. En todos estos estudios el kit de referencia fue el ELISA de Bio-Rad.

AspLFD *Aspergillus* de OLM Diagnostics declara, según su fabricante, una sensibilidad mayor para LBA que para suero (71% y 56%) y una especificidad del 90% para ambos tipos de muestras. En un estudio reciente realizado con 247 muestras de LBA de pacientes hematológicos, se halló una sensibilidad del 71% y una especificidad del 86%²²¹.

Basándonos en lo publicado, ambos test inmunocromatográficos presentaron tasas inferiores de sensibilidad y especificidad que las obtenidas con VirClia.

Se analizó la capacidad de discriminación entre muestras de suero negativas y positivas, así como el límite de detección frente a antígeno purificado por parte de este tipo de kits. Se empleó antígeno de galactomanano purificado de bajo peso molecular para el kit de IMMY y VirClia y antígeno purificado de glicoproteína para el kit de AspLFD y VirClia, dado que la diana del primero es el galactomanano y del segundo, la glicoproteína. El límite de detección fue de 0,015 µg/ml para VirClia con ambos tipos de antígeno, 0,03 µg/ml para el kit de IMMY y 0,06 µg/ml para AspLFD. También se evaluó un número limitado de muestras de suero en paralelo por los tres sistemas. Estas habían sido previamente caracterizadas por la técnica de referencia ELISA de Bio-Rad. Los resultados obtenidos mostraron mayor sensibilidad y especificidad para VirClia que en los sistemas de flujo lateral. Hay que señalar como limitación del estudio el número reducido de muestras, el no contar con muestras de LBA y la imposibilidad de obtener un resultado digital que evite la subjetividad de la lectura. Solo IMMY cuenta con la opción de lectura a través de un analizador digital, pero este no se considera imperativo para el uso del kit.

En cuanto a los kits comerciales basados en un inmunoensayo enzimático, se realizó un estudio comparativo con otro kit de ELISA comercial, Euroimmun (*Aspergillus* antigen Ref. EQ 6911-9601). La duración de la técnica es de 2 horas y 15 minutos, su diana es antígeno de glicoproteína y, según declara el fabricante, se trata de un ensayo cuantitativo. Los resultados se expresan en pg/ml al no existir un calibrador internacional. Además de la duración, este kit tiene el inconveniente de requerir un gasto extra de 6 pocillos de reacción para el montaje de los controles con los que se obtiene la curva patrón.

Se ensayaron 24 muestras de suero en paralelo por los tres kits tomando como referencia el kit de ELISA de Bio-Rad. Se halló un elevado grado de acuerdo entre Bio-Rad y VirClia ($\kappa=0,92$) y un nivel de concordancia “moderado” entre Bio-Rad y Euroimmun y entre Euroimmun y VirClia ($\kappa=0,595$ y $\kappa=0,6$, respectivamente). Las discrepancias indican falta de especificidad por parte de Euroimmun; esas muestras fueron coincidentes en VirClia y Bio-Rad. En cuanto al análisis de correlación con los valores índices de cada test, se obtuvo una correlación positiva para ambos con respecto a Bio-Rad ($r=0,962$ para Euroimmun y $r=0,964$ para VirClia).

Basado también en la técnica ELISA, se analizó el kit CHORUS *ASPERGILLUS* GALACTOMANNAN Ag DIESSE. No se ha incluido en el análisis previo ya que no se dispuso del sistema automático necesario para realizar la técnica. Solo se llevó a cabo un ensayo manual de inhibición con el objetivo de analizar la naturaleza del mAB empleado por este kit. Cabe señalar que la automatización del kit solo es compatible con 2 kits de diagnóstico de la misma casa comercial, que la duración de la técnica es de 2 horas y que, además, necesita de un gasto extra de reactivo para el montaje de los controles.

Finalmente, en el análisis de técnicas diagnósticas para AI hay que hacer una pequeña mención a la biología molecular. La técnica de PCR proporciona gran especificidad, puede dar información a nivel de especie y es de utilidad en la detección de especies resistentes a azoles. Existen varios kits comerciales que pueden ser usados con muestras de suero, sangre total y LBA. Los mejores resultados se obtienen en muestras respiratorias y en pacientes hematológicos. Los principales inconvenientes de estas técnicas son sus altos costes, requieren personal entrenado, necesitan medidas ambientales exigentes para evitar contaminaciones y los tiempos de realización de la técnica no son menores que los de ELISA o CLIA. Puesto que la sensibilidad de los kits de biología molecular para diagnóstico de AI no es alta se recomienda su uso en combinación con técnicas de detección de galactomanano^{47,222-224}.

Cuando se analiza la idoneidad de los distintos tipos de muestras para el diagnóstico de AI, hay que tener en cuenta algunos factores como el estado crítico de muchos pacientes, en los que puede no estar indicada la aplicación de procedimientos invasivos. Por esta razón, en muchos casos solo se dispone de muestra de suero. En pacientes hematológicos, es posible detectar galactomanano sérico 5-8 días previos a la aparición de signos y síntomas²²⁵. Sin embargo, en muchos casos se necesita la obtención de muestra de LBA, ya que la sensibilidad es superior, especialmente en pacientes no neutropénicos^{47,48,76,118,123,159,160} y, también, en aquellos pacientes que han recibido terapia de profilaxis antimicótica^{161,162}. En pacientes neutropénicos, la respuesta inmune se encuentra alterada, por lo que los niveles séricos de antígeno de galactomanano son mayores. En casos de pacientes no neutropénicos, con aspergilosis pulmonar crónica, con aspergiloma o aspergilosis pulmonar asociada a COVID-19 (CAPA), los niveles de antígeno circulante pueden verse reducidos debido a la unión de los neutrófilos al antígeno de galactomanano a través de sus receptores de manosa^{46-48,159}, o a la existencia de menores tasas de angioinvasión, lo que hace que la infección se localice en las vías respiratorias. Probablemente esto explica que la mayor sensibilidad en suero se asocia a pacientes neutropénicos, mientras que en pacientes no neutropénicos la sensibilidad es mayor en LBA. Algunos autores sugieren el empleo de un criterio combinado en el análisis de estas dos muestras en el mismo paciente basado en “al menos una prueba positiva” para los últimos tipos

de pacientes²²⁶. Se ha descrito una reducida sensibilidad en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica y síndrome de Job^{227,228}.

Desafortunadamente no dispusimos de información clínica de las muestras evaluadas. Sí se pudo analizar el comportamiento de los distintos tipos de muestras. En el estudio realizado para muestras de suero y LBA, se obtuvo, con el mismo punto de corte, un rendimiento diagnóstico óptimo según los valores obtenidos de AUC, con tasas de sensibilidad y especificidad del 84-89% para suero y del 98-93% para LBA. Estos datos son coincidentes con los descritos en la bibliografía^{47,76,123,158}.

Aunque la detección de galactomanano solo está validada para muestras de suero y LBA, algunos autores han ensayado otras muestras como esputos, orina o líquido cefalorraquídeo en ensayos de ELISA y PCR. Se recomienda el tratamiento con ditiotreitól (Sputasol) de las muestras de esputo para mejorar su homogeneidad. Fayemiwo y colaboradores realizaron un estudio en este tipo de muestras donde se comparó la técnica PCR con el kit de ELISA de Bio-Rad. En este se obtuvieron valores elevados de índice para la técnica ELISA, que fueron confirmados por cultivo, y resultados negativos por PCR⁸⁰. Respecto a las muestras de orina, se reporta baja sensibilidad²²⁹. Marr y colaboradores estudian un mAB denominado Mab476 que es capaz de detectar antígeno fúngico de bajo peso molecular en muestras de orina de ratones y cobayas²³⁰. En estudios realizados con el kit de ELISA de Bio-Rad se describen bajas tasas de sensibilidad que pueden ser debidas a la ausencia de largas cadenas de galactofunarosa en orina. Se recomienda un punto de corte inferior al que se emplea para suero y LBA²³¹ y, además, el almacenamiento a -80°C, así como el uso de métodos de diálisis, centrifugación, filtración y concentración de la muestra¹⁸⁴. Por otro lado, al emplearse un procedimiento invasivo, hay pocos estudios sobre el uso de líquido cefalorraquídeo. En ellos detectan antígeno de galactomanano para el diagnóstico de aspergilosis cerebral. Actualmente no hay un punto de corte definido para este tipo de muestras, aunque la técnica ELISA ha mostrado un rendimiento diagnóstico alto²³².

En relación con las muestras biológicas que se emplean en la técnica, se han analizado 12 procedimientos distintos previos a su montaje. El procedimiento empleado por Bio-Rad y por la mayoría de inmunoensayos se basa en la característica termoestable del antígeno de galactomanano. Este método consiste en aplicar a la muestra un agente quelante, un paso de ebullición y, por último, una centrifugación para obtener el antígeno libre en el sobrenadante. El agente quelante y el calor garantizan la precipitación de proteínas y la disociación de inmunocomplejos.

Al ser un proceso tedioso, se han estudiado distintas estrategias con el propósito de simplificarlo. Estas se han basado en el uso de agentes que actúan en la disociación de proteínas, diferentes periodos y temperaturas de incubación y centrifugación. La condición tomada como referencia fue la solución de tratamiento y el procedimiento empleado por Bio-Rad, el cual había sido descrito por Reiss y colaboradores en su ensayo de detección de manano de *Candida tropicalis*¹⁹³.

No se observó discriminación entre las muestras negativas y positivas en la mayoría de los procedimientos ensayados. En tres de ellos no hay pérdida de señal en las muestras positivas, pero el ratio señal/fondo es notablemente inferior que el obtenido por el tratamiento de referencia. Tras

los resultados obtenidos, se eligió como método de tratamiento el uso de un tampón neutro con EDTA con un posterior paso de ebullición y centrifugación.

Es importante conocer las condiciones de almacenamiento y conservación de las muestras que se van a procesar, pues pueden sufrir procesos de contaminación que podrían dar lugar a resultados falsos positivos o de degradación que podrían dar falsos negativos. Se ha visto en algunos trabajos una disminución de falsos positivos en muestras congeladas que puede ser debida a una pérdida de afinidad del mAB^{215,233,234} o al deterioro de algunos epítomos durante los procesos de congelación/descongelación. Sin embargo, estos procesos pueden también afectar a las muestras positivas disminuyendo la sensibilidad de los kits cuando se usan muestras que se han mantenido congeladas.

En nuestro caso, se llevó a cabo un estudio de conservación y almacenamiento de las muestras para definir la estabilidad de las mismas mediante ciclos forzados de congelación-descongelación. Se vio que tras dos ciclos de congelación-descongelación, el porcentaje de caída de señal RLU oscilaba entre 8-15%. Esta caída fue mayor cuando se sometían a 3 y 4 ciclos. Estos resultados discrepan con lo que se declara en las instrucciones de uso del kit de Bio-Rad, donde afirman que los sueros pueden someterse a 4 ciclos de congelación-descongelación. Una limitación de este ensayo fue el no poder disponer de muestras en volumen en torno al punto de corte de la técnica, esto nos habría dado información sobre si en muestras límite los procesos de congelación/descongelación pueden cambiar la clasificación cualitativa de las mismas. En un estudio realizado con el kit de Bio-Rad, se ensayaron muestras de suero y LBA conservadas a -20°C ²³⁵, a tiempo 0, tras 11 meses (vida útil del kit) y tras 5 años, con buenos resultados. La correlación en señales DO obtenidas antes y después del almacenamiento en muestras de LBA fue menor que la obtenida en muestras de suero. Existen varias teorías que justifican este fenómeno, una es que pueden haberse dañado las cadenas de galactofuranosa, diana del mAB, o que los polimorfonucleares y macrófagos alveolares se lisen durante el almacenamiento y su contenido se libere al medio, acidificándolo y degradando las cadenas laterales de galactofuranosa. Otro estudio, llevado a cabo por Johnson y colaboradores²³⁶, analizó la estabilidad de muestras de suero y LBA conservadas a corto y largo plazo a 4°C y -80°C . Se observó una caída de señal de la DO en las muestras de suero conservadas tanto a corto como largo plazo, pero no en LBA. En cuanto a nuestro estudio de estabilidad real, no se observaron diferencias significativas en las muestras que habían sido conservadas durante 2 años a -80°C con respecto a los resultados de la muestra testigo evaluada al inicio. Los valores de RLU obtenidos para ambas condiciones fueron similares, se obtuvo una recta de correlación por encima de 0,9. Con respecto a la naturaleza de la muestra, se obtuvo en promedio 7,09% (N=5) de caída de señal para las muestras de suero y 9,54% para las muestras LBA (N=3). Debido al número reducido de muestras y al comportamiento similar en ambos tipos de muestras, no pudimos concluir si el deterioro puede estar asociado al tipo de matriz o es dependiente de cada muestra. No se apreció una tendencia clara de deterioro que se pudiera relacionar con el tipo de muestra ensayada, como la que observan Johnson y colaboradores en el estudio antes mencionado.

En diferentes estudios se había observado que las señales de DO obtenidas en los sobrenadantes de las muestras que habían sido previamente pretratadas con la solución de EDTA, centrifugadas y conservadas a 4°C, no ven modificada su clasificación una vez que se repite el ensayo pues todas ellas permanecieron como positivas. La variabilidad en los índices en muestras de suero puede ser mayor que en muestras de plasma, esto se ha asociado a que las muestras de plasma se recogen en tubos con EDTA como anticoagulante, el cual puede servir como estabilizante²³³. Por último, en cuanto a la estabilidad del sobrenadante obtenido tras el pretratamiento de las muestras con EDTA y calor, se halló una adecuada conservación pasadas 48 horas a 2-8°C, con solo un 3,4% de caída de la señal RLU. Dicho sobrenadante mantuvo también su valor RLU durante 1 semana a -80°C con un 4,4% de caída. Periodos de 1 y 2 semanas a 2-8°C o 2 semanas a -80°C produjeron caídas de 14,3%, 45,4%, 39,2%, respectivamente. Es importante conocer cómo de estable es el sobrenadante para poder repetir la técnica en caso necesario.

Entre las limitaciones de nuestros estudios de estabilidad señalamos la falta de volumen suficiente para alcanzar un tamaño muestral razonable. Otra limitación fue no disponer de muestras que presenten valores de positividad en el límite de la técnica, ya que puede ser donde mejor se analizaría el efecto de la congelación. También hay que contar con la variabilidad del pretratamiento de la muestra, la heterogeneidad presente en las muestras de LBA y la variabilidad inter-lote e inter-operador. En muchos estudios no se dispone de la información clínica, por lo que las muestras no pueden clasificarse como verdaderas positivas o negativas. Por todos estos motivos, se han usado muestras artificiales sobre las que se ha añadido antígeno purificado de galactomanano. Estas se han empleado en el estudio del efecto de los ciclos forzados de congelación-descongelación y en el análisis del sobrenadante tras el pretratamiento. Para el ensayo de estabilidad real a -80°C sí se han usado muestras reales y la clasificación cualitativa de las mismas vino dada por Bio-Rad.

Tal y como se ha descrito anteriormente, en pacientes no neutropénicos la cantidad de antígeno circulante es reducida, por lo que en muestras de suero la sensibilidad es baja. Con el objetivo de mejorar la sensibilidad en ese y otro tipo de muestras, como puede ser la orina, se buscó diseñar un mecanismo de concentración. Aprovechando la naturaleza glucídica del antígeno y su capacidad de unión a lectinas, se ha estudiado el efecto de la concentración de muestras usando resina conjugada con concanavalina A. Para ello se realizaron ensayos con muestras artificiales (antígeno de galactomanano de bajo peso molecular diluido en tampón neutro) con las que se obtuvieron evidencias de concentración y discriminación entre la señal obtenida en cada elución y el fondo de reacción. Como limitación de este diseño se encuentra el uso de muestras artificiales, sin saber cómo pueden influir las distintas matrices reales en el sistema y, por otro lado, se necesita optimizar el número de eluciones obtenidas ya que, para una aplicación práctica, estas deberían ser 2 como máximo.

Otro aspecto objeto de estudio fue conocer la vida útil que presenta el kit de diagnóstico, es decir, su estabilidad traducida en tiempo de caducidad. Existen algunos estudios descritos en la bibliografía, donde se analizan diferentes condiciones forzadas que pueden predecir la vida útil de un producto,

como por ejemplo, 7 días a 37°C equivaldría a 1 año entre 2-8°C¹⁸⁶. Basándonos en esto, se realizó un primer estudio que se denominó estabilidad acelerada o forzada, donde el kit fue sometido a distintas condiciones de temperatura que permitieron predecir la estabilidad real de los kits. La estabilidad forzada de los kits durante 12 días a una temperatura de 37°C fue adecuada y nos indica que estos serían estables durante 20 meses a 2-8°C. Además, se sometieron a cambios de temperatura entre -80°C y 37°C, y se mantuvieron a esta última temperatura durante 7 días, sin apreciar caídas significativas. Por otro lado, las tiras de reacción se mantuvieron fuera del envase original a temperatura ambiente durante 12 horas, y en este caso, tampoco se apreció deterioro en la funcionalidad de las mismas. Por último, y para respaldar los datos obtenidos en el estudio de estabilidad forzada, se han realizado ensayos de estabilidad a tiempo real durante 15 meses (fecha de caducidad el kit), sin que se aprecien signos de degradación significativos.

Como se ha descrito anteriormente, el GM está presente en la pared celular de numerosas especies de *Aspergillus*, así como en *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Histoplasma* y *Candida* spp.^{117,119,122,198,225,237}. Se han descrito reacciones cruzadas frente a estos microorganismos y también frente a antibióticos, ya que la mayoría de ellos se originan a partir de cultivos de *Penicillium*. Los antibióticos estudiados fueron la piperacilina-tazobactam²³⁸⁻²⁴⁰, amoxicilina y amoxicilina-clavulánico^{202,203,241}. Bio-Rad declara la reactividad del mAB EB-A2 frente a las cadenas laterales de galactofuranosa^{157,199} presentes en la pared celular de *Aspergillus fumigatus* y otras especies de hongos. Por estos motivos, se hicieron pruebas de reacción cruzada del kit de VirClia frente a otras especies y géneros de hongos. Se obtuvieron resultados positivos frente a todas las especies de *Aspergillus* ensayadas (*A. terreus*, *A. niger*, *A. flavus*), frente al género *Penicillium* spp. y frente a la especie *Histoplasma capsulatum*. No se vio reactividad cruzada frente a *Cladosporium* spp., género *Fusarium* (*F. oxysporum* y *F. solani*), *Paecilomyces variotii*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichoderma virens* o *Candida albicans*. *Penicillium* y todas las especies de *Aspergillus* tienen un galactomanano idéntico o muy similar a *Aspergillus fumigatus* que justificaría esta reacción cruzada. Puesto que AI puede estar producida por otras especies de *Aspergillus*, esta reacción cruzada es beneficiosa en cierta medida, pues amplía la capacidad de detección de AI. La reactividad cruzada frente a *Histoplasma capsulatum* puede deberse a la interacción del mAB con las cadenas de galactofuranosa. Es importante saber si la positividad a *Histoplasma* es debida a una reacción cruzada o a una infección por este microorganismo pues el tratamiento es específico para cada caso¹¹⁹. En cuanto al estudio con fármacos, se estudió la reactividad con la amoxicilina, la amoxicilina-clavulánico, el tazobactam y la piperacilina como antibióticos, y la ciclofosfamida como agente antineoplásico e inmunodepresor de empleo común en tratamiento del cáncer. Todos ellos se analizaron a concentraciones terapéuticas recomendadas, tanto en suero como en LBA, y se obtuvieron resultados negativos. En la reactividad cruzada señalada en numerosos estudios por parte del mAB EB-A2, hay que tener en cuenta la mejora de las estrategias de purificación de los antibióticos en los últimos años y, en consecuencia, la disminución de la reactividad cruzada por esta causa. También se analizó la probabilidad de obtención de falsos positivos en otras poblaciones no relacionadas con AI, pero con patologías potencialmente interferentes. Se ensayaron muestras de suero positivas a micoplasma, toxoplasma, citomegalovirus, sífilis, rubeola, hepatitis C y E, factor reumatoide y anticuerpos antinucleares. De un total de 104 muestras, solo se obtuvo un resultado falso positivo

para citomegalovirus (99,04% de especificidad en este tipo de muestras). Puesto que el kit de VirClia utiliza un mAB obtenido en rata, se ha estudiado la interferencia de anticuerpos anti-murinos humanos (HAMA) ya que el tratamiento con mAB es ampliamente utilizado en tratamientos de cáncer y de otros trastornos inmunitarios. Para este tipo de muestras no se encontró ningún falso positivo (especificidad 100%).

Se analizó también el posible efecto interferente causado por sustancias endógenas presentes en muestras de suero. Para ello se estudiaron concentraciones anormales de triglicéridos, hemoglobina, bilirrubina, colesterol, albúmina y gamma-globulina. Las sustancias interferentes se adicionaron sobre cada una de las muestras a una concentración superior a la que se encuentra habitualmente en las muestras. Se observó que los resultados de las tres muestras evaluadas (dos positivas y una negativa), no se vieron afectados por la presencia de 5,5 g/l de triglicéridos, 5,8 g/l de hemoglobina, 6 g/l de bilirrubina, 5,8 g/l de colesterol, 60 g/l de albúmina y 60 g/l de gamma-globulina. Por otro lado, en cuanto a las muestras de LBA, se estudió el efecto de la lidocaína sobre el kit de diagnóstico. Esta es el anestésico tópico empleado habitualmente en la técnica que se emplea para la obtención de la muestra de LBA. Se ensayó un rango de concentraciones, estableciéndose el punto superior por encima de la concentración máxima que se declara para su uso. En este caso tampoco se observó ningún tipo de interferencia.

Todos los estudios de diseño, desarrollo y validación dieron lugar a un kit comercial: *ASPERGILLUS GALACTOMANNAN AG VIRCLIA® MONOTEST* que, tras el cumplimiento de las especificaciones del estudio de prestaciones diagnósticas y analíticas, obtuvo el marcado CE.

Se han realizado varios estudios comparativos del kit de VirClia, en diferentes centros hospitalarios, que pasamos a describir brevemente:

En un estudio retrospectivo multicéntrico realizado en Países Bajos y Bélgica²⁴², se analizaron muestras de LBA de 79 pacientes con neoplasias hematológicas y trasplantes de células madre que presentaban AI probada/probable según EORTC/MSG. Se comparó el kit de VirClia con Bio-Rad y se obtuvo una concordancia del 89%. En los pacientes con AI probable, la sensibilidad fue del 69% para VirClia y del 59% para Bio-Rad. Los resultados de este estudio para los pacientes con clasificación de AI probada/probable son equivalentes a los obtenidos para las 120 muestras de nuestro estudio, es decir, una mayor tasa de sensibilidad para VirClia.

Matarazzo y colaboradores²⁴³ realizaron un estudio comparativo de los kits de VirClia, FungiXpert (China) y Bio-Rad. Analizaron 50 muestras de LBA y las discrepancias se estudiaron por técnicas de cultivo, datos clínicos y RT-PCR. VirClia mostró una concordancia con Bio-Rad del 80% y del 74% con FungiXpert. Se obtuvieron resultados positivos en el 18,4% de los casos por la técnica de cultivo, a pesar de la baja sensibilidad de esta técnica, siendo la especie predominante *Aspergillus fumigatus*. VirClia obtuvo una discrepancia con respecto al consenso global de técnicas empleadas, dándole la razón a esta por ser un caso probado de AI. Los autores destacaron la facilidad de ejecución y subrayaron las ventajas del formato monodosis del kit de VirClia.

Troncoso y colaboradores²⁴⁴ estudiaron 56 sueros y 40 LBA por VirClia y Bio-Rad y encontraron una buena correlación. Hallaron un 16% más de sensibilidad para VirClia y un 11% más de especificidad para Bio-Rad. Obtuvieron un mayor grado de concordancia para las muestras de suero (85,7%) que para las muestras de LBA (42,5%). Esto puede estar justificado por la heterogeneidad que presenta este último tipo de muestra y por no haber realizado ambas técnicas de forma simultánea. Destacaron las ventajas del formato monodosis y su adecuación para muestras urgentes.

Rubio y colaboradores²⁴⁵ compararon VirClia y el kit de inmunocromatografía IMMY Lateral Flow *Aspergillus* Galactomannan en 243 muestras de LBA. Obtuvieron una sensibilidad y especificidad del 58,5% y 95,1% para el test inmunocromatográfico con respecto a VirClia. El grado de acuerdo entre ambas técnicas fue moderado ($\kappa = 0,57$).

En general, el grado de concordancia obtenido en estos estudios, donde se compara el kit de VirClia frente a técnicas complementarias (en su mayoría Bio-Rad), es equivalente al obtenido en los estudios propios.

Como se ha mencionado anteriormente, las infecciones víricas provocadas por el virus de la influenza y, recientemente, por SARS-CoV-2, constituyen un importante factor de riesgo para este tipo de pacientes. Las infecciones fúngicas asociadas a las mismas se denominan IAPA (para el virus de la influenza) y CAPA (para SARS-CoV-2). El daño estructural y funcional del aparato respiratorio, el desequilibrio ocasionado al sistema inmunitario y el tratamiento aplicado para este tipo de infecciones pueden dar lugar a un mayor riesgo de infección por *Aspergillus*. Se han encontrado cada vez con más frecuencia, casos de pacientes ingresados en UCI con esta infección que, a pesar de no contar con ningún grado de inmunodepresión, desarrollan AI⁵⁴. El diagnóstico de CAPA suele darse entre los 8-16 días tras el inicio de los síntomas de COVID-19. Se recomienda la detección de GM en muestra de suero y LBA, ya que los signos clínicos y radiológicos son inespecíficos. En pacientes no neutropénicos se recomienda el análisis en LBA ya que, con alta probabilidad, la infección estará localizada en las vías respiratorias. Según la revisión realizada, este tipo de coinfección presenta un promedio de incidencia del 15,8% y una mortalidad de 56%. Igualmente, los autores señalan una asociación entre CAPA y el empleo de ventilación mecánica^{23,57}. Actualmente no existen criterios establecidos para la definición de IAPA y CAPA en pacientes sin ningún grado de inmunodepresión, aunque Blot y colaboradores, según lo citado por Mercier y colaboradores²⁴⁶, desarrollaron un algoritmo denominado AspICU, el cual incluyó el cultivo de una muestra respiratoria como criterio. Posteriormente, y al no obtener resultados positivos en la mayoría de muestras respiratorias, Schauwvlieghe y colaboradores, sustituyeron el cultivo por la prueba de detección de GM en suero o LBA^{57,58,246}. En el caso de CAPA, sí existen los criterios establecidos por la ECMM/ISHAM, donde se requiere al menos una lesión detectable por técnicas radiológicas, una característica clínica típica y un resultado micológico. A este último le dan especial importancia, ya que los signos y síntomas obtenidos por el resto de métodos son poco específicos. El criterio micológico consiste en pruebas de cultivo, PCR, β -D-glucano y detección de GM en suero y LBA⁵⁹.

Además de los estudios anteriores realizados con el kit de VirClia, se han publicado también algunos trabajos donde se analiza la probabilidad de desarrollo de AI debida a infección por SARS-CoV-2. La mayoría de los estudios se han basado en el análisis de muestras LBA.

Salvo y colaboradores²⁴⁷ compararon Virclia y Bio-Rad en 53 muestras LBA con un elevado grado de concordancia entre ambas técnicas ($\kappa = 0,82$). Un 49% de las muestras eran de enfermos de SARS-CoV-2. En este subgrupo la concordancia entre ambas técnicas fue del 100%. Los autores señalaron la facilidad de uso del kit de Virclia. Por otro lado, Kümring y colaboradores²⁴⁸ compararon Virclia, Rio-Rad e IMMY en 262 pacientes, de los cuales un 52,3% tenía infección por SARS-CoV2. Estos autores concluyeron que es ligeramente más frecuente la AI en pacientes sin infección por SARS-CoV-2 (47,4% frente a 40%). Estos datos fueron similares en los tres kits empleados, aunque reconocieron como principal limitación la ausencia de datos clínicos.

En otro estudio llevado a cabo por Buil y colaboradores²⁴⁹, se analizaron 43 muestras LBA de 39 pacientes con COVID-19 por los kits de Bio-Rad y Virclia. El grado de acuerdo entre ambas fue sustancial ($\kappa = 0,74$). De las cinco discrepancias obtenidas entre ambas técnicas, cuatro fueron positivas para VirClia y una fue negativa. 3 de los 4 casos positivos fueron coincidentes en las técnicas complementarias. La muestra negativa de VirClia fue concordante para la técnica de cultivo y PCR. La incidencia de CAPA fue del 28,2%. Según los datos recopilados de Salazar y colaboradores²³ y de Chong y colaboradores⁵⁷, fue similar a la obtenida por Alanio (33,3%) y Bartoletti (27,7%) en Italia y por Lahmer (34,4%) y Koehler (26,3%) en Alemania. Por otro lado, si comparamos la incidencia con la reportada en estudios del mismo país (Países Bajos), esta es superior a lo declarado por Meijer (19,7%), por Van Arkel (19,4%) y por Van Biesen (21,4%).

Arregui y colaboradores²⁵⁰, realizaron un estudio retrospectivo donde analizaron 226 muestras LBA. Del total, 15 pacientes fueron diagnosticados con AI, de ellos 14 fueron positivos y 1 fue dudoso por la técnica de VirClia. En ese subgrupo se encontró una tasa del 93,3% de aspergilosis asociada a COVID-19 grave con una mortalidad del 40% y el paciente restante presentó enfermedad hematológica. De las muestras positivas por VirClia, un 46,7% de las muestras LBA fueron positivas por cultivo y en un 40% se pudo aislar el hongo en otro tipo de muestra respiratoria. La mayoría de los aislamientos se identificaron como *Aspergillus fumigatus* (84,6%). Por otro lado, de los 15 pacientes con CAPA, se analizó muestra de suero de 13 de ellos y se obtuvieron resultados negativos tanto por la técnica VirClia como por detección de β -D-glucano. Los autores destacan la utilidad de la técnica en muestras LBA en pacientes con COVID-19 y demuestran lo declarado en la bibliografía al obtener resultados negativos en todas las muestras de suero.

Por su parte, Lago y colaboradores²⁵¹, analizaron 338 pacientes ingresados en UCI con infección por SARS-CoV-2, de los cuales 21 casos (6,2%) presentaron CAPA según los criterios ASPICU. Esta incidencia se encuentra por debajo del promedio recogido por Salazar y colaboradores²³ y Chong y colaboradores⁵⁷ (15,8%) y por encima de los datos reportados, por los mismo autores, para los 3 estudios españoles (0,7% de García-Vidal, 2,5% de Machado y 3% de Segrelles-Calvo). De las 19 muestras evaluadas por VirClia, el resultado fue positivo en el 95% de los casos. Los autores señalan

la presencia de factores de riesgo previo al ingreso como tratamiento con corticoides, neoplasias de órgano sólido y EPOC.

Por último, Calderón-Parra y colaboradores⁶² tratan de definir una escala basada en factores de riesgo para predecir el riesgo del desarrollo de CAPA. Se analizaron solo muestras de suero de 26 pacientes con un porcentaje de positividad del 23,1%. Este valor se encuentra muy por debajo de los resultados obtenidos en otros estudios equivalentes donde se empleó LBA en este tipo de pacientes. En general, los estudios muestran una buena concordancia entre la técnica VirClia y las técnicas complementarias empleadas en cada caso. En cuanto al diagnóstico CAPA, se recomienda el empleo de LBA ya que la mayoría de pacientes no presentan inmunodepresión y la infección se encuentra localizada en las vías respiratorias.

En resumen, la sensibilidad de las pruebas de diagnóstico de AI depende del estado inmunitario del huésped, de la presencia de profilaxis antifúngica, de la localización de la infección, del tipo de muestra que se estudie y de las condiciones del laboratorio donde se ensayan. El kit de VirClia desarrollado en este trabajo ha demostrado un elevado rendimiento diagnóstico en muestras de suero y LBA, es fácil de utilizar y su diseño monodosis lo hace muy adecuado para el diagnóstico de esta patología, dada la urgencia de estos pacientes. La capacidad de automatización sin necesidad de emplear un método de calibración adicional supone una ventaja sobre otros kits que se usan en el laboratorio.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Una vez obtenido el antígeno nativo purificado, se obtuvieron anticuerpos monoclonales reactivos frente a antígenos de galactomanano purificados de distintos pesos moleculares, tanto aislados como asociados a proteínas. Se seleccionó el anticuerpo monoclonal óptimo mediante inmunoensayos de avidéz, reactividad, inhibición e isotipado.
2. Con el anticuerpo monoclonal elegido, se evaluaron y optimizaron cada uno de los elementos que forman parte del sistema de captura y se obtuvieron tasas notables de discriminación entre las muestras negativas y positivas. Este diseño permitió obtener una vida útil del producto de al menos 15 meses.
3. Con el formato en monodosis y la automatización del ensayo se ha simplificado al máximo la ejecución de la técnica. Se ha diseñado un protocolo de ejecución con una duración más corta, en comparación con la técnica comercial de ELISA convencional, manteniendo los valores de sensibilidad y especificidad.
4. El estudio comparativo del nuevo diseño con el kit comercial de ELISA mostró un buen rendimiento diagnóstico (AUC = 0,9 - 0,97) según la información proporcionada por la curva ROC, tanto en los estudios internos, como en los externos. Los resultados en muestras de origen respiratorio y en muestras de suero fueron equivalentes.
5. Se aplicaron las normas de las guías CLSI, y se estudió el funcionamiento analítico del método desarrollado. Se obtuvieron coeficientes de variación < 10% en el estudio de precisión, ausencia de interferencias frente a sustancias endógenas, fármacos y anticuerpos anti-murinos humanos, y presencia de reactividad cruzada, al igual que declara la técnica de ELISA comercial, frente a otras especies del género *Aspergillus*, frente al género *Penicillium* y frente a *Histoplasma capsulatum*.
6. Se ha desarrollado una técnica para la detección de antígeno de galactomanano de *Aspergillus fumigatus* en muestras biológicas, tanto de origen respiratorio, como en suero, aplicable en el diagnóstico de la aspergilosis invasora. Los resultados obtenidos en lo relativo a rendimiento diagnóstico, funcionamiento analítico, duración de la técnica y su presentación para un uso individualizado y automatizado, permitirán disponer comercialmente de una herramienta óptima para el diagnóstico de aspergilosis invasiva.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Cornely, O., Hoenigl, M., Lass-Flörl, C., Chen, S., Kontoyiannis, D., Morrissey, C.O., Thompson G.R., Mycoses Study Group Education and Research Consortium (MSG-ERC) & the European Confederation of Medical Mycology (ECMM). Defining Breakthrough Invasive Fungal Infection— Position Paper of the Mycoses Study Group Education and Research Consortium (MSG-ERC) and the European Confederation of Medical Mycology (ECMM). *Mycoses* **62**, 716–729 (2019). DOI: 10.1111/myc.12960.
2. Bassetti, M., Azoulay, E., Kullberg, B.J., Ruhnke, M., Shoham, S., Vazquez, J., Giacobbe, D.R. & Calandra, T. EORTC/MSGERC Definitions of Invasive Fungal Diseases: Summary of Activities of the Intensive Care Unit Working Group. *Clin. Infect. Dis.* **72**, S121–S127 (2021). DOI: 10.1093/cid/ciaa1751.
3. Donnelly, J. P., Chen, S.C., Kauffman, C.A., Steinbach, W.J., Baddley, J.W., Verweij, P.E., Clancy, C.J., Wingard, J.R., Lockhart, S.R., Groll, A.H., Sorrell, T.C., Bassetti, M., Akan, H., Alexander, B.D., Andes, D., Azoulay, E., Bialek, R., Brandsher, R.W., Bretagne, S., Calandra, T., Caliendo, A.M., Castagnola, E., Cruciani, M., Cuenca-Estrella, M., Decker, C.F., Desai, S.R., Fisher, B., Harrison, T., Heussel, C.P., Jensen, H.E., Kibber, C.C., Kontoyiannis, D.P., Kullberg, B.J., Lagrou, K., Lamoth, F., Lehrnbecher, T., Loeffler, J., Lortholary, O., Maertens, J., Marchetti, O., Marr, K.A., Masur, H., Meis, J.F., Morrissey, C.O., Nucci, M., Ostrosky-Zeichner, L., Pagano, L., Patterson, T.F., Perfect, J.R., Racil, Z., Roilides, E., Ruhnke, M., Prokop, C.S., Shoham, S., Slavin, M.A., Stevens, D.A., Thompson, G.R., Vazquez, J.A., Viscoli, C., Walsh, T.J., Warris, A., Wheat, L.J., White, P.L., Zaoutis, T.E. & Pappas, P.G. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 1367–1376 (2020). DOI: 10.1093/cid/ciz1008.
4. Pathakumari, B., Liang, G. & Liu, W. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. *Biomed. Pharmacother.* **130**, 110550 (2020). DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110550.
5. Latgé, J.P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol. Microbiol.* **66**, 279–290 (2007). DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05872.x.
6. Guarro, J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm. Infec. Microbiol. Clínica*. **30**, 33-39 (2012). DOI: 10.1016/j.eimc.2011.09.006.
7. Cuenca-Estrella, M. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad fúngica invasora. *Enferm. Infec. Microbiol. Clínica*. **30**, 257-264 (2012). DOI: 10.1016/j.eimc.2012.01.019.
8. Swanink, C.M.A., Meis, J.F.G.M., Rijs, A.J.M.M., Donnelly, J.P. & Verweij, P.E. Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus galactomannan*. *J Clin Microbiol.* **35**, 257-260 (1997). DOI: 10.1128/jcm.35.1.257-260.1997.
9. Fang, W. & Latgé, J.P. Microbe Profile: *Aspergillus fumigatus*: a saprotrophic and opportunistic fungal pathogen. *Microbiology*. **164**, 1009-1011 (2018). DOI: 10.1099/mic.0.000651.
10. van de Veerdonk, F.L., Gresnigt, M.S., Romani, L., Netea, M.G. & Latgé, J.P. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 661-674 (2017). DOI: 10.1038/nrmicro.2017.90.

11. Berkeley, L., Dixon, C. & Bala, S. Detection of Galactomannan in Serum by Platelia™ *Aspergillus* Enzyme-linked Immunosorbent Assay (BioRad Laboratories and Sanofi Diagnostics). Division of special pathogen and transplant products. *Biomarker Qualification* (2011). <https://www.fda.gov/media/90001>
12. Latgé, J.P. & Chamilos, G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin. Microbiol. Rev.* **33**, e00140-18 (2019). DOI: 10.1128/CMR.00140-18.
13. Akar, T., Tunalı, S. & Çabuk, A. Study on the characterization of lead (II) biosorption by fungus *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **136**, 389–405 (2007). DOI: 10.1007/s12010-007-9032-8.
14. Abad, A., Fernández-Molina, J.V., Bikandi, J., Ramírez, A., Margareto, J., Sendino, J., Hernando, F.L., Pontón, J., Garaizar, J. & Rementeria, A. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev. Iberoam. Micol.* **27**, 155–182 (2010). DOI: 10.1016/j.riam.2010.10.003.
15. Lee, M. J. & Sheppard, D. C. Recent advances in the understanding of the *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J. Microbiol.* **54**, 232–242 (2016). DOI: 10.1007/s12275-016-6045-4.
16. Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J. & Trevijano-Contador, N. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Front. Microbiol.* **10**, 2993 (2019). DOI: 10.3389/fmicb.2019.02993.
17. Gow, N. A. R., Latge, J.-P. & Munro, C. A. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol. Spectr.* **5**, 5.3.01 (2017). DOI: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016.
18. Heinekamp, T., Schmidt, H., Lapp, K., Pätz, V., Shopova, I., Köster-Eiserfunke, N., Krüger, T., Kniemeyer, O., & Brakhage, A.A. Interference of *Aspergillus fumigatus* with the immune response - PMC. *Semin. Immunopathol.* **37**, 141–152 (2014). DOI: 10.1007/s00281-014-0465-1.
19. Slesiona, S., Gressler, M., Mihlan, M., Zaehle, C., Schaller, M., Barz, D., Hube, B., Jacobsen, I.D. & Brock, M. Persistence versus escape: *Aspergillus terreus* and *Aspergillus fumigatus* employ different strategies during interactions with macrophages. *PLoS One* **7**, e31223 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0031223.
20. Speth, C., Rambach, G., Lass-Flörl, C., Howell, P. L. & Sheppard, D. C. Galactosaminogalactan (GAG) and its multiple roles in *Aspergillus* pathogenesis. *Virulence* **10**, 976–983 (2019). DOI: 10.1080/21505594.2019.1568174.
21. Snarr, B. D., Qureshi, S. T. & Sheppard, D. C. Immune Recognition of Fungal Polysaccharides. *J. Fungi Basel Switz.* **3**, E47 (2017). DOI: 10.3390/jof3030047.
22. Jhingran, A., Kasahara, S., Shepardson, K.M., Junecko, B.A.F., Heung, L.J., Kumasaka, D.K., Knoblaugh, S.E., Lin, X., Kazmierczak, B.I., Reinhart, T.A., Cramer, R.A. & Hohl, T.M. Compartment-Specific and Sequential Role of MyD88 and CARD9 in Chemokine Induction and Innate Defense during Respiratory Fungal Infection. *PLoS Pathog.* **11**, e1004589 (2015). DOI: 10.1371/journal.ppat.1004589.
23. Salazar, F., Bignell, E., Brown, G. D., Cook, P. C. & Warris, A. Pathogenesis of Respiratory Viral and Fungal Coinfections. *Clin. Microbiol. Rev.* **35**, e0009421 (2022). DOI: 10.1128/CMR.00094-21.

24. Voigt, J., Hünninger, K., Bouzani, M., Jacobsen, I.D., Barz, D., Hube, B., Löffler, J. & Kurzai, O. Human Natural Killer Cells Acting as Phagocytes Against *Candida albicans* and Mounting an Inflammatory Response That Modulates Neutrophil Antifungal Activity. *J. Infect. Dis.* **209**, 616–626 (2014). DOI: 10.1093/infdis/jit574.
25. Schmidt, S., Tramsen, L., Hanish, M., Latgé, J.P., Huenecke, S., Koehl, U. & Lehrnbecher, T. Natural Killer cells exhibit direct activity against hyphae, but not against conidia of *Aspergillus fumigatus*. *J. Infect. Dis.* **203**, 430-435 (2011). DOI: 10.1093/infdis/jiq062.
26. Células dendríticas | British Society for Immunology. <https://www.immunology.org/es/public-information/bitesized-immunology/cells/c%C3%A9lulas-dendr%C3%ADticas>.
27. Braem, S. G. E., Rooijackers, S.H.M., van Kessel, K.P.M., de Cock, H., Wösten, H.A.B., van Strijp, J.A.G. & Hass, P.J.A. Effective Neutrophil Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* Is Mediated by Classical Pathway Complement Activation. *J. Innate Immun.* **7**, 364–374 (2015). DOI: 10.1159/000369493.
28. Rosbjerg, A., Würzner, R., Garred, P. & Skjoedt, M.O. MASP-1 and MASP-3 Bind Directly to *Aspergillus fumigatus* and Promote Complement Activation and Phagocytosis. *J. Innate Immun.* **13**, 211–224 (2021). DOI: 10.1159/000514546.
29. Shende, R., Wong, S.S.W., Rapole, S., Beau, R., Ibrahim-Granet, O., Monod, M., Gührs, K.H., Pal, J.K., Latgé, J.P., Madan, T., Aïmanianda, V. & Sahu, A. *Aspergillus fumigatus* conidial metalloprotease Mep1p cleaves host complement proteins. *J. Biol. Chem.* **293**, 15538–15555 (2018). DOI: 10.1074/jbc.RA117.001476.
30. Dasari, P., Koleci, N., Shopova, I.A., Wartenberg, D., Beyersdorf, N., Dietrich, S., Sahagún-Ruiz, A., Figge, M.T., Skerka, C., Brakhage, A.A. & Zipfel, P.F. Enolase From *Aspergillus fumigatus* Is a Moonlighting Protein That Binds the Human Plasma Complement Proteins Factor H, FHL-1, C4BP, and Plasminogen. *Front. Immunol.* **10**, 2573 (2019). DOI: 10.3389/fimmu.2019.02573.
31. Chotirmall, S. H., Al-Alawi, M., Mirkovic, B., Lavelle, G., Logan, P.M., Greene, C.M. & McElvaney, N.G. *Aspergillus*-Associated Airway Disease, Inflammation, and the Innate Immune Response. *BioMed Res. Int.* **2013**, 723129 (2013). DOI: 10.1155/2013/723129.
32. Shoham, S. & Levitz, S. M. The immune response to fungal infections. *Br. J. Haematol.* **129**, 569–582 (2005). DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05397.x.
33. Montagnoli, C., Fallarino, F., Gaziano, R., Bozza, S., Bellocchio, S., Zelante, T., Kurup, W.P., Pitzurra, L., Puccetti, P. & Romani, L. Immunity and tolerance to *Aspergillus* involve functionally distinct regulatory T cells and tryptophan catabolism. *J. Immunol.* **176**, 1712–1723 (2006). DOI: 10.4049/jimmunol.176.3.1712.
34. Células T CD8+ | British Society for Immunology. <https://www.immunology.org/es/public-information/inmunolog%C3%ADa-bitesized/celulas/celulas-t-cd8>
35. Margalit, A. & Kavanagh, K. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 670–687 (2015). DOI: 10.1093/femsre/fuv018.
36. Hohl, T. M. Immune responses to invasive aspergillosis: new understanding and therapeutic opportunities. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **30**, 364–371 (2017). DOI: 10.1097/QCO.0000000000000381.

37. Lou, B., Xu, Z., Yang, G., Guo, C., Zheng, S., Lou, H., Ma, G., Sadhukhan, A., Lin, S. & Chen, Y. Role of *Aspergillus fumigatus*-Specific IgE in the Diagnosis of Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *Int Arch Allergy Immunol.* **178**, 338-344 (2019). DOI: 10.1159/000495365.
38. Wallenbeck, I., Dreborg, S., Zetterström, O. & Einarsson, R. *Aspergillus fumigatus* specific IgE and IgG antibodies for diagnosis of *Aspergillus*-related lung diseases. *Allergy* **46**, 372-378 (1991). DOI: 10.1111/j.1398-9995.1991.tb00601.x.
39. Agarwal, R., Aggarwal, A.N., Sehgal, I.S., Dhooria, S., Behera, D. & Chakrabarti, A. Utility of IgE (total and *Aspergillus fumigatus* specific) in monitoring for response and exacerbations in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Mycoses* **59**, 1-6 (2016). DOI: 10.1111/myc.12423.
40. Mennink-Kersten, M. A., Donnelly, J. P. & Verweij, P. E. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect. Dis.* **4**, 349–357 (2004). DOI: 10.1016/S1473-3099(04)01045-X.
41. Fontaine, T. & Latgé, J.P. Galactomannan Produced by *Aspergillus fumigatus*: An Update on the Structure, Biosynthesis and Biological Functions of an Emblematic Fungal Biomarker. *J. Fungi* **6**, 283 (2020). DOI: 10.3390/jof6040283.
42. Guo, M. Q., Hu, X., Wang, C. & Ai, L. Polysaccharides: Structure and Solubility. Solubility of Polysaccharides. *IntechOpen* (2017). DOI: 10.5772/intechopen.71570.
43. Muszkieta, L., Fontaine, T., Beau, R., Mouyna, I., Vogt, M.S., Trow, J., Cormack, B.P., Essen, L.O., Jouvion, G. & Latgé, J.P. The Glycosylphosphatidylinositol-Anchored DFG Family Is Essential for the Insertion of Galactomannan into the β -(1,3)-Glucan–Chitin Core of the Cell Wall of *Aspergillus fumigatus*. *mSphere* **4**, e00397-19 (2019). DOI: 10.1128/mSphere.00397-19.
44. Latgé, J. P. Galactofuranose containing molecules in *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* **47**, 104-109 (2009). DOI: 10.1080/13693780802258832.
45. Stynen, D., Sarfati, J., Goris, A., Prévost, M.C., Lesourd, M., Kamphuis, H., Darras, V. & Latgé, J.P. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus* galactomannan. *Infect. Immun.* **60**, 2237–2245 (1992). DOI: 10.1128/iai.60.6.2237-2245.1992.
46. Patterson, T. F., Thompson, G.R., Denning, D.W., Fishman, J.A., Hadley, S., Herbrecht, R., Kontoyannis, D.P., Marr, K.A., Morrison, V.A., Nguyen, M.H., Segal, B.H., Steinbach, W.J., Stevens, D.A., Walsh, T.J., Wingard, J.R., Young, J.A.H. & Bennett, J.E. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **63**, 433-442 (2016). DOI: 10.1093/cid/ciw444.
47. Ullmann, A. J., Aguado, J.M., Arian-Akdagli, S., Denning, D.W., Groll, A.H., Lagrou, K., Lass-Flörl, C., Lewis, R.E., Munoz, P., Verweij, P.E., Warris, A., Ader, F., Akova, M., Arendrup, M.C., Barnes, R.A., Beigelman-Aubry, C., Blot, S., Bouza, E., Brüggemann, R.J.M., Buchheidt, D., Cadranel, J., Castagnola, E., Chakrabarti, A., Cuenca-Estrella, M., Dimopoulos, G., Fortun, J., Gangneux, J.P., Garbino, J., Heinz, W.J., Herbrecht, R., Heussel, C.P., Kibbler, C.C., Klimko, N., Kullberg, B.J., Lange, C., Lehrnbecher, T., Löffler, J., Lortholary, O., Maertens, J., Marchetti, O., Meis, J.F., Pagano, L., Ribaud, P., Richardson, M., Roilides, E., Ruhnke, M., Sanguinetti, M., Sheppard, D.C., Sinkó, J., Skiada, A., Vehreschild, M.J.G.T., Viscoli, C. & Cornely, O.A. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **24** Suppl 1, e1–e38 (2018). DOI: 10.1016/j.cmi.2018.01.002.

48. Lai, G., Zeng, C., Mo, J., Song, W. & Xu, P. Diagnostic Value of Galactomannan in Bronchoalveolar Lavage Fluid for Chronic Respiratory Disease with Pulmonary Aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **58**, e01308-19 (2020). DOI: 10.1128/JCM.01308-19.
49. Vallejo, C. & Fortún, J. Strategies for the management of invasive fungal infections due to filamentous fungi in high-risk hemato-oncological patients. *Rev. Esp. Quimioter.* **32**, 31–39 (2019).
50. Fortún, J., Meije, Y., Fresco, G. & Moreno, S. Aspergillosis. Clinical forms and treatment. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **30**, 201–208 (2012). DOI: 10.1016/j.eimc.2011.12.005.
51. Yu, H.H., Yang, Y.H. & Chiang, B.L. Chronic Granulomatous Disease: a Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **61**, 101–113 (2021). DOI: 10.1007/s12016-020-08800-x.
52. Danion, F., Rouzaud, C., Duréault, A., Poirée, S., Bougnoux, M.E., Alanio, A., Lanternier, F. & Lortholary, O. Why are so many cases of invasive aspergillosis missed? *Med. Mycol.* **57**, S94–S103 (2019). DOI: 10.1093/mmy/myy081.
53. Schauwvlieghe, A. F. A. D., Rijnders, B.J.A., Philips, N., Verwijs, R., Vanderbeke, L., Van Tienen, C., Lagrou, K., Verweij, P.E., Van de Veerdonk, F.L, Gommers, D., Spronk, P., Bergmans, D.C.J.J., Hoedemaekers, A., Andrinopoulou, E.R., Van den Berg, C.H.S.B., Juffermans, N.P., Hodiament, C.P., Vonk, A.G., Depuydt, P., Boelens, J., Wauters, J. & Dutch-Belgian Mycosis study group. Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study. *Lancet Respir. Med.* **6**, 782–792 (2018). DOI: 10.1016/S2213-2600(18)30274-1.
54. Koehler, P., Cornely, O.A., Böttiger, B.W., Dusse, F., Eichenauer, D.A., Fuchs, F., Hallek, M., Jung, N., Klein, F., Persigehl, T., Rybniker, J., Kochanek, M., Böll, B. & Shimabukuro-Vornhagen, A. COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. *Mycoses* **63**, 528–534 (2020). DOI: 10.1111/myc.13096.
55. Douglas, A. P., Smibert, O.C., Bajel, A., Halliday, C.L., Lavee, O., McMullan, B., Yong, M.K., van Hal, S.J., Chen, S.C.A. & Australasian Antifungal Guidelines Steering Committee. Consensus guidelines for the diagnosis and management of invasive aspergillosis, 2021. *Intern. Med. J.* **51**, 143–176 (2021). DOI: 10.1111/imj.15591.
56. Machado, M., Valerio, M., Álvarez-Uría, A., Olmedo, M., Veintimilla, C., Padilla, B., De la Villa, S., Guinea, J., Escribano, P., Ruiz-Serrano, M.J., Reigadas, E., Alonso, R., Guerrero, J.E., Hortal, J., Bouza, E., Muñoz, P. & COVID-19 Study Group. Invasive pulmonary aspergillosis in the COVID-19 era: An expected new entity. *Mycoses* **64**, 132-143. (2020) DOI: 10.1111/myc.13213.
57. Chong, W. H. & Neu, K. P. Incidence, diagnosis and outcomes of COVID-19-associated pulmonary aspergillosis (CAPA): a systematic review. *J. Hosp. Infect.* **113**, 115–129 (2021). DOI: 10.1016/j.jhin.2021.04.012.
58. Shi, C., Shan, Q., Xia, J., Wang, L., Wang, L., Qiu, L., Xie, Y., Lin, N. & Wang, L. Incidence, risk factors and mortality of invasive pulmonary aspergillosis in patients with influenza: A systematic review and meta-analysis. *Mycoses* **65**, 152–163 (2022). DOI: 10.1111/myc.13410.
59. Dellière, S., Dudoignon, E., Voicu, S., Collet, M., Fodil, S., Plaud, B., Chousterman, B., Bretagne, S., Azoulay, E., Mebazza, A., Dépret, F., Mégarbane, B. & Alanio, A. Combination of Mycological Criteria: a Better Surrogate to Identify COVID-19-Associated Pulmonary Aspergillosis Patients and Evaluate Prognosis? *J. Clin. Microbiol.* **60**, e02169-21. DOI: 10.1128/JCM.02169-21.

60. Vanderbeke, L., Spriet, I., Breynaert, C., Rijnders, B.J.A., Verweij, P.E. & Wauters, J. Invasive pulmonary aspergillosis complicating severe influenza: epidemiology, diagnosis and treatment. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **31**, 471–480 (2018). DOI: 10.1097/QCO.0000000000000504.
61. Lai, C.C. & Yu, W.L. COVID-19 associated with pulmonary aspergillosis: A literature review. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **54**, 46–53 (2021). DOI: 10.1016/j.jmii.2020.09.004.
62. Calderón-Parra, J., Mills-Sánchez, P., Moreno-Torres, V., Tejado-Bravo, S., Romero-Sánchez, I., Balandin-Moreno, B., Calvo-Salvador, M., Portero-Azorín, F., García-Masedo, S., Muñoz-Rubio, E., Ramos-Martínez, A., Fernández-Cruz, A. & HUPH IFI Study Group. COVID-19-associated pulmonary aspergillosis (CAPA): Risk factors and development of a predictive score for critically ill COVID-19 patients. *Mycoses* **65**, 541–550 (2022). DOI: 10.1111/myc.13434.
63. Hatzl, S., Reisinger, A.C., Posh, F., Prattes, J., Stradner, M., Pilz, S., Eller, P., Schoerghuber, M., Toller, W., Gorkiewicz, G., Metnitz, P., Rief, M., Prüller, F., Rosenkranz, A.R., Valentin, T., Krause, R., Hoenigl, M. & Schilcher, G. Antifungal prophylaxis for prevention of COVID-19-associated pulmonary aspergillosis in critically ill patients: an observational study. *Crit. Care* **25**, 335 (2021). DOI: 10.1186/s13054-021-03753-9.
64. Mohamed, A., Hassan, T., Trzos-Grzybowska, M., Thomas, J., Quinn, A., O'Sullivan, M., Griffin, A., Rogers, T.R. & Talento, A.F. Multi-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* and SARS-CoV-2 co-infection: A lethal combination. *Med. Mycol. Case Rep.* **31**, 11-14 (2020). DOI: 10.1016/j.mmcr.2020.06.005.
65. Gregoire, E., Pirotte, B.F., Moerman, F., Altdorfer, A., Gaspard, L., Firre, E., Moonen, M., Fraipont, V., Ernst, M. & Darcis, G. Incidence and Risk Factors of COVID-19-Associated Pulmonary Aspergillosis in Intensive Care Unit-A Monocentric Retrospective Observational Study. *Pathog. Basel Switz.* **10**, 1370 (2021). DOI: 10.3390/pathogens10111370.
66. van de Veerdonk, F. L., Kolwijck, E., Lestrade, P.P.A., Hodiamont, C.J., Rijnders, B.J.A., van Paassen, J., Haas, P.J., Dos Santos, C.O., Kampinga, G.A., Bergmans, D.C.J.J., van Dijk, K., de Haan, A.F.J., van Dissel, J., van der Hoeven, H.G., Verweij, P.E. & Dutch Mycoses Study Group. Influenza-Associated Aspergillosis in Critically Ill Patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **196**, 524–527 (2017). DOI: 10.1164/rccm.201612-2540LE.
67. Lackner, N., Thomé, C., Öfner, D., Joannidis, M., Mayerhöfer, T., Arora, R., Samardzic, E., Posch, W., Breitkopf, R. & Lass-Flörl, C. COVID-19 Associated Pulmonary Aspergillosis: Diagnostic Performance, Fungal Epidemiology and Antifungal Susceptibility. *J. Fungi* **8**, 93 (2022). DOI: 10.3390/jof8020093.
68. Wauters, J., Barr, I., Meersseman, P., Meersseman, W., Dams, K., De Paep, R., Lagrou, K., Wilmer, A., Jorens, P. & Hermans, G. Invasive pulmonary aspergillosis is a frequent complication of critically ill H1N1 patients: a retrospective study. *Intensive Care Med.* **38**, 1761–1768 (2012). DOI: 10.1007/s00134-012-2673-2.
69. Rijnders, B.J.A., Schauwvlieghe, A.F.A.D. & Wauters, J. Influenza-associated pulmonary aspergillosis: a local or global lethal combination? *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **71**, 1764-1767 (2020) DOI: 10.1093/cid/ciaa010.
70. Huang, L., Zhang, Y., Hua, L. & Zhan, Q. Diagnostic value of galactomannan test in non-immunocompromised critically ill patients with influenza-associated aspergillosis: data from three consecutive influenza seasons. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **40**, 1899–1907 (2021). DOI: 10.1007/s10096-021-04228-z.

71. Lin, P.C., Zeng, J.H., Su, S.S., Zhou, Y., Chen, J.J., Chen, C.S. & Li, Y.P. The diagnostic performance of galactomannan detection in invasive pulmonary aspergillosis with severe and critically ill influenza. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **101**, 1050–1056 (2021). DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20200811-02337.
72. Bretagne, S., Sitbon, K., Botterel, F., Dellière, S., Letscher-Bru, V., Chouaki, T., Bellanger, A.P., Bonnal, C., Fekkar, A., Persat, F., Costa, D., Bourgeois, N., Dalle, F., Lussac-Sorton, F., Paugam, A., Cassaing, S., Hasseine, L., Huguenin, A., Guennouni, N., Mazars, E., Le Gal, S., Sasso, M., Brun, S., Cadot, L., Cassagne, C., Cateau, E., Gangneux, J.P., Moniot, M., Roux, A.L., Tournus, C., Debois-Nogard, N., Le Coustumier, A., Moquet, O., Alanio, A., Dromer, F. & French Mycoses Study Group. COVID-19-Associated Pulmonary Aspergillosis, Fungemia, and Pneumocystosis in the Intensive Care Unit: a Retrospective Multicenter Observational Cohort during the First French Pandemic Wave. *Microbiol. Spectr.* **9**, e0113821. DOI: 10.1128/Spectrum.01138-21.
73. Papachristou, S., Iosifidis, E. & Roilides, E. Invasive Aspergillosis in Pediatric Leukemia Patients: Prevention and Treatment. *J. Fungi Basel Switz.* **5**, E14 (2019). DOI: 10.3390/jof5010014.
74. Wattier, R. L. & Ramirez-Avila, L. Pediatric Invasive Aspergillosis. *J. Fungi* **2**, 19 (2016). DOI: 10.3390/jof2020019.
75. Hsu, A. J., Tamma, P. D. & Zhang, S. X. Challenges with Utilizing the 1,3-Beta-d-Glucan and Galactomannan Assays To Diagnose Invasive Mold Infections in Immunocompromised Children. *J. Clin. Microbiol.* **59**, e03276-20. DOI: 10.1128/JCM.03276-20.
76. Lamoth, F. Galactomannan and 1,3-β-d-Glucan Testing for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *J. Fungi* **2**, 22 (2016). DOI: 10.3390/jof2030022.
77. García-Vidal, C., Alastruey-Izquierdo, A., Aguilar-Guisado, M., Garratalà, J., Castro, C., Fernández-Ruiz, M., Aguado, J.M., Fernández, J.M., Fortún, J., Garnacho-Montero, J., Gavaldá, J., Gudiol, C., Guinea, J., Gómez-López, A., Muñoz, P., Pemán, J., Rovira, M., Ruiz-Camps, I. & Cuenca-Estrella, M. Executive summary of clinical practice guideline for the management of invasive diseases caused by *Aspergillus*: 2018 Update by the GEMICOMED-SEIMC/REIPI. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clin. Engl.* **37**, 535–541 (2019). DOI: 10.1016/j.eimc.2018.03.018.
78. Thompson, G.R. & Young, J.A.H. *Aspergillus* Infections. *N. Engl. J. Med.* **385**, 1496–1509 (2021). DOI: 10.1056/NEJMra2027424.
79. Park, S.J. & Mehrad, B. Innate Immunity to *Aspergillus* Species. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 535–551 (2009). DOI: 10.1128/CMR.00014-09.
80. Fayemiwo, S., Moore, C.B., Foden, P., Denning, D.W. & Richardson, M.D. Comparative performance of *Aspergillus* galactomannan ELISA and PCR in sputum from patients with ABPA and CPA. *J. Microbiol. Methods* **140**, 32–39 (2017). DOI: 10.1016/j.mimet.2017.06.016.
81. Denning, D.W., Cadranel, J., Beigelman-Aubry, C., Ader, F., Chakrabarti, A., Blot, S., Ullmann, A.J., Dimopoulos, G. & Lange, C. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur. Respir. J.* **47**, 45–68 (2016). DOI: 10.1183/13993003.00583.

82. Zhong, H., Wang, Y., Gu, Y., Yueyan, N., Wang, Y., Shen, K., Shi, Y. & Su, X. Clinical Features, Diagnostic Test Performance, and Prognosis in Different Subtypes of Chronic Pulmonary Aspergillosis. *Front. Med.* **9**, 811807 (2022). DOI: 10.3389/fmed.2022.811807.
83. Fernández-Ruiz, M., Silva, J.T., San-Juan, R., de Dios, B., García-Luján, R., López-Medrano, F., Lizasoain, M. & Aguado, J.M. *Aspergillus* Tracheobronchitis: Report of 8 Cases and Review of the Literature. *Medicine (Baltimore)* **91**, 261–273 (2012). DOI: 10.1097/MD.0b013e31826c2ccf.
84. Arastehfar, A., Carvalho, A., Houbraken, J., Lombardi, L., García-Rubio, R., Jenks, J.D., Rivero-Menendez, O., Aljohani, R., Jacobsen, I.D., Berman, J., Oshero, N., Hedayati, M.T., Ilkit, M., Armstrong-James, D., Gabaldón, T., Meletiadis, J., Kostrzewa, M., Pan, W., Lass-Flörl, C., Perlin, D.S. & Hoenigl, M. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis: From basics to clinics. *Stud. Mycol.* **100**, 100115 (2021). DOI: 10.1016/j.simyco.2021.100115.
85. Bernardeschi, C., Foulet, F., Ingen-Housz-Oro, S., Ortonne, N., Sitbon, K., Quereux, G., Lortholary, O., Chosidow, O., Bretagne, S. & French Mycosis Study Group. Cutaneous Invasive Aspergillosis: Retrospective Multicenter Study of the French Invasive-Aspergillosis Registry and Literature Review. *Medicine (Baltimore)* **94**, e1018 (2015). DOI: 10.1097/MD.0000000000001018.
86. Hasosah, M.Y. & Enemu, V. Invasive gastrointestinal aspergillosis in an immunocompromised host. *Saudi Med. J.* **30**, 439–440 (2009).
87. Zarrin, M. & Faramarzi, S. Study of Azole - Resistant and Cyp51a Gene in *Aspergillus fumigatus*. *Open Access Maced. J. Med. Sci.* **6**, 747–750 (2018). DOI: 10.3889/oamjms.2018.171.
88. Kühbacher, A., Peiffer, M., Hortschansky, P., Merschak, P., Bromley, M.J., Haas, H., Brakhage, A.A. & Gsaller, F. Azole Resistance-Associated Regulatory Motifs within the Promoter of cyp51A in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiol. Spectr.* **10**, e0120922 (2022). DOI: 10.1128/spectrum.01209-22.
89. Escribano, P., Rodríguez-Sánchez, B., Díaz-García, J., Martín-Gómez, M.T., Ibáñez-Martínez, E., Rodríguez-Mayo, M., Peláez, T., García-Gómez de la Pedrosa, E., Tejero-García, R., Marimón, J.M., Reigadas, E., Rezusta, A., Labayru-Echevarría, C., Pérez-Ayala, A., Ayats, J., Cobo, F., Pazos, C., López-Soria, L., Alastruey-Izquierdo, A., Muñoz, P., Guinea, J. & ASPEIN Study Group. Azole resistance survey on clinical *Aspergillus fumigatus* isolates in Spain. *Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**, 1170.e1-1170.e7 (2021). DOI: 10.1016/j.cmi.2020.09.042.
90. Azanza Perea, J. R. Equinocandinas: aspectos aplicados de la farmacología. *Rev. Iberoam. Micol.* **33**, 140–144 (2016). DOI: 10.1016/j.riam.2016.02.004.
91. Kofla, G. & Ruhnke, M. Pharmacology and metabolism of anidulafungin, caspofungin and micafungin in the treatment of invasive candidosis - review of the literature. *Eur. J. Med. Res.* **16**, 159–166 (2011). DOI: 10.1186/2047-783x-16-4-159.
92. Wiederhold, N.P., Locke, J.B., Daruwala, P. & Bartizal, K. Rezafungin (CD101) demonstrates potent in vitro activity against *Aspergillus*, including azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates and cryptic species. *J. Antimicrob. Chemother.* **73**, 3063–3067 (2018). DOI: 10.1093/jac/dky280.
93. Hori, M., Kakiki, K., Suzuki, S. & Misato, T. Studies on the Mode of Action of Polyoxins: Part III. Relation of Polyoxin Structure to Chitin Synthetase Inhibition. *Agric. Biol. Chem.* **35**, 1280–1291 (1971). DOI: 10.1080/00021369.1971.10860064.

94. Li, R., Xie, Z., Tian, Y., Yang, H., Chen, W., You, D., Liu, G., Deng, Z. & Tan, H. *polR*, a pathway-specific transcriptional regulatory gene, positively controls polyoxin biosynthesis in *Streptomyces cacaoi* subsp *asoensis*. *Microbiol Read Engl.* **155**, 1819-1831 (2009). DOI: 10.1099/mic.0.028639-0.
95. Clark, H. L., Valencia, H. E., Findeis-Hosey, J. J. & Georas, S. N. Invasive pulmonary aspergillosis in a patient with cirrhosis. *IDCases* **19**, e00722 (2020). DOI: 10.1016/j.idcr.2020.e00722.
96. Al-badriyeh, D., Neoh, C., Stewart, K. & Kong, D. Clinical utility of voriconazole eye drops in ophthalmic fungal keratitis. *Clin Ophthalmol Auckl NZ.* **4**, 391-405 (2010). DOI: 10.2147/OPHT.S6374.
97. Albengres, E., Le Louët, H. & Tillement, J.P. Systemic Antifungal Agents. *Drug Saf.* **18**, 83–97 (1998). DOI: 10.2165/00002018-199818020-00001.
98. Hope, W., Natarajan, P. & Goodwin, L. Invasive fungal infections. *Clin. Med.* **13**, 507–510 (2013). DOI: 10.7861/clinmedicine.13-5-507.
99. Misch, E. A. & Safdar, N. Updated guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis. *J. Thorac. Dis.* **8**, E1771–E1776 (2016). DOI: 10.21037/jtd.2016.12.76.
100. Maertens, J.A., Raad, I.I., Marr, K.A., Patterson, T.F., Kontoyiannis, D.P., Cornely, O.A, Bow, E.J., Rahav, G., Neofytos, D., Aoun, M., Baddley, J.W., Giladi, M., Heinz, W.J., Herbrecht, R., Hope, W., Karthaus, M., Lee, D.G., Lortholary, O., Morrison, V.A., Oren, I., Selleslag, D., Shoham, S., Thompson, G.R., Lee, M., Maher, R.M., Schmitt-Hoffmann, A.H., Zeiher, B. & Ullmann, A.J. Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by *Aspergillus* and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial. *Lancet Lond. Engl.* **387**, 760–769 (2016). DOI: 10.1016/S0140-6736(15)01159-9.
101. Falci, D.R. & Pasqualotto, A.C. Profile of isavuconazole and its potential in the treatment of severe invasive fungal infections. *Infect Drug Resist.* **6**, 163-174 (2013). DOI: 10.2147/IDR.S51340.
102. Azanza Perea, J. R. Anfotericina B liposomal: farmacología clínica, farmacocinética y farmacodinamia. *Rev. Iberoam. Micol.* **38**, 52–55 (2021). DOI: 10.1016/j.riam.2021.02.004.
103. Adler-Moore, J., Lewis, R.E., Brüggemann, R.J.M., Rijnders, B.J.A., Groll, A.H. & Walsh, T.J. Preclinical Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Antifungal Activity of Liposomal Amphotericin B. *Clin. Infect. Dis.* **68**, S244–S259 (2019). DOI: 10.1093/cid/ciz064.
104. Jović, Z., Jankovic, S.M., Zecevic, D.R., Milovanovic, D., Stefanovic, S., Folic, M., Milovanovic, J. & Kostic, M. Clinical Pharmacokinetics of Second-Generation Triazoles for the Treatment of Invasive Aspergillosis and Candidiasis. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **44**, 139–157 (2019). DOI: 10.1007/s13318-018-0513-7.
105. Liu, S., Li, Z., Zheng, J. & He, N. Invasive *Aspergillus* outbreak in inhalation injury: a case presentation and literature review. *BMC Infect. Dis.* **22**, 386 (2022). DOI: 10.1186/s12879-022-07366-7.
106. Oliver, J.D., Sibley, G.E.M., Beckmann, N., Dobb, K.S., Slater, M.J., McEntee, L., du Pré, S., Livermore, J., Bromley, M., Wiederhold, N.P., Hope, W.W., Kennedy, A.J., Law, D. & Birch, M. F901318 represents a novel class of antifungal drug that inhibits dihydroorotate

- dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 12809-12814 (2016). DOI: 10.1073/pnas.1608304113.
107. du Pré, S., Beckmann, N., Almeida, M.C., Sibley, G.E.M., Law, D., Brand, A.C., Birch, M., Read, N.D. & Oliver, J.D. Effect of the Novel Antifungal Drug F901318 (Olorofim) on Growth and Viability of *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, e00231-18 (2018). DOI: 10.1128/AAC.00231-18.
108. Jallow, S. & Govender, N. P. Ibrexafungerp: A First-in-Class Oral Triterpenoid Glucan Synthase Inhibitor. *J. Fungi* **7**, 163 (2021). DOI: 10.3390/jof7030163.
109. Gebremariam, T., Alkhazraji, S., Gu, Y., Singh, S., Alqarihi, A., Shaw, K.J. & Ibrahim, A.S. Galactomannan Is a Biomarker of Fosmanogepix (APX001) Efficacy in Treating Experimental Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **64**, e01966-19 (2019). DOI: 10.1128/AAC.01966-19.
110. Shaw, K.J., Schell, W.A., Covel, J., Duboc, G., Giamberardino, C., Kapoor, M., Moloney, M., Soltow, Q.A., Tenor, J.L., Toffaletti, D.L., Trzoss, M., Webb, P. & Perfect, J.R. In Vitro and In Vivo Evaluation of APX001A/APX001 and Other Gwt1 Inhibitors against *Cryptococcus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, e00523-18 (2018). DOI: 10.1128/AAC.00523-18.
111. Mitsuyama, J., Nomura, N., Hashimoto, K., Yamada, E., Nishikawa, H., Kaeriyama, M., Kimura, M., Todo, Y. & Narita, H. In vitro and in vivo antifungal activities of T-2307, a novel arylamidine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1318–1324 (2008). DOI: 10.1128/AAC.01159-07.
112. Yamashita, K., Miyazaki, T., Fukuda, Y., Mitsuyama, J., Saijo, T., Shimamura, S., Yamamoto, K., Imamura, Y., Izumikawa, K., Yanagihara, K., Kohno, S. & Mukae, H. The Novel Arylamidine T-2307 Selectively Disrupts Yeast Mitochondrial Function by Inhibiting Respiratory Chain Complexes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**, e00374-19 (2019). DOI: 10.1128/AAC.00374-19.
113. Verweij, E.P., Shurland, S.M., O'Shaughnessy, E., Dixon, C., Bala, S. & Higgins, K. Detection of Galactomannan in Broncho-Alveolar Lavage Fluids by Platelia™ *Aspergillus* Enzyme Immunoassay. Division of Special Pathogen and Transplant Products. *Biomarker Qualification* (2011). <https://www.fda.gov/media/89991>
114. Chan, J. F., Lau, S. K., Yuen, K.Y. & Woo, P. C. *Talaromyces (Penicillium) marneffeii* infection in non-HIV-infected patients. *Emerg. Microbes Infect.* **5**, e19 (2016). DOI: 10.1038/emi.2016.18.
115. Oshikata, C., Tsurikisawa, N., Saito, A., Watanabe, M., Kamata, Y., Tanaka, M., Tsuburai, T., Mitomi, H., Takatori, K., Yasueda, H. & Akiyama, K. Fatal pneumonia caused by *Penicillium digitatum*: a case report. *BMC Pulm. Med.* **13**, 16 (2013). DOI: 10.1186/1471-2466-13-16.
116. Dalle, F., Charles, P.E., Blanc, K., Caillot, D., Chavanet, P., Dromer, F. & Bonnin, A. *Cryptococcus neoformans* Galactoxylomannan Contains an Epitope(s) That Is Cross-Reactive with *Aspergillus* Galactomannan. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2929–2931 (2005). DOI: 10.1128/JCM.43.6.2929-2931.2005.
117. Takazono, T., Saijo, T., Ashizawa, N., Oshima, K., Nishimura, K., Tashiro, M., Yamamoto, K., Imamura, Y., Miyazaki, T., Yanagihara, K., Mukae, H., Izumikawa, K. & Sheppard, D.C. Clinical features and cause analysis of false positive results of *Aspergillus* galactomannan assay in pulmonary cryptococcosis patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **38**, 735–741 (2019). DOI: 10.1007/s10096-019-03469-3.

118. Hage, C. A., Carmona, E.M., Epelbaum, O., Evans, S.E., Gabe, L.M., Haydour, Q., Knox, K.S., Kolls, J.K., Murad, M.H., Wenganack, N.L. & Limper, A. Microbiological Laboratory Testing in the Diagnosis of Fungal Infections in Pulmonary and Critical Care Practice. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **200**, 535–550 (2019). DOI: 10.1164/rccm.201906-1185ST.
119. Wheat, L.J., Hackett, E., Durkin, M., Connolly, P., Petraitiene, R., Walsh, T.J., Knox, K. & Hage, C. Histoplasmosis-Associated Cross-Reactivity in the BioRad Platelia *Aspergillus* Enzyme Immunoassay. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**, 638–640 (2007). DOI: 10.1128/CVI.00479-06.
120. Wiedemann, A., Kakoschke, T.K., Speth, C., Rambach, G., Ensinger, C., Jensen, H.E. & Ebel, F. Distinct galactofuranose antigens in the cell wall and culture supernatants as a means to differentiate *Fusarium* from *Aspergillus* species. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **306**, 381–390 (2016). DOI: 10.1016/j.ijmm.2016.05.002.
121. Mikulska, M., Furfaro, E., del Bono, V., Gualandi, F., Raiola, A.M., Molinari, M.P., Gritti, P., Sanguinetti, M., Posteraro, B., Bacigalupo, A. & Viscoli, C. Galactomannan testing might be useful for early diagnosis of fusariosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **72**, 367–369 (2012). DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.12.009.
122. Tortorano, A. M., Esposto, M.C., Prigitano, A., Grancini, A., Ossi, C., Cavanna, C. & Lo Cascio, G. Cross-reactivity of *Fusarium* spp. in the *Aspergillus* Galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 1051–1053 (2012). DOI: 10.1128/JCM.05946-11.
123. Dichtl, K., Seybold, U., Ormanns, S., Horns, H. & Wagener, J. Evaluation of a Novel *Aspergillus* Antigen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Clin. Microbiol.* **57**, e00136-19 (2019). DOI: 10.1128/JCM.00136-19.
124. Ye, F., Zeng, P., Li, Z., Tang, C., Liu, W., Su, D., Zhan, Y. & Li, S. Detection of *Aspergillus* DNA in BALF by Real-time PCR and Galactomannan Antigen for the Early Diagnosis of Chronic Pulmonary Aspergillosis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **51**, 698–704 (2021).
125. Seo, H., Kim, J.Y., Son, H.J., Jung, J., Kim, M.J., Chong, Y.P., Lee, S.O., Choi, S.H., Kim, Y.S. & Kim, S.H. Diagnostic performance of real-time polymerase chain reaction assay on blood for invasive aspergillosis and mucormycosis. *Mycoses* **64**, 1554–1562 (2021). DOI: 10.1111/myc.13319.
126. Mikulska, M., Furfaro, E., De Carolis, E., Drago, E., Pulzato, I., Borghesi, M.L., Zappulo, E., Raiola, A.M., De Grazia, C., Del Bono, V., Cittadini, G., Angelucci, E., Sanguinetti, M. & Viscoli, C. Use of *Aspergillus fumigatus* real-time PCR in bronchoalveolar lavage samples (BAL) for diagnosis of invasive aspergillosis, including azole-resistant cases, in high risk haematology patients: the need for a combined use with galactomannan. *Med. Mycol.* **57**, 987–996 (2019). DOI: 10.1093/mmy/myz002.
127. Ruiz Camps, I. Aspergillosis: Beyond the oncohematological patient. *Enferm. Infec. Microbiol. Clínica* **38**, 1–3 (2020). DOI: 10.1016/j.eimc.2019.10.002.
128. Upton, A., Gugel, A., Leisenring, W., Limaye, A., Alexander, B., Hayden, R. & Marr, K.A. Reproducibility of Low Galactomannan Enzyme Immunoassay Index Values Tested in Multiple Laboratories. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4796–4800 (2005). DOI: 10.1128/JCM.43.9.4796-4800.2005.
129. Mendonca, A., Santos, H., Franco-Duarte, R. & Sampaio, P. Fungal infections diagnosis – Past, present and future. *Res Microbiol.* **173**:103915 (2022). DOI: 10.1016/j.resmic.2021.103915

130. Scharmann U, Kirchhoff L, Hain A, Buer, J., Koldehoff, M., Steinmann, J. & Rath, P.M. Evaluation of Three Commercial PCR Assays for the Detection of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* from Respiratory Samples of Immunocompromised Patients. *J Fungi Basel Switz.* **7**:132 (2021). DOI: 10.3390/jof7020132
131. Dannaoui, E., Gabriel, F., Gaboyard, M., Lagardere, G., Audebert, L., Quesne, G., Godichaud, S., Verweij, P.E., Accoceberry, I. & Bounoux, M.E. Molecular Diagnosis of Invasive Aspergillosis and Detection of Azole Resistance by a Newly Commercialized PCR Kit. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 3210–3218 (2017). DOI: 10.1128/JCM.01032-17.
132. Jenks, J.D., Spiess, B., Buchheidt, D., Hoenigl, M. (New) Methods for Detection of *Aspergillus fumigatus* Resistance in Clinical Samples. *Curr. Fungal Infect. Rep.* **13**, 129–136 (2019). DOI: 10.1007/s12281-019-00342-w.
133. Rath, P.M. & Steinmann, J. Overview of Commercially Available PCR Assays for the Detection of *Aspergillus* spp. DNA in Patient Samples. *Front. Microbiol.* **9**, 740 (2018). DOI: 10.3389/fmicb.2018.00740.
134. Danylo, A., Courtemanche, C., Pelletier, R. & Boudreault, A.A. Performance of MycAssay *Aspergillus* DNA real-time PCR assay compared with the galactomannan detection assay for the diagnosis of invasive aspergillosis from serum samples. *Med. Mycol.* **52**, 577–583 (2014). DOI: 10.1093/mmy/myu025.
135. Wickes, B. L. & Wiederhold, N. P. Molecular diagnostics in medical mycology. *Nat. Commun.* **9**, 5135 (2018). DOI: 10.1038/s41467-018-07556-5.
136. Denis, J., Forouzanfar, F., Herbrecht, R., Toussaint, E., Kessler, R., Sabou, M., Candolfi, E. & Letscher-Bru, V. Evaluation of Two Commercial Real-Time PCR Kits for *Aspergillus* DNA Detection in Bronchoalveolar Lavage Fluid in Patients with Invasive Pulmonary Aspergillosis. *J. Mol. Diagn. JMD* **20**, 298–306 (2018). DOI: 10.1016/j.jmoldx.2017.12.005.
137. Guinea, J., Padilla, C., Escribano, P., Muñoz, P., Padilla, B., Gijón, P. & Bouza, E. Evaluation of MycAssayTM *Aspergillus* for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients without hematological cancer. *PLoS One* **8**, e61545 (2013). DOI: 10.1371/journal.pone.0061545.
138. Pelzer, B.W., Seufert, R., Koldehoff, M., Liebrechts, T., Schmidt, D., Buer, J., Rath, P.M. & Steinmann, J. Performance of the AsperGenius[®] PCR assay for detecting azole resistant *Aspergillus fumigatus* in BAL fluids from allogeneic HSCT recipients: A prospective cohort study from Essen, West Germany. *Med. Mycol.* **58**, 268–271 (2020). DOI: 10.1093/mmy/myz050.
139. Chong, G.L.M., van de Sande, W.W.J., Dingemans, G.J.H., Gaajetaan, G.R., Vonk, A.G., Hayatte, M.P., van Tegelen, D.W.E., Simons, G.F.M. & Rijnders, B.J. Validation of a New *Aspergillus* Real-Time PCR Assay for Direct Detection of *Aspergillus* and Azole Resistance of *Aspergillus fumigatus* on Bronchoalveolar Lavage Fluid. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 868–874 (2015). DOI: 10.1128/JCM.03216-14.
140. Chong, G.M., van der Beek, M.T., von dem Borne, P.A., Boelens, J., Steel, E., Kampinga, G.A., Span, L.F.R., Lagrou, K., Maertens, J.A., Dingemans, G.J.H., Gaajetaan, G.R., van Tegelen, D.W.E., Cornelissen, J.J., Vonk, A.G. & Rijnders, B.J.A. PCR-based detection of *Aspergillus fumigatus* Cyp51A mutations on bronchoalveolar lavage: a multicentre validation of the AsperGenius assay[®] in 201 patients with haematological disease suspected for invasive aspergillosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 3528–3535 (2016). DOI: 10.1093/jac/dkw323.

141. White, P.L., Posso, R.B. & Barnes, R.A. Analytical and Clinical Evaluation of the PathoNostics AsperGenius Assay for Detection of Invasive Aspergillosis and Resistance to Azole Antifungal Drugs Directly from Plasma Samples. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 2356–2366 (2017). DOI: 10.1128/JCM.00411-17.
142. Straub, J., Paula, H., Mayr, M., Kasper, D., Assadian, O., Berger, A. & Rittenschober-Böhm, J. Diagnostic accuracy of the ROCHE Septifast PCR system for the rapid detection of blood pathogens in neonatal sepsis—A prospective clinical trial. *PLoS ONE* **12**, e0187688 (2017). DOI: 10.1371/journal.pone.0187688.
143. Sancho-Tello, S., Bravo, D., Borrás, R., Costa, E., Muñoz-Cobo, B. & Navarro, D. Performance of the LightCycler SeptiFast test Mgrade in detecting microbial pathogens in purulent fluids. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 2988–2991 (2011). DOI: 10.1128/JCM.00359-11.
144. Steinmann, J., Buer, J. & Rath, P.M. Detection of *Aspergillus fumigatus* in Blood Samples from Critically Ill Patients in Intensive Care Units by Use of the SeptiFast Assay. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 1918–1921 (2016). DOI: 10.1128/JCM.00478-16.
145. Zboromyrska, Y., Cillóniz, C., Cobos-Trigueros, N., Almela, M., Hurtado, J.C., Vergara, A., Mata, C., Soriano, A., Mensa, J., Marco, F. & Vila, J. Evaluation of the Magicplex™ Sepsis Real-Time Test for the Rapid Diagnosis of Bloodstream Infections in Adults. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 56 (2019). DOI: 10.3389/fcimb.2019.00056.
146. Camp, I., Spettel, K. & Willinger, B. Molecular Methods for the Diagnosis of Invasive Candidiasis. *J. Fungi* **6**, 101 (2020). DOI: 10.3390/jof6030101.
147. Grancini, A., Orlandi, A., Lunghi, G., Consonni, D., Pozzi, C., Rossetti, V., Paleshi, A., Fracchiolla, N., Melada, E., Savioli, M., Arghittu, M., Maiavacca, R. & Prigitano, A. Evaluation of Real Time PCR *Aspergillus* spp. in bronchoalveolar lavage samples. *New Microbiol.* **41**, 67–70 (2018).
148. Prattes, J., Hoenigl, M., Zinke, S.E.M., Heldt, S., Eigl, S., Johnson, G.L., Bustin, S., Stelzl, E. & Kessler, H.H. Evaluation of the new AspID polymerase chain reaction assay for detection of *Aspergillus* species: A pilot study. *Mycoses* **61**, 355–359 (2018). DOI: 10.1111/myc.12757.
149. Okada, K., Horikoshi, Y., Nishimura, N., Ishii, S., Nogami, H., Motomura, C., Miyairi, I., Tsumura, N., Mori, T., Ito, K., Honma, S., Nagai, K., Tanaka, H., Hayakawa, T., Abe, C. & Ouchi, K. Clinical evaluation of a new rapid immunochromatographic test for detection of *Bordetella pertussis* antigen. *Sci. Rep.* **12**, 8069 (2022). DOI: 10.1038/s41598-022-11933-y.
150. Jenks, J.D., Mehta, S.R., Taplitz, R., Aslam, S., Reed, S.L., Hoenigl, M. Point-of care Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Non-Neutropenic Patients: *Aspergillus* Galactomannan Lateral Flow Assay versus *Aspergillus*-specific Lateral Flow device test in Bronchoalveolar Lavage. *Mycoses* **62**, 230–236 (2019). DOI: 10.1111/myc.12881.
151. Linder, K.A., Kauffman, C.A., Zhou, S., Miceli, M.H. Clinical application of *Aspergillus* lateral flow device in bronchoalveolar lavage fluid of patients with classic risk factors for invasive pulmonary aspergillosis. *Mycoses* **62**, 1189–1193 (2019). DOI: 10.1111/myc.13012.
152. Mercier, T., Dunbar, A., de Kort, E., Schauwvlieghe, A., Reynders, M., Guldentops, E., Blijlevens, N.M.A., Vonk, A.G., Rijnders, B., Verweij, P.E., Lagrou, K. & Maertens, J. Lateral flow assays for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in adult hematology patients: A comparative multicenter study. *Med. Mycol.* **58**, 444–452 (2020). DOI: 10.1093/mmy/myz079.

153. Linder, K.A., Kauffman, C.A. & Miceli, M.H. Performance of *Aspergillus* Galactomannan Lateral Flow Assay on Bronchoalveolar Lavage Fluid for the Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *J. Fungi* **6**, 297 (2020). DOI: 10.3390/jof6040297.
154. White, P.L., Price, J.S., Posso, R., Cutlan-Vaughan, M., Vale, L. & Backx, M. Evaluation of the Performance of the IMMY sona *Aspergillus* Galactomannan Lateral Flow Assay When Testing Serum To Aid in Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **58**, e00053-20 (2020). DOI: 10.1128/JCM.01006-20.
155. Gallet, S., Garnaud, C., Dragonetti, C., Rivoiron, S., Cognet, O., Guo, Y., Lesénéchal, M., Maubon, D. & Cornet, M. Evaluation of a Prototype of a Novel Galactomannan Sandwich Assay Using the VIDAS® Technology for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **11**, 669237 (2021). DOI: 10.3389/fcimb.2021.669237.
156. Egger, M., Penziner, S., Dichtl, K., Gornicec, M., Kriegl, L., Krause, R., Khong, E., Mehta, S., Vargas, M., Gianella, S., Porrachia, M., Jenks, J.D., Venkataraman, I. & Hoenigl, M. Performance of the Euroimmun *Aspergillus* Antigen ELISA for the Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Bronchoalveolar Lavage Fluid. *J. Clin. Microbiol.* **60**, e00215-22 (2022). DOI: 10.1128/jcm.00215-22.
157. Krylov, V.B., Solovev, A.S., Argunov, D.A., Latgé, J.P. & Nifantiev, N.E. Reinvestigation of carbohydrate specificity of EB-A2 monoclonal antibody used in the immune detection of *Aspergillus fumigatus* galactomannan. *Heliyon* **5**, e01173 (2019). DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e01173.
158. Egl, S., Prattes, J., Lackner, M., Willinger, B., Spiess, B., Reinwald, M., Selitsch, B., Meilinger, M., Naumeister, P., Reischies, F., Wölfler, A., Raggam, R.B., Flick, H., Eschertzhuber, S., Krause, R., Buchheidt, D., Thornton, C.R., Lass-Flörl, C. & Hoenigl, M. Multicenter evaluation of a lateral-flow device test for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in ICU patients. *Crit. Care* **19**, 178 (2015). DOI: 10.1186/s13054-015-0905-x.
159. Almeida-Paes, R., Almeida, M. A., de Macedo, P.M., Caceres, D.H., Zancopé-Oliveira, R.M. Performance of Two Commercial Assays for the Detection of Serum *Aspergillus* Galactomannan in Non-Neutropenic Patients. *J. Fungi* **8**, 741 (2022). DOI: 10.3390/jof8070741.
160. Zhou, W., Li, H., Zhang, Y., Huang, M., He, Q., Li, P., Zhang, F., Shi, Y. & Su, X. Diagnostic Value of Galactomannan Antigen Test in Serum and Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples from Patients with Nonneutropenic Invasive Pulmonary Aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 2153–2161 (2017). DOI: 10.1128/JCM.00345-17.
161. Marr, K.A., Laverdiere, M., Gugel, A., Leisenring, W. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **40**, 1762–1769 (2005). DOI: 10.1086/429921.
162. Fisher, B.T., Westling, T., Boge, C.L.K., Zaoutis, T.E., Dvorak, C.C., Nieder, M., Zerr, D.M., Wingard, J.R., Villaluna, D., Esbenshade, A.J., Alexander, S., Gunn, S., Wheat, L.J. & Sung, L. Prospective Evaluation of Galactomannan and (1→3) β-d-Glucan Assays as Diagnostic Tools for Invasive Fungal Disease in Children, Adolescents, and Young Adults With Acute Myeloid Leukemia Receiving Fungal Prophylaxis. *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.* **10**, 864–871 (2021). DOI: 10.1093/jpids/piab036.

163. Dvorak, C.M.T., Akkutay-Yoldar, Z., Stone, S.R., Tousignant, S.J.P., Vannucci, F.A. & Murtaugh, M.P. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of antibodies to Senecavirus A in swine. *BMC. Veterinary Research*. **13**, 50 (2017). DOI: 10.1186/s12917-017-0967-x.
164. Veitch, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* **65**, 249–259 (2004). DOI: 10.1016/j.phytochem.2003.10.022.
165. Mosley, D. Synthesis of Luminol. *Org. Chem II Experiment* **9** (2017). OChemOnline. <https://silo.tips/org-chem-ii-experiment-9-synthesis-of-luminol-1>
166. Zhang, Z., Lai, J., Wu, K., Huang, X., Guo, S., Zhang, L. & Liu, J. Peroxidase-catalyzed chemiluminescence system and its application in immunoassay. *Talanta* **180**, 260–270 (2018). DOI: 10.1016/j.talanta.2017.12.024.
167. Beyzavi, K., Hampton, S., Kwasowski, P., Fickling, S., Marks, V. & Clift, R. Comparison of horseradish peroxidase and alkaline phosphatase-labelled antibodies in enzyme immunoassays. *Ann. Clin. Biochem.* **24**, 145–152 (1987). DOI: 10.1177/000456328702400204.
168. Li, J., Wagar, E. A. & Meng, Q. H. Comprehensive assessment of biotin interference in immunoassays. *Clin. Chim. Acta* **487**, 293–298 (2018). DOI: 10.1016/j.cca.2018.10.013.
169. Luong, J.H.T., Male, K.B. & Glennon, J.D. Biotin interference in immunoassays based on biotin-strept(avidin) chemistry: An emerging threat. *Biotechnol. Adv.* **37**, 634–641 (2019). DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.03.007.
170. Samarasinghe, S., Meah, F., Singh, V., Basit, A., Emanuele, N., Emanuele, M.A., Mazhari, A. & Holmes, E.W. Biotin Interference with Routine Clinical Immunoassays: Understand the Causes and Mitigate the Risks. *Endocr. Pract.* **23**, 989–998 (2017). DOI: 10.4158/EP171761.RA.
171. Boonsarngsuk, V., Niyompattama, A., Teosirimongkol, C., Sriwanichrak, K. False-positive serum and bronchoalveolar lavage *Aspergillus* galactomannan assays caused by different antibiotics. *Scand. J. Infect. Dis.* **42**, 461–468 (2010). DOI: 10.3109/00365541003602064.
172. Liu, W.D., Lin, S.W., Shih, M.C., Su, C.L., Wang, Y.W., Lin, S.C., Lee, Y.F., Huang, H.H., Chou, W.C., Wu, U.I., Chen, Y.C. & Chang, S.C. False-positive *Aspergillus* galactomannan immunoassays associated with intravenous human immunoglobulin administration. *Clin. Microbiol. Infect.* **26**, 1555.e9-1555.e14 (2020). DOI: 10.1016/j.cmi.2020.02.002.
173. Hage, C.A., Reynolds, J.M., Durkin, M., Wheat, L.J. & Knox, K.S. Plasmalyte as a Cause of False-Positive Results for *Aspergillus* Galactomannan in Bronchoalveolar Lavage Fluid. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 676–677 (2007). DOI: 10.1128/JCM.01940-06.
174. Racil, Z., Kocmanova, I., Lengerova, M., Winterova, J. & Mayer, J. Intravenous PLASMA-LYTE as a Major Cause of False-Positive Results of Platelia *Aspergillus* Test for Galactomannan Detection in Serum. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 3141–3142 (2007). DOI: 10.1128/JCM.00974-07.
175. Vena, A., Bouza, E., Álvarez-Uría, A., Gayoso, J., Rabadán, P.M., Cajuste, F., Guinea, J., Castellá, J.G., Alonso, R. & Muñoz, P. The misleading effect of serum galactomannan testing in high-risk haematology patients receiving prophylaxis with micafungin. *Clin. Microbiol. Infect.* **23**, 1000.e1-1000.e4 (2017). DOI: 10.1016/j.cmi.2017.05.006.
176. Gangneux, J.P., Lavarde, D., Bretagne, S., Guiguen, C. & Gandemer, V. Transient *Aspergillus* antigenaemia: think of milk. *Lancet* **359**, 1251 (2002). DOI: 10.1016/S0140-6736(02)08238-7.

177. DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* **28**, 350–356 (1956). DOI: 10.1021/AC60111A017.
178. BioRender. <https://app.biorender.com/>
179. Reiss, E. & Lehmann, P. F. Galactomannan antigenemia in invasive aspergillosis. *Infect. Immun.* **25**, 357–365 (1979). DOI: 10.1128/iai.25.1.357-365.1979.
180. Latgé, J.P., Kobayashi, H., Debeaupuis, J.P., Diaquin, M., Sarfati, J., Wieruszkeski, J.M., Parra, E., Bouchara, J.P. & Fournet, B. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **62**, 5424–5433 (1994). DOI: 10.1128/iai.62.12.5424-5433.1994.
181. Nakamura, R. M. Monoclonal antibodies: methods and clinical laboratory applications. *Clin. Physiol. Biochem.* **1**, 160–172 (1983).
182. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1984. NobelPrize.org <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1984/summary/>.
183. Sarfati, J., Boucias, D.G. & Latgé, J.P. Antigens of *Aspergillus fumigatus* produced in vivo. *J. Med. Vet. Mycol.* **33**, 9–14 (1995).
184. Stynen, D., Goris, A., Sarfati, J. & Latgé, J.P. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 497–500 (1995). DOI: 10.1128/jcm.33.2.497-500.1995.
185. Liu, M., Zheng, C., Cui, M., Zhang, X., Yang, D.P., Wang, X. & Cui, D. Graphene oxide wrapped with gold nanorods as a tag in a SERS based immunoassay for the hepatitis B surface antigen. *Microchim Acta.* **185**, 458 (2018). DOI: 10.1007/s00604-018-2989-x.
186. Deshpande, S. S. Enzyme Immunoassays: From Concept to Product Development. Chapman & Hall. **14**, 464 (1996). <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1169-0>.
187. Pavliuchenko, N., Hazarnian, V. & Bassil, M. Modification of Periodate Oxidation Method to Produce HRP-IgG Conjugate and Test its Stability Overtime. *Am. J. Mol. Biol.* **9**, 52–63 (2019). DOI: 10.4236/ajmb.2019.92005.
188. Wisdom, G. B. Horseradish Peroxidase Labeling of IgG Antibody. *The Protein Protocols Handbook*, 681–683. Humana Press (2009). DOI:10.1007/978-1-59745-198-7_66.
189. Tijssen, P. & Kurstak, E. Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates for enzyme immunoassays. *Anal. Biochem.* **136**, 451-457 (1984). DOI: 10.1016/0003-2697(84)90243-4.
190. Pitt, K.E., Campbell, L., Skubitz, A.P.N., Aamodt, R., Anouna, A., Baird, P.M., Beck, J., Bledsoe, M., De Souza, Y., Grizzle, W., Gosh, J., Holland, N., Hakimian, R., Michels, C., Sexton, K., Shea, K., Stark, A.T. & Vaught, J. Best Practices for Repositories I: Collection, Storage, and Retrieval of Human Biological Materials for Research. *Cell Preserv. Technol.* **3**, 5–48 (2005). DOI:10.1089/cpt.2005.3.5.
191. Zaidi, A., Kaur, H., Gupta, P., Gupta, N., Srinivasan, R., Dey, P., Rohilla, M., Rajwanshi, A., Bal, A. & Agarwal, R. Role of bronchoalveolar lavage in diagnosing pulmonary infections and

- malignancies: Experience from a tertiary care center. *Diagn. Cytopathol.* **48**, 1290–1299 (2020). DOI: 10.1002/dc.24574.
192. Pedroza, K.C.M.C., de Matos, S.B., de Moura, D., Oliveira, M.B.B., Araújo, M.A.S., Nascimento, R.J.M. & Lima, F.W.M. Reproducibility of Positive Results for the Detection of Serum Galactomannan by Platelia™ *Aspergillus* EIA. *Mycopathologia* **176**, 295-297 (2013). DOI: 10.1007/s11046-013-9670-z.
 193. Reiss, E., de Repentigny, L., Kuykendall, R.J., Carter, A.W., Galindo, R., Auger, P., Bragg, S.L. & Kaufman, L. Monoclonal antibodies against *Candida tropicalis* mannan: antigen detection by enzyme immunoassay and immunofluorescence. *J. Clin. Microbiol.* **24**, 796-802 (1986). doi:10.1128/jcm.24.5.796-802.1986.
 194. Dufresne, S.F., Datta, K., Li, X., Dadachova, E., Staab, J.F., Patterson, T.F., Feldmesser, M. & Marr, K.A. Detection of Urinary Excreted Fungal Galactomannan-like Antigens for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *PLoS ONE* **7**, e42736 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0042736.
 195. Landis, R. J. & Koch G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* **33**, 159-174 (1977).
 196. Productos Vircell - Vircell. <https://www.vircell.com/productos/?technique=37>
 197. Calero, A.L., Alonso, R., Gadea, I., Montero-Vega, M.D., Martín-García, M., Muñoz, P., Machado, M., Bouza, E. & García-Rodríguez, J. Comparison of the Performance of Two Galactomannan Detection Tests: Platelia *Aspergillus* Ag and *Aspergillus* Galactomannan Ag Virclia Monotest. *Microbiol. Spectr.* **10**, e0262621 (2022). DOI: 10.1128/spectrum.02626-21.
 198. Cummings, J.R., Jamison, G.R., Boudreaux, J.W., Howles, M.J., Walsh, T.J. & Hayden, R.T. Cross-reactivity of non-*Aspergillus* fungal species in the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **59**, 113–115 (2007). DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.04.022.
 199. Calixto, R., Mattos, B., Bittencourt, V., Lopes, L., Souza, L., Sasaki, G., Cipriani, T., Silva, M. & Barreto-Bergter, E. β -Galactofuranose-containing structures present in the cell wall of the saprophytic fungus *Cladosporium* (Hormoconis) resinae. *Res. Microbiol.* **161**, 720–728 (2010). DOI: 10.1016/j.resmic.2010.07.005.
 200. Ikuta, K., Shibata, N., Blake, J.S., Dahl, M.V., Nelson, R.D., Hisamichi, K., Kobayashi, H., Suzuki, S. & Okawa, Y. NMR study of the galactomannans of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Biochem. J.* **323**, 297–305 (1997). DOI: 10.1042/bj3230297.
 201. Singh, N., Obman, A., Husain, S., Aspinall, S., Mietzner, S. & Stout JE. Reactivity of Platelia *Aspergillus* Galactomannan Antigen with Piperacillin-Tazobactam: Clinical Implications Based on Achievable Concentrations in Serum. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1989-1992 (2004) DOI: 10.1128/AAC.48.6.1989-1992.2004.
 202. Mattei, D., Rapezzi, D., Mordini, N., Cuda, F., Lo Nigro, C., Musso, M., Arnelli, A., Cagnassi, S. & Gallamini, A. False-positive *Aspergillus* galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay results in vivo during amoxicillin-clavulanic acid treatment. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5362–5363 (2004). DOI: 10.1128/JCM.42.11.5362-5363.2004.
 203. Zandijk, E., Mewis, A., Magerman, K. & Cartuyvels, R. False-positive results by the Platelia *Aspergillus* galactomannan antigen test for patients treated with amoxicillin-clavulanate. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**, 1132–1133 (2008). DOI: 10.1128/CVI.00022-08.

204. Struck, R.F., Alberts, D.S., Horne, K., Phillips, J.G., Peng, Y.M. & Roe, D.J. Plasma pharmacokinetics of cyclophosphamide and its cytotoxic metabolites after intravenous versus oral administration in a randomized, crossover trial. *Cancer Res.* **47**, 2723–2726 (1987).
205. Hashiguchi, K., Niki, Y. & Soejima, R. Cyclophosphamide Induces False-Positive Results in Detection of *Aspergillus* Antigen in Urine. *Chest.* **105**, 975-976 (1994). DOI: 10.1378/chest.105.3.975b.
206. Rand, I.A.D., Blaikley, J., Booton, R., Chaudhuri, N., Gupta, V., Khalid, S., Mandal, S., Martin, J., Mills, J., Navani, N., Rahman, N.M., Wrightson, J.M., Manuvvar, M. & British Thoracic Society Bronchoscopy Guideline Group. British Thoracic Society guideline for diagnostic flexible bronchoscopy in adults: accredited by NICE. *Thorax* **68**, 1–44 (2013). DOI: 10.1136/thoraxjnl-2013-203618.
207. Heymann, F., Hamesch, K., Weiskirchen, R. & Tacke, F. The Concanavalin A model of acute hepatitis in mice. *Laboratory Animals.* **49**, 1-9 (2015). DOI: 10.1177/0023677215572841.
208. Han, S., Xue, Y., Zhang, J., Huang, J., Liu, X., Yang, Y., Bai, Z. & Wang, C. A Chemiluminescent Immunoassay for Osteocalcin in Human Serum and a Solution to the ‘Hook Effect’. *J. Anal. Methods Chem.* **2020**, 8891437 (2020). DOI: 10.1155/2020/8891437.
209. He, G., Dong, T., Yang, Z. & Jiang, Z. Mitigating hook effect in one-step quantitative sandwich lateral flow assay by timed conjugate release. *Talanta* **240**, 123157 (2022). DOI: 10.1016/j.talanta.2021.123157.
210. Schiettecatte, J., Anckaert, E. & Smits, J. Interferences in Immunoassays. Interferences in Immunoassays. *Advances in Immunoassay Technology. Norman Chiu* **3**, 45-58 (2012). DOI: 10.5772/35797.
211. Zhang, X.Y., Zhao S.Y. & Jiang, Z.F. Value of serum galactomannan assay in the diagnosis of pediatric invasive pulmonary aspergillosis. *Zhonghua Er Ke Za Zhi Chin. J. Pediatr.* **47**, 83–86 (2009).
212. Mennink-Kersten, M.A.S.H., Klont, R.R., Warris, A., Op den Camp, H.J.M. & Verweij, P.E. Bifidobacterial Lipoglycan as a New Cause for False-Positive Platelia *Aspergillus* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Reactivity. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3925–3931 (2005). DOI: 10.1128/JCM.43.8.3925-3931.2005.
213. Mennink-Kersten, M.A.S.H., Ruegebrink, D., Klont, R.R., Warris, A., Op den Camp, H.J.M. & Verweij, P.E. *Bifidobacterium* lipoteichoic acid and false ELISA reactivity in *Aspergillus* antigen detection. *Lancet Lond. Engl.* **363**, 325–327 (2004). DOI: 10.1016/S0140-6736(03)15393-7.
214. Siemann, M., Koch-Dörfler, M. & Gaude, M. False-positive results in premature infants with the Platelia *Aspergillus* sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Mycoses* **41**, 373–377 (1998). DOI: 10.1111/j.1439-0507.1998.tb00356.x.
215. Gorton, R.L., White, P.L., Bagkeris, E., Cotterall, D., Desai, R., McHugh, T. & Kibbler, C.C. Improved Standardization of the Bio-Rad Platelia *Aspergillus* Galactomannan Antigen Sandwich Enzyme Immunoassay Using the DS2 (Dynex) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Processing System. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 2072–2078 (2015). DOI: 10.1128/JCM.00157-15.
216. Guigue, N., Lardeux, S., Alanio, A., Hamane, S., Tabouret, M. & Bretagne, S. Importance of Operational Factors in the Reproducibility of *Aspergillus* Galactomannan Enzyme Immune Assay. *PLOS ONE* **10**, e0124044 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0124044.

217. Takazono, T., Ito, Y., Tashiro, M., Nishimura, K., Saijo, T., Yamamoto, K., Imamura, Y., Miyazaki, T., Yanagihara, K., Mukae, H. & Izumikawa. Evaluation of *Aspergillus*-Specific Lateral-Flow Device Test Using Serum and Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosis of Chronic Pulmonary Aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **57**, e00095-19 (2019). DOI: 10.1128/JCM.00095-19.
218. White, P.L., Parr, C., Thornton, C. & Barnes, R.A. Evaluation of Real-Time PCR, Galactomannan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), and a Novel Lateral-Flow Device for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 1510–1516 (2013). DOI: 10.1128/JCM.03189-12.
219. Hoenigl, M., Prattes, J., Spiess, B., Wagner, J., Pruessler, F., Raggam, R.B., Posh, V., Duettmann, W., Hoenigl, K., Wölfler, A., Koidl, C., Buzina, W., Reinwald, M., Thornton, C.R., Krause, R. & Buchheidt, D. Performance of galactomannan, beta-d-glucan, *Aspergillus* lateral-flow device, conventional culture, and PCR tests with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 2039–2045 (2014). DOI: 10.1128/JCM.00467-14.
220. Hoenigl, M., Egger, M., Boyer, J., Schulz, E., Prattes, J. & Jenks, J.D. Serum Lateral Flow assay with digital reader for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: A two-centre mixed cohort study. *Mycoses* **64**, 1197–1202 (2021). DOI: 10.1111/myc.13352.
221. Mercier, T., Schauwvlieghe, A., de Kort, E., Dunbar, A., Reynders, M., Guldentops, E., Rijnders, B., Verweij, P.E., Lagrou, K. & Maertens, J. Diagnosing Invasive Pulmonary Aspergillosis in Hematology Patients: a Retrospective Multicenter Evaluation of a Novel Lateral Flow Device. *J. Clin. Microbiol.* **57**, e01913-18 (2019). DOI: 10.1128/JCM.01913-18.
222. Rogers, T.R., Morton, C.O., Springer, J., Conneally, E., Heinz, W., Kenny, C., Frost, S., Einsele, H. & Loeffler, J. Combined real-time PCR and galactomannan surveillance improves diagnosis of invasive aspergillosis in high risk patients with haematological malignancies. *Br. J. Haematol.* **161**, 517–524 (2013). DOI: 10.1111/bjh.12285.
223. Heng, S.C., Morrissey, O., Chen, S.C.A., Thursky, K., Manser, R.L., Nation, R.L., Kong, D.C.M. & Slavin, M. Utility of bronchoalveolar lavage fluid galactomannan alone or in combination with PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis in adult hematology patients: a systematic review and meta-analysis. *Crit. Rev. Microbiol.* **41**, 124–134 (2015). DOI: 10.3109/1040841X.2013.804033.
224. Springer, J., Morton, C.O., Perry, M., Heinz, W.J., Paholcsek, M., Alzheimer, M., Rogers, T.R., Barnes, R.A., Einsele, H., Loeffler, J. & White, P.L. Multicenter comparison of serum and whole-blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA in high-risk hematological patients. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 1445–1450 (2013). DOI: 10.1128/JCM.03322-12.
225. Miceli, M. H. & Maertens, J. Role of Non-Culture-Based Tests, with an Emphasis on Galactomannan Testing for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **36**, 650–661 (2015). DOI: 10.1055/s-0035-1562892.
226. Wu, Z., Wang, L., Tan, L., Wu, J., Chen, Z. & Hu, M. Diagnostic value of galactomannan in serum and bronchoalveolar lavage fluid for invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **99**, 115274 (2021). DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115274
227. Verweij, P.E., Weemaes, C.M., Curfs, J.H., Bretagne, S. & Meis, J.F. Failure to detect circulating *Aspergillus* markers in a patient with chronic granulomatous disease and invasive

- aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3900–3901 (2000). DOI: 10.1128/JCM.38.10.3900-3901.2000.
228. Roilides, E. Early diagnosis of invasive aspergillosis in infants and children. *Med. Mycol.* **44**, S199–S205 (2006). DOI: 10.1080/13693780600810057.
229. Duettmann, W., Koidl, C., Troppan, K., Seeber, K., Buzina, W., Wölfler, A., Wagner, J., Krause, R. & Hoenigl, M. Serum and urine galactomannan testing for screening in patients with hematological malignancies. *Med. Mycol.* **52**, 647–652 (2014). DOI: 10.1093/mmy/myu019.
230. Marr, K.A., Datta, K., Mehta, S., Ostrader, D.B., Rock, M., Francis, J. & Feldmesser, M. Urine Antigen Detection as an Aid to Diagnose Invasive Aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* **67**, 1705–1711 (2018). DOI: 10.1093/cid/ciy326.
231. Mercier, T., Castagnola, E., Marr, K.A., Wheat, L.J., Verweij, P.E. & Maertens, J.A. Defining Galactomannan Positivity in the Updated EORTC/MSGERC Consensus Definitions of Invasive Fungal Diseases. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **72**, S89–S94 (2021). DOI: 10.1093/cid/ciaa1786.
232. Chong, G.M., Maertens, J.A., Lagrou, K., Driessen, G.J., Cornelissen, J.J. & Rijnders, B.J.A. Diagnostic Performance of Galactomannan Antigen Testing in Cerebrospinal Fluid. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 428–431 (2016). DOI: 10.1128/JCM.02913-15.
233. Kimpton, G., White, P.L. & Barnes, R.A. The effect of sample storage on the performance and reproducibility of the galactomannan EIA test. *Med. Mycol.* **52**, 618–626 (2014). DOI: 10.1093/mmy/myu014.
234. Furfaro, E., Mikulska, M., Miletich, F. & Viscoli, C. Galactomannan: testing the same sample twice? *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* **14**, E38–39 (2012). DOI: 10.1111/j.1399-3062.2012.00733.x.
235. Wheat, L.J., Nguyen, M.H., Alexander, B.D., Denning, D., Caliendo, A.M., Lyon, G.M., Baden, L.R., Marty, F.M., Clancy, C., Kirsch, E., Noth, P., Witt, J., Sugrue, M. & Wingard, J.R. Long-Term Stability at –20°C of *Aspergillus* Galactomannan in Serum and Bronchoalveolar Lavage Specimens. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 2108–2111 (2014). DOI: 10.1128/JCM.03500-13.
236. Johnson, G.L., Sarker, S.J., Hill, K., Tsitsikas, D.A., Morin, A., Bustin, S.A. & Agrawal, S.G. Significant Decline in Galactomannan Signal during Storage of Clinical Serum Samples. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 12970–12977 (2013). DOI: 10.3390/ijms140712970.
237. Aigner, M., Wanner, M., Kreidl, P., Lass-Flörl, C. & Lackner, M. *Candida* in the Respiratory Tract Potentially Triggers Galactomannan Positivity in Nonhematological Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**, e00138-19 (2019). DOI: 10.1128/AAC.00138-19.
238. Sulahian, A., Touratier, S. & Ribaud, P. False positive test for *Aspergillus* antigenemia related to concomitant administration of piperacillin and tazobactam. *N. Engl. J. Med.* **349**, 2366–2367 (2003). DOI: 10.1056/NEJM200312113492424.
239. Walsh, T.J., Shoham, S., Petraitiene, R., Sein, T., Schaufele, R., Kelaher, A., Murray, H., Mya-San, C., Bacher, J. & Petraitis, V. Detection of galactomannan antigenemia in patients receiving piperacillin-tazobactam and correlations between in vitro, in vivo, and clinical properties of the drug-antigen interaction. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4744–4748 (2004). DOI: 10.1128/JCM.42.10.4744-4748.2004.

240. Aubry, A., Porcher, R., Bottero, J., Touratier, S., Leblanc, T., Brethon, B., Rousselot, P., Raffoux, E., Menotti, J., Derouin, F., Ribaud, P. & Sulahian, A. Occurrence and kinetics of false-positive *Aspergillus* galactomannan test results following treatment with beta-lactam antibiotics in patients with hematological disorders. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 389–394 (2006). DOI: 10.1128/JCM.44.2.389-394.2006.
241. Bart-Delabesse, E., Basile, M., Al Jijakli, A., Souville, D., Gay, F., Philippe, B., Bossi, P., Danis, M., Vernant, J.P. & Datry, A. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigenemia to determine biological and clinical implications of beta-lactam treatments. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5214–5220 (2005). DOI: 10.1128/JCM.43.10.5214-5220.2005.
242. Cornely, O.A., Gow, N., Hoenigl, M. & Warris, A. 10th Trends in Medical Mycology Held on 8 to 11 October 2021, Aberdeen, Scotland, Organized by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM). *J. Fungi Basel Switz.* **7**, 916 (2021). DOI: 10.3390/jof7110916.
243. Matarazzo, E., Lenarduzzi, S., Renica, S., Iannantuoni, M., Fanti, D., Campisi, D., Lombardi, G. & Vismara, C.S. Comparison of 3 methods for the determination of galactomannan in bronchoalveolar lavage samples (BAL). *ASST GOM Niguarda, Milan* (2022).
244. Troncoso, C.R., Sepúlveda, F.C., Sepúlveda, P.E., Guzmán, U.C., Morales, G.M. & Tapia, P. C. Evaluation of the *Aspergillus* Galactomannan ag VircliaR Monotest test as an alternative to PlateliaTM *Aspergillus* EIA kit. *Rev. Chil. Infectología* **39**, 248–253 (2022). DOI: 10.4067/s0716-10182022000200248.
245. Rubio, M., Pardo, S., Lloret, C., Prat, J., Sauquillo, J.M., Peman, J. & Lopez, J.L. Evaluación inicial de la técnica de inmunocromatografía sónica *Aspergillus* lateral flow en el diagnóstico de aspergilosis invasiva en un hospital terciario. XXV Congreso Nacional SEIMC, Hospital La Fe, Valencia (2022).
246. Mercier, T., Dunbar, A., Veldhuizen, V., Holtappels, M., Schauwvlieghe, A., Maertens, J., Rijnders, B. & Wauters, J. Point of care *Aspergillus* testing in intensive care patients. *Crit Care.* **24**, 642 (2020). DOI: 10.1186/s13054-020-03367-7.
247. Salvo, M., Moroni, A., Greta, R., Marangoni, A., Cricca, M. & Lazzarotto, T. Antigen galactomannan identification in the course of pandemic COVID-19: Comparison between two serological tests. *Poster AMCLI Congress 2022*. Rimini, Italy (2022).
248. Kümmig, T., Esse, J., Herbst, L., Castellanos, I., Straub, R., Geibdorfer, W., Mihai, S., Rakova, N., Cipa, F., Pflaum, D., Werblow, M., Lang, A.K., Bremer, F., Ganslmayer, M., Willam, C. & Held, J. Abstracts of the 55th Scientific Conference of the German speaking Mycological Society (DMyKG) e.V., 27-29 September 2021, Digital, Germany. *Mycoses* **64**, 3–33 (2021). DOI: 10.1111/myc.13356.
249. Buil, J.B., Ergün, M., van Grootveld, R., Delma, F.Z., Melchers, W.J.G., Shouten, J.A. & Verweij, P.E. Virclia Galactomannan detection in BAL for rapid diagnosis of COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. *Poster ECMMID 2022*, Lisbon (2022).
250. Arregui, I., Polo, I., Erviti, E., Beguiristain, I., Henríquez, L. & Ezpeleta C. Detección de galactomanano en el diagnóstico de aspergilosis invasiva. XXV Congreso Nacional SEIMC, Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona (2022).
251. Lago, M.R., Meza, D.L., Rodríguez, M.E., Eguileor, Z., Pérez de Madrid, S., Voyer, S., Rey, A., Solís, S., Tena, D. & González, A. Aspergilosis pulmonar asociada a COVID-19 en pacientes

críticos en el área de Guadalajara. *XXV Congreso Nacional SEIMC*, Hospital Universitario de Guadalajara, Guadalajara (2022).

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO I. ESTUDIO COMPARATIVO TÉCNICA CLIA – ELISA.

VARIABLE = RLU_CLIA

POSITIVE GROUP = PLATELIA="P"

Sample size = 17

NEGATIVE GROUP = PLATELIA="N"

Sample size = 13

Disease prevalence (%) = 56,7

Area under the ROC curve = 0,977

Standard error = 0,027

95% Confidence interval = 0,844 to 0,992

Criterion	Sens. (95% C.I.)	Spec. (95% C.I.)	+LR	-LR	+PV	-PV
>=0,188	100,0 (100,0-100,0)	0,0 (0,0- 0,0)	1,00		56,7	
> 0,188	100,0 (100,0-100,0)	7,7 (1,3- 36,1)	1,08	0,00	58,6	100,0
> 0,196	100,0 (100,0-100,0)	15,4 (2,4- °,5)	1,18	0,00	60,7	100,0
> 0,227	100,0 (100,0-100,0)	23,1 (5,3- 53,8)	1,30	0,00	63,0	100,0
> 0,237	100,0 (100,0-100,0)	30,8 (9,3- 61,4)	1,44	0,00	65,4	100,0
> 0,241	100,0 (100,0-100,0)	38,5 (14,0- 68,4)	1,62	0,00	68,0	100,0
> 0,249	100,0 (100,0-100,0)	46,2 (19,3- 74,8)	1,86	0,00	70,8	100,0
> 0,355	100,0 (100,0-100,0)	53,8 (25,2- 80,7)	2,17	0,00	73,9	100,0
> 0,359	100,0 (100,0-100,0)	61,5 (31,6- 86,0)	2,60	0,00	77,3	100,0
> 0,422	100,0 (100,0-100,0)	69,2 (38,6- 90,7)	3,25	0,00	81,0	100,0
> 0,621	94,1 (71,2- 99,0)	69,2 (38,6- 90,7)	3,06	0,08	80,0	90,0
> 0,653	94,1 (71,2- 99,0)	76,9 (46,2- 94,7)	4,08	0,08	84,2	90,9
> 0,772	94,1 (71,2- 99,0)	84,6 (54,5- 97,6)	6,12	0,07	88,9	91,7
> 0,882	94,1 (71,2- 99,0)	92,3 (63,9- 98,7)	12,24	0,06	94,1	92,3
> 0,91	88,2 (63,5- 98,2)	92,3 (63,9- 98,7)	11,47	0,13	93,7	85,7
> 0,938 *	88,2 (63,5- 98,2)	100,0 (100,0-100,0)		0,12	100,0	86,7
> 0,94	82,4 (56,6- 96,0)	100,0 (100,0-100,0)		0,18	100,0	81,2

> 1,01	76,5 (50,1- 93,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,24	100,0	76,5
> 1,019	70,6 (44,1- 89,6)	100,0 (100,0-100,0)	0,29	100,0	72,2
> 1,044	64,7 (38,4- 85,7)	100,0 (100,0-100,0)	0,35	100,0	68,4
> 1,105	58,8 (33,0- 81,5)	100,0 (100,0-100,0)	0,41	100,0	65,0
> 1,132	52,9 (27,9- 77,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,47	100,0	61,9
> 1,299	47,1 (23,0- 72,1)	100,0 (100,0-100,0)	0,53	100,0	59,1
> 1,685	41,2 (18,5- 67,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,59	100,0	56,5
> 2,511	35,3 (14,3- 61,6)	100,0 (100,0-100,0)	0,65	100,0	54,2
> 3,099	29,4 (10,4- 55,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,71	100,0	52,0
> 6,791	23,5 (7,0- 49,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,76	100,0	50,0
> 32,278	17,6 (4,0- 43,4)	100,0 (100,0-100,0)	0,82	100,0	48,1
> 37,993	11,8 (1,8- 36,5)	100,0 (100,0-100,0)	0,88	100,0	46,4
> 38,255	5,9 (1,0- 28,8)	100,0 (100,0-100,0)	0,94	100,0	44,8
> 40,498	0,0 (0,0- 0,0)	100,0 (100,0-100,0)	1,00		43,3

Sens. = Sensitivity

Spec. = Specificity

+LR = Positive likelihood ratio

-LR = Negative likelihood ratio

+PV = Positive predictive value

-PV = Negative predictive value

ANEXO II. DATOS BRUTOS ESTUDIO INTERNO GLOBAL.

Tipo de muestra	Código muestra	Ensayo de referencia (ELISA)			Ensayo en evaluación (CLIA)			CORRELACIÓN
		Valor (DO)	Índice	Interpretación	Valor (RLU)	Índice	Interpretación	
Suero	R-279-086	3,7	4,15	P	5,78	1,37	P	VP
Suero	R-279-087	0,59	0,66	P	1,12	0,28	P	VP
Suero	R-279-088	0,14	0,16	N	0,15	0,03	N	VN
Suero	R-279-089	0,14	0,16	N	1,43	0,3	P	FP
Suero	R-279-090	3,66	4,07	P	14,38	3,22	P	VP
Suero	R-279-091	1,8	2,01	P	2,51	0,85	P	VP
Suero	R-281-075	0,25	0,28	N	0,08	0,02	N	VN
Suero	R-281-076	3,33	3,69	P	27,05	6,64	P	VP
Suero	R-281-077	2,11	2,34	P	3,17	0,76	P	VP
Suero	R-287-070	0,23	0,25	N	0,08	0,02	N	VN
Suero	R-287-071	3,24	3,6	P	36,36	10,58	P	VP
Suero	R-287-072	1,73	1,92	P	5,84	2,31	P	VP
Suero	R-287-074	0,09	0,11	N	0,08	0,02	N	VN
Suero	R-287-075	2,88	3,19	P	3,43	1,24	P	VP
Suero	R-287-076	3,75	4,16	P	20,37	5,83	P	VP
Suero	R-288-047	3,34	3,72	P	15,07	5,25	P	VP
Suero	R-288-048	0,58	0,64	P	0,3	0,08	N	FN
Suero	R-288-051	0,96	1,07	P	0,63	0,26	P	VP
LBA	R-289-099	3,31	3,67	P	2,77	1,19	P	VP
Suero	R-289-100	0,37	0,41	N	0,35	0,14	N	VN
Suero	R-290-001	1,33	1,48	P	0,73	0,26	P	VP
Suero	R-290-002	0,59	0,71	P	0,23	0,12	N	FN
Suero	R-290-003	0,85	0,94	P	0,62	0,23	P	VP
Suero	R-291-046	0,69	0,77	P	0,46	0,16	N	FN
Suero	R-296-087	0,15	0,34	N	0,23	0,05	N	VN
Suero	R-296-088	0,23	0,25	N	0,19	0,04	N	VN
Suero	R-296-089	0,1	0,21	N	0,09	0,02	N	VN
Suero	R-296-090	3,23	3,59	P	7,25	1,96	P	VP
Suero	R-296-091	0,19	0,21	N	0,18	0,04	N	VN
Suero	R-296-092	0,28	0,63	P	0,43	0,1	N	FN
Suero	R-316-001	0,02	0,05	N	0,07	0,02	N	VN
Suero	R-316-002	0,03	0,07	N	0,07	0,02	N	VN
Suero	R-316-003	0,03	0,07	N	0,06	0,01	N	VN
Suero	R-316-004	0,15	0,17	N	0,05	0,01	N	VN
Suero	R-316-005	0,03	0,06	N	0,53	0,02	N	VN
Suero	R-316-006	0,02	0,04	N	0,06	0,02	N	VN
Suero	R-316-007	0,03	0,06	N	0,06	0,02	N	VN
Suero	R-316-008	0,07	0,15	N	0,07	0,02	N	VN
Suero	R-316-009	0,02	0,05	N	0,06	0,02	N	VN
Suero	R-316-010	0,02	0,04	N	0,11	0,04	N	VN

Tipo de muestra	Código muestra	Ensayo de referencia (ELISA)			Ensayo en evaluación (CLIA)			CORRELACIÓN
		Valor (DO)	Índice	Interpretación	Valor (RLU)	Índice	Interpretación	
Suero	R-316-011	0,05	0,1	N	0,05	0,02	N	VN
Suero	R-316-012	0,05	0,11	N	0,06	0,02	N	VN
Suero	R-316-013	0,03	0,07	N	0,17	0,06	N	VN
Suero	R-316-014	0,02	0,05	N	0,08	0,03	N	VN
Suero	R-316-015	0,04	0,08	N	0,07	0,02	N	VN
Suero	R-316-016	0,02	0,05	N	0,05	0,02	N	VN
Suero	R-316-017	0,02	0,04	N	0,09	0,02	N	VN
Suero	R-316-018	0,03	0,06	N	0,1	0,02	N	VN
Suero	R-316-019	0,04	0,09	N	0,07	0,02	N	VN
Suero	R-316-020	0,06	0,14	N	0,06	0,01	N	VN
Suero	R-316-021	0,06	0,12	N	0,07	0,01	N	VN
Suero	R-316-022	0,02	0,03	N	0,08	0,02	N	VN
Suero	R-316-023	0,03	0,06	N	0,06	0,01	N	VN
Suero	R-316-024	0,02	0,03	N	0,06	0,01	N	VN
Suero	R-316-025	0,02	0,04	N	0,05	0,01	N	VN
Suero	R-316-026	0,02	0,04	N	0,07	0,01	N	VN
Suero	R-316-027	0,03	0,06	N	0,07	0,02	N	VN
Suero	R-316-028	0,06	0,12	N	0,06	0,01	N	VN
Suero	R-316-029	0,03	0,06	N	0,06	0,02	N	VN
Suero	R-316-030	0,01	0,02	N	0,05	0,02	N	VN
Suero	R-316-031	0,02	0,05	N	0,05	0,02	N	VN
Suero	R-316-032	0,02	0,05	N	0,06	0,02	N	VN
Suero	R-316-033	0,02	0,04	N	0,04	0,02	N	VN
Suero	R-316-034	0,02	0,04	N	0,06	0,02	N	VN
Suero	R-316-035	0,03	0,06	N	0,05	0,02	N	VN
Suero	R-316-036	0,03	0,07	N	0,06	0,02	N	VN
Suero	R-316-037	0,02	0,05	N	0,05	0,02	N	VN
Suero	R-316-038	0,02	0,04	N	0,06	0,02	N	VN
Suero	R-316-039	0,08	0,17	N	0,06	0,02	N	VN
Suero	R-316-040	0,2	0,44	N	0,84	0,27	P	FP
Suero	R-316-042	0,02	0,03	N	0,1	0,02	N	VN
Suero	R-316-043	0,02	0,04	N	0,08	0,02	N	VN
Suero	R-316-045	0,31	0,68	P	0,7	0,17	B	B
Suero	R-316-047	0,05	0,06	N	0,09	0,02	N	VN
Suero	R-316-049	0,02	0,04	N	0,09	0,02	N	VN
Suero	R-316-050	0,02	0,04	N	0,07	0,01	N	VN
Suero	R-316-053	0,13	0,29	N	0,6	0,16	N	VN
Suero	R-316-054	0,03	0,06	N	1,12	0,24	P	FP
Suero	R-316-057	0,14	0,31	N	0,26	0,06	N	VN
Suero	R-316-058	0,04	0,08	N	0,08	0,02	N	VN
Suero	R-316-059	0,02	0,05	N	0,47	0,11	N	VN
Suero	R-316-061	0,76	1,69	P	1,29	0,29	P	VP
Suero	R-316-062	0,15	0,33	N	0,5	0,17	B	B

Tipo de muestra	Código muestra	Ensayo de referencia (ELISA)			Ensayo en evaluación (CLIA)			CORRELACIÓN
		Valor (DO)	Índice	Interpretación	Valor (RLU)	Índice	Interpretación	
Suero	R-316-063	0,8	1,78	P	1,52	0,38	P	VP
Suero	R-316-065	0,13	0,28	N	0,43	0,11	N	VN
Suero	R-316-067	0,1	0,21	N	0,08	0,03	N	VN
Suero	R-316-068	0,12	0,26	N	0,13	0,03	N	VN
Suero	R-316-069	0,87	1,93	P	3,01	0,78	P	VP
Suero	R-316-071	2,51	5,57	P	0,48	0,13	N	FN
Suero	R-316-072	0,28	0,63	P	0,08	0,02	N	FN
Suero	R-316-073	0,12	0,26	N	1,37	0,36	P	FP
Suero	R-316-074	0,24	0,53	P	0,08	0,02	N	FN
Suero	R-316-076	0,03	0,06	N	0,16	0,06	N	VN
Suero	R-316-077	0,67	1,49	P	1,49	0,37	P	VP
Suero	R-316-078	0,03	0,08	N	0,12	0,03	N	VN
Suero	R-316-079	0,39	0,87	P	0,45	0,08	N	FN
Suero	R-316-080	0,18	0,4	N	0,43	0,12	N	VN
Suero	R-316-081	0,18	0,41	N	6,47	1,37	P	FP
Suero	R-316-083	0,03	0,07	N	0,3	0,08	N	VN
Suero	R-316-086	0,18	0,4	N	0,86	0,19	B	B
Suero	R-316-088	0,03	0,07	N	0,14	0,04	N	VN
Suero	R-316-089	0,4	0,89	P	0,37	0,09	N	FN
Suero	R-316-091	1,8	3,99	P	3,66	1,41	P	VP
Suero	R-316-093	0,03	0,07	N	0,09	0,02	N	VN
Suero	R-316-094	0,36	0,81	P	0,56	0,23	P	VP
Suero	R-316-095	0,53	1,18	P	0,66	0,18	B	B
Suero	R-316-096	0,26	0,57	P	0,79	0,31	P	VP
Suero	R-316-097	0,32	0,7	P	0,72	0,2	B	B
Suero	R-316-099	0,5	1,12	P	1,14	0,35	P	VP
Suero	R-316-100	0,17	0,37	N	0,54	0,16	N	VN
Suero	R-317-001	0,12	0,26	N	0,27	0,11	N	VN
Suero	R-317-003	0,15	0,33	N	0,39	0,16	N	VN
Suero	R-317-005	3,55	7,89	P	20,95	7,11	P	VP
Suero	R-317-007	2,07	4,61	P	4,88	1,66	P	VP
LBA	R-317-008	0,26	0,57	P	0,32	0,15	N	FN
LBA	R-317-009	0,25	0,54	P	3,79	1,26	P	VP
LBA	R-317-010	0,23	0,51	P	0,47	0,19	B	B
LBA	R-317-011	0,06	0,14	N	0,15	0,08	N	VN
LBA	R-317-012	0,75	1,32	P	3,01	0,42	P	VP
LBA	R-317-014	0,01	0,01	N	0,1	0,02	N	VN
LBA	R-317-015	0,05	0,09	N	0,37	0,06	N	VN
LBA	R-317-016	0,15	0,25	N	8,09	1,72	P	FP
LBA	R-317-017	0,13	0,23	N	5,16	0,87	P	FP
LBA	R-317-018	0,12	0,21	N	1,32	0,31	P	FP
LBA	R-317-020	0,11	0,19	N	5,27	0,89	P	FP
LBA	R-317-021	0,64	1,13	P	9,82	1,71	P	VP

Tipo de muestra	Código muestra	Ensayo de referencia (ELISA)			Ensayo en evaluación (CLIA)			CORRELACIÓN
		Valor (DO)	Índice	Interpretación	Valor (RLU)	Índice	Interpretación	
LBA	R-317-022	2,47	4,33	P	6	0,96	P	VP
LBA	R-317-023	0,2	0,35	N	0,88	0,19	B	B
LBA	R-317-024	1,31	2,3	P	4,95	1,03	P	VP
LBA	R-317-025	0,01	0,02	N	0,26	0,06	N	VN
LBA	R-317-026	0,45	0,79	P	2,1	0,51	P	VP
LBA	R-317-027	0,39	0,68	P	4,12	1,02	P	VP
LBA	R-317-028	0,66	1,15	P	0,71	0,19	B	B
LBA	R-317-029	0,04	0,06	N	0,15	0,05	N	VN
LBA	R-317-030	0,05	0,09	N	0,08	0,02	N	VN
LBA	R-317-033	1,31	2,29	P	16,06	4,52	P	VP
LBA	R-317-034	1,3	1,46	P	3,05	0,76	P	VP
LBA	R-317-037	0,05	0,09	N	0,13	0,04	N	VN
LBA	R-317-038	0,08	0,13	N	31,83	5,78	P	FP
LBA	R-317-039	0,06	0,11	N	0,33	0,11	N	VN
LBA	R-317-042	0,36	0,41	N	7,82	1,59	P	FP
LBA	R-317-045	0,02	0,03	N	0,07	0,03	N	VN
LBA	R-317-046	0,02	0,03	N	0,07	0,03	N	VN
LBA	R-317-049	0,04	0,07	N	0,07	0,03	N	VN
LBA	R-317-054	0,02	0,04	N	0,13	0,03	N	VN
LBA	R-317-056	0,12	0,21	N	0,46	0,08	N	VN
LBA	R-317-057	0,03	0,05	N	0,17	0,03	N	VN
LBA	R-317-061	0,4	0,51	P	0,73	0,18	B	B
LBA	R-317-066	0,02	0,04	N	0,1	0,02	N	VN
LBA	R-317-068	0,17	0,19	N	0,09	0,02	N	VN
LBA	R-317-069	0,36	0,41	N	0,2	0,05	N	VN
LBA	R-317-071	0,03	0,05	N	0,12	0,02	N	VN
LBA	R-317-072	0,06	0,11	N	0,52	0,11	N	VN
LBA	R-317-074	0,03	0,04	N	0,11	0,02	N	VN
LBA	R-317-076	0,04	0,07	N	0,08	0,02	N	VN
LBA	R-317-077	0,02	0,03	N	0,07	0,02	N	VN
LBA	R-317-079	0,08	0,09	N	0,12	0,02	N	VN
LBA	R-317-081	0,05	0,06	N	0,11	0,02	N	VN
LBA	R-317-083	0,08	0,09	N	0,11	0,02	N	VN
Suero	R-317-085	1,18	1,24	P	0,19	0,07	N	FN
LBA	R-317-087	0,08	0,1	N	0,08	0,02	N	VN
LBA	R-317-089	0,05	0,06	N	0,08	0,01	N	VN
Suero	R-317-091	1,64	1,85	P	1,4	0,55	P	VP
Suero	R-317-093	0,05	0,06	N	0,1	0,02	N	VN
LBA	R-317-095	0,03	0,04	N	0,11	0,02	N	VN
LBA	R-317-098	0,05	0,05	N	0,09	0,02	N	VN
LBA	R-317-100	0,05	0,05	N	0,09	0,02	N	VN
LBA	R-318-002	0,04	0,05	N	0,11	0,02	N	VN
LBA	R-318-004	0,1	0,11	N	0,08	0,03	N	VN

Tipo de muestra	Código muestra	Ensayo de referencia (ELISA)			Ensayo en evaluación (CLIA)			CORRELACIÓN
		Valor (DO)	Índice	Interpretación	Valor (RLU)	Índice	Interpretación	
LBA	R-318-005	0,08	0,09	N	0,19	0,04	N	VN
LBA	R-318-008	0,07	0,08	N	0,21	0,04	N	VN
LBA	R-318-010	0,05	0,05	N	0,1	0,02	N	VN
LBA	R-318-011	0,09	0,1	N	0,07	0,02	N	VN
LBA	R-318-013	0,06	0,06	N	0,09	0,03	N	VN
LBA	R-318-014	0,04	0,05	N	0,09	0,03	N	VN
Suero	R-318-015	0,73	0,82	P	5,49	1,36	P	VP
LBA	R-318-016	0,05	0,06	N	0,08	0,03	N	VN
Suero	R-318-017	0,48	0,54	P	1	0,28	P	VP
LBA	R-318-018	0,06	0,11	N	0,1	0,02	N	VN
LBA	R-318-019	0,04	0,05	N	0,12	0,04	N	VN
LBA	R-318-020	0,04	0,05	N	0,08	0,03	N	VN
LBA	R-318-021	0,05	0,06	N	0,09	0,03	N	VN
LBA	R-318-022	0,04	0,05	N	0,08	0,03	N	VN
LBA	R-318-023	0,04	0,04	N	0,09	0,03	N	VN
LBA	R-318-024	0,05	0,06	N	0,13	0,02	N	VN
Suero	R-318-025	0,17	0,19	N	0,18	0,03	N	VN
LBA	R-318-026	0,06	0,07	N	0,17	0,03	N	VN
LBA	R-318-027	0,05	0,06	N	0,08	0,02	N	VN
LBA	R-318-028	0,04	0,05	N	0,11	0,02	N	VN
LBA	R-318-029	0,05	0,06	N	0,08	0,02	N	VN
LBA	R-318-030	0,06	0,07	N	0,1	0,02	N	VN
LBA	R-318-031	0,08	0,09	N	0,08	0,01	N	VN
LBA	R-318-032	0,12	0,14	N	0,18	0,03	N	VN
LBA	R-318-034	0,06	0,07	N	0,08	0,01	N	VN
Suero	R-318-035	0,09	0,1	N	0,47	0,13	N	VN
Suero	R-318-036	0,34	0,38	N	2,32	0,7	P	FP
LBA	R-318-037	0,06	0,07	N	0,09	0,02	N	VN
LBA	R-318-038	0,04	0,04	N	0,1	0,02	N	VN
LBA	R-318-039	0,02	0,03	N	0,14	0,04	N	VN
LBA	R-318-040	0,04	0,05	N	0,09	0,02	N	VN
LBA	R-318-041	0,04	0,05	N	0,08	0,02	N	VN
LBA	R-318-042	0,05	0,05	N	0,1	0,02	N	VN
LBA	R-318-043	0,06	0,06	N	0,08	0,02	N	VN
LBA	R-318-044	0,04	0,04	N	0,07	0,02	N	VN
LBA	R-318-045	0,05	0,06	N	0,11	0,03	N	VN
LBA	R-318-046	0,04	0,05	N	0,1	0,02	N	VN
LBA	R-318-047	0,06	0,07	N	0,12	0,04	N	VN
LBA	R-318-048	0,03	0,04	N	0,08	0,02	N	VN
LBA	R-318-049	0,07	0,08	N	0,1	0,02	N	VN
LBA	R-318-050	0,1	0,11	N	0,1	0,03	N	VN
LBA	R-318-051	0,07	0,08	N	0,07	0,02	N	VN
LBA	R-318-052	0,04	0,04	N	0,07	0,01	N	VN

Tipo de muestra	Código muestra	Ensayo de referencia (ELISA)			Ensayo en evaluación (CLIA)			CORRELACIÓN
		Valor (DO)	Índice	Interpretación	Valor (RLU)	Índice	Interpretación	
LBA	R-318-053	0,06	0,1	N	0,21	0,07	N	VN
LBA	R-318-054	0,05	0,06	N	0,12	0,03	N	VN
LBA	R-318-055	0,02	0,03	N	0,08	0,02	N	VN
LBA	R-318-056	0,07	0,08	N	0,26	0,05	N	VN
LBA	R-318-057	0,05	0,05	N	0,06	0,02	N	VN
LBA	R-318-058	0,13	0,15	N	0,07	0,02	N	VN
LBA	R-318-059	0,05	0,06	N	0,08	0,02	N	VN
LBA	R-318-060	0,23	0,41	N	1,15	0,33	P	FP
LBA	R-318-062	0,01	0,02	N	0,09	0,03	N	VN
LBA	R-318-063	0,12	0,21	N	0,11	0,04	N	VN
LBA	R-318-066	0,18	0,31	N	0,54	0,15	N	VN
LBA	R-318-067	0,02	0,03	N	0,1	0,03	N	VN
LBA	R-318-068	0,02	0,03	N	0,1	0,03	N	VN
LBA	R-318-069	0,02	0,04	N	0,1	0,03	N	VN
LBA	R-318-071	0,05	0,09	N	0,15	0,06	N	VN
LBA	R-318-072	0,16	0,18	N	0,1	0,03	N	VN
LBA	R-318-074	0,03	0,06	N	0,13	0,04	N	VN
LBA	R-318-075	0,03	0,04	N	0,08	0,01	N	VN
LBA	R-318-077	0,07	0,08	N	0,12	0,03	N	VN
LBA	R-318-079	0,16	0,18	N	0,1	0,02	N	VN
LBA	R-318-080	0,02	0,04	N	0,1	0,04	N	VN
Suero	R-318-082	0,02	0,04	N	0,12	0,02	N	VN
Suero	R-318-083	0,03	0,05	N	0,08	0,02	N	VN
LBA	R-318-084	0,02	0,03	N	0,07	0,01	N	VN
LBA	R-318-085	1,66	2,92	P	42,16	3,45	P	VP
Suero	R-318-086	0,02	0,03	N	0,06	0,01	N	VN
Suero	R-319-008	0,23	0,4	N	0,8	0,24	P	FP
Suero	R-319-012	0,41	0,47	N	0,52	0,17	B	B
Suero	R-319-017	0,21	0,37	N	0,34	0,1	N	VN
Suero	R-319-020	0,48	0,55	P	0,29	0,11	N	FN
Suero	R-319-026	0,58	0,97	P	3,59	0,7	P	VP
Suero	R-319-029	0,78	1,31	P	1,86	0,33	P	VP
Suero	R-319-032	0,48	0,8	P	1,14	0,25	P	VP
Suero	R-319-034	0,57	0,94	P	1,3	0,25	P	VP
Suero	R-319-037	0,28	0,46	N	5,82	1,09	P	FP
Suero	R-319-040	0,02	0,04	N	0,05	0,01	N	VN
Suero	R-319-042	3,2	5,61	P	28,72	7,15	P	VP
Suero	R-319-046	0,49	0,81	P	0,67	0,18	B	B
Suero	R-319-049	4,45	7,8	P	18,48	5,74	P	VP
Suero	R-319-056	0,56	0,93	P	1,15	0,26	P	VP
Suero	R-319-058	0,31	0,54	P	0,8	0,26	P	VP
Suero	R-319-062	3	3,39	P	4,88	1,5	P	VP
Suero	R-319-073	0,36	0,59	P	1,22	0,3	P	VP

Tipo de muestra	Código muestra	Ensayo de referencia (ELISA)			Ensayo en evaluación (CLIA)			CORRELACIÓN
		Valor (DO)	Índice	Interpretación	Valor (RLU)	Índice	Interpretación	
Suero	R-319-075	3,31	5,51	P	42,15	8,74	P	VP
Suero	R-319-077	2,05	3,42	P	1,7	0,41	P	VP
Suero	R-319-079	1,04	1,74	P	2,77	0,67	P	VP
Suero	R-319-081	1,32	2,19	P	3,72	0,89	P	VP
Suero	R-319-083	0,8	1,39	P	1,14	0,37	P	VP
Suero	R-319-086	2,16	3,6	P	2,98	0,94	P	VP
Suero	R-319-089	0,4	0,69	P	0,65	0,22	P	VP
Suero	R-319-092	0,55	0,63	P	1,27	0,48	P	VP
Suero	R-319-095	0,42	0,74	P	0,68	0,17	B	B
Suero	R-319-098	0,93	1,07	P	2,44	0,71	P	VP
Suero	R-320-001	0,34	0,59	P	0,53	0,14	N	FN
Suero	R-320-004	0,52	0,91	P	0,27	0,09	N	FN
Suero	R-320-007	0,14	0,24	N	0,41	0,12	N	VN
Suero	R-320-011	0,29	0,49	N	0,7	0,23	P	FP
Suero	R-320-014	0,35	0,58	P	0,69	0,21	P	VP
Suero	R-320-021	1,12	1,97	P	1,08	0,4	P	VP
Suero	R-320-025	0,12	0,22	N	0,19	0,07	N	VN
Suero	R-320-029	0,22	0,39	N	0,52	0,14	N	VN
Suero	R-320-033	1,76	1,99	P	1,76	0,54	P	VP
Suero	R-320-039	0,98	1,11	P	0,99	0,28	P	VP
Suero	R-320-044	1,03	1,17	P	0,84	0,21	P	VP
Suero	R-320-048	0,3	0,53	P	0,81	0,22	P	VP
Suero	R-320-052	0,91	1,04	P	1,08	0,3	P	VP
Suero	R-320-055	0,38	0,44	N	0,59	0,18	B	B
Suero	R-320-062	0,67	0,77	P	0,36	0,11	N	FN
Suero	R-320-068	0,18	0,3	N	4,56	1,37	P	FP
Suero	R-320-071	0,66	0,76	P	1,17	0,4	P	VP
LBA	R-320-077	1,93	3,38	P	8,27	2,84	P	VP
LBA	R-320-079	2,36	4,15	P	16,96	5,3	P	VP
LBA	R-320-081	3,79	6,65	P	29,25	7,24	P	VP
LBA	R-320-083	0,87	1,52	P	2,68	0,65	P	VP
LBA	R-320-085	0,15	0,26	N	0,39	0,09	N	VN
LBA	R-320-087	0,59	1,03	P	0,66	0,18	B	B
LBA	R-320-089	0,23	0,4	N	0,88	0,21	P	FP
LBA	R-320-092	1,77	3,1	P	3,55	0,9	P	VP
Suero	R-320-096	3,25	5,42	P	11,83	3,39	P	VP
LBA	R-320-098	0,26	0,46	N	0,44	0,15	N	VN
Suero	R-321-002	3,71	6,5	P	13,48	4,54	P	VP
LBA	R-321-004	3,71	6,5	P	12,77	3,89	P	VP
Suero	R-321-005	0,16	0,28	N	0,4	0,11	N	VN
LBA	R-321-007	2,41	4,23	P	4,79	1,41	P	VP
LBA	R-321-009	4,42	7,76	P	33,53	11,41	P	VP
LBA	R-321-011	3,7	6,49	P	25,16	7,42	P	VP

Tipo de muestra	Código muestra	Ensayo de referencia (ELISA)			Ensayo en evaluación (CLIA)			CORRELACIÓN
		Valor (DO)	Índice	Interpretación	Valor (RLU)	Índice	Interpretación	
LBA	R-321-013	1,96	3,43	P	5,35	1,44	P	VP
LBA	R-321-015	3,85	6,76	P	22,43	7,48	P	VP
Suero	R-321-017	1,75	2,15	P	2,93	0,85	P	VP
LBA	R-321-034	3,04	5,33	P	4,18	1,88	P	VP
Suero	R-321-044	0,66	0,81	P	0,54	0,19	B	B
Suero	R-321-055	0,08	0,08	N	0,08	0,02	N	VN
LBA	R-321-066	3,56	4,38	P	27,61	7,57	P	VP
LBA	R-321-072	1,54	1,89	P	7,26	1,33	P	VP
LBA	R-321-080	4,43	5,45	P	35,47	9,84	P	VP
LBA	R-321-087	3,32	3,5	P	3,92	1,2	P	VP
Suero	R-322-001	0,69	0,85	P	0,72	0,16	N	FN
Suero	R-322-007	0,49	0,6	P	0,74	0,23	P	VP
Suero	R-322-012	0,94	0,98	P	0,93	0,23	P	VP
Suero	R-322-020	0,65	0,8	P	0,39	0,11	N	FN
Suero	R-322-026	0,44	0,77	P	0,75	0,23	P	VP
LBA	R-322-036	3,26	4	P	36,76	7,49	P	VP
Suero	R-322-041	0,75	0,92	P	0,62	0,16	B	B
LBA	R-322-046	3,5	4,3	P	28,43	4,75	P	VP
Suero	R-322-050	1,21	1,49	P	0,87	0,23	P	VP
LBA	R-322-054	1,31	1,62	P	3,42	0,74	P	VP
Suero	R-322-062	0,44	0,78	P	0,91	0,28	P	VP
LBA	R-322-074	1,86	1,94	P	2,25	0,53	P	VP
LBA	R-322-088	0,88	0,93	P	4,19	1,11	P	VP
Suero	R-322-092	0,72	0,75	P	0,73	0,22	P	VP
Suero	R-322-099	0,52	0,55	P	0,27	0,06	N	FN
LBA	R-323-003	4,4	4,62	P	24,75	7,88	P	VP
LBA	R-323-011	2,6	2,7	P	53,92	9,33	P	VP
LBA	R-323-023	0,46	0,49	N	0,75	0,19	B	B
Suero	R-397-067	0,23	0,26	N	0,46	0,11	N	VN
Suero	R-397-070	0,05	0,05	N	0,1	0,03	N	VN
Suero	R-397-073	0,1	0,11	N	0,06	0,01	N	VN
Suero	R-397-078	0,06	0,06	N	0,07	0,02	N	VN
Suero	R-397-084	0,52	0,64	P	0,96	0,23	P	VP
Suero	R-397-091	0,1	0,18	N	0,18	0,06	N	VN
Suero	R-397-097	0,39	0,44	N	0,55	0,13	N	VN
Suero	R-398-003	0,12	0,13	N	0,12	0,04	N	VN
Suero	R-398-006	1,56	1,92	P	0,83	0,21	P	VP
Suero	R-401-056	1,76	1,78	P	3,36	0,78	P	VP
Suero	R-401-071	0,4	0,7	P	1,99	0,54	P	VP
Suero	R-401-079	0,56	0,98	P	1,74	0,54	P	VP
LBA	R-406-040	3,44	4,01	P	39,04	11,48	P	VP
LBA	R-406-041	3,41	3,97	P	8,6	2,22	P	VP
LBA	R-406-042	1,78	2,08	P	4,45	1,27	P	VP

Tipo de muestra	Código muestra	Ensayo de referencia (ELISA)			Ensayo en evaluación (CLIA)			CORRELACIÓN
		Valor (DO)	Índice	Interpretación	Valor (RLU)	Índice	Interpretación	
Suero	R-406-043	0,13	0,15	N	0,11	0,03	N	VN
Suero	R-406-044	0,06	0,07	N	0,08	0,03	N	VN
Suero	R-406-045	0,1	0,12	N	0,08	0,03	N	VN
Suero	R-406-046	0,29	0,34	N	0,15	0,04	N	VN
Suero	R-406-047	0,15	0,17	N	0,12	0,03	N	VN
Suero	R-406-048	0,01	0,02	N	0,11	0,03	N	VN
Suero	R-406-049	0,03	0,05	N	0,46	0,17	B	B
Suero	R-406-050	0,77	0,89	P	0,53	0,21	P	VP
Suero	R-406-051	0,43	0,5	P	0,61	0,13	N	FN
Suero	R-406-052	0,13	0,23	N	0,41	0,13	N	VN
Suero	R-406-053	0,01	0,02	N	0,66	0,12	N	VN
Suero	R-406-054	0,07	0,12	N	1,09	0,23	P	FP
Suero	R-406-055	0,53	0,61	P	0,53	0,21	P	VP
Suero	R-406-056	0,24	0,43	N	0,62	0,11	N	VN
Suero	R-406-057	0,06	0,07	N	0,12	0,04	N	VN
Suero	R-406-058	0,02	0,04	N	0,08	0,02	N	VN
Suero	R-406-059	0,07	0,08	N	0,08	0,02	N	VN
Suero	R-406-060	0,91	1,06	P	1,51	0,33	P	VP
Suero	R-406-061	0,06	0,07	N	0,14	0,04	N	VN
Suero	R-406-062	2,92	3,4	P	13,42	2,8	P	VP
Suero	R-406-064	0,15	0,27	N	0,51	0,11	N	VN
Suero	R-406-065	0,94	1,1	P	1,24	0,44	P	VP
Suero	R-406-066	0,2	0,24	N	0,24	0,06	N	VN
Suero	R-406-067	3,27	3,81	P	5,97	1,48	P	VP
Suero	R-406-068	0,75	0,87	P	1,39	0,48	P	VP
Suero	R-406-069	3,29	3,83	P	22,14	5,59	P	VP
Suero	R-406-070	0,83	0,97	P	0,63	0,22	P	VP
Suero	R-406-071	0,04	0,06	N	0,89	0,19	B	B
Suero	R-406-072	0,06	0,1	N	0,37	0,08	N	VN
Suero	R-406-073	0,25	0,45	N	0,29	0,06	N	VN
Suero	R-406-074	0,19	0,22	N	0,14	0,05	N	VN
Suero	R-406-075	1,25	1,45	P	0,61	0,16	N	FN
Suero	R-406-076	0,04	0,05	N	0,09	0,03	N	VN
Suero	R-406-077	0,44	0,52	P	0,4	0,12	N	FN
Suero	R-406-078	2,78	3,23	P	5,63	1,55	P	VP
Suero	R-406-079	0,11	0,2	N	0,25	0,05	N	VN
Suero	R-406-080	0,08	0,15	N	0,47	0,09	N	VN
Suero	R-406-081	0,04	0,05	N	0,07	0,02	N	VN
Suero	R-406-082	0,01	0,01	N	0,05	0,01	N	VN
Suero	R-406-083	0,79	0,92	P	3,54	0,96	P	VP
Suero	R-406-084	0,17	0,31	N	0,42	0,13	N	VN
Suero	R-406-085	0,03	0,06	N	0,18	0,07	N	VN
Suero	R-406-086	3,06	3,56	P	5,11	1,5	P	VP

Tipo de muestra	Código muestra	Ensayo de referencia (ELISA)			Ensayo en evaluación (CLIA)			CORRELACIÓN
		Valor (DO)	Índice	Interpretación	Valor (RLU)	Índice	Interpretación	
Suero	R-406-087	0,09	0,15	N	0,27	0,08	N	VN
Suero	R-406-089	0,07	0,08	N	0,08	0,02	N	VN
LBA	R-407-040	3,17	3,34	P	11,55	3,86	P	VP
LBA	R-407-041	4,66	4,42	P	16,77	4,78	P	VP
LBA	R-407-042	4,65	4,42	P	14,43	5,21	P	VP
Suero	R-407-065	1,56	1,94	P	1,8	0,54	P	VP
Suero	R-407-067	0,51	0,85	P	0,93	0,26	P	VP
Suero	R-407-068	0,37	0,62	P	0,86	0,18	B	B
Suero	R-407-069	2,72	4,78	P	5,47	1,39	P	VP
Suero	R-407-070	3,26	5,43	P	31,69	6,99	P	VP
Suero	R-407-071	3,35	5,58	P	19,18	4,5	P	VP
Suero	R-407-073	0,34	0,57	P	1,64	0,35	P	VP
Suero	R-407-074	1,22	1,52	P	1,07	0,26	P	VP
Suero	R-407-075	0,64	0,79	P	0,51	0,19	B	B
Suero	R-407-076	0,45	0,56	P	0,25	0,08	N	FN
Suero	R-407-077	0,07	0,11	N	0,42	0,08	N	VN
Suero	R-407-078	0,24	0,4	N	1,21	0,31	P	FP
Suero	R-407-080	0,52	0,87	P	1,03	0,25	P	VP
Suero	R-407-081	0,66	1,1	P	4,35	1,21	P	VP
Suero	R-407-083	0,84	1,48	P	1,26	0,48	P	VP
LBA	R-407-084	3,6	4,49	P	8,17	1,96	P	VP
Suero	R-407-085	3,9	4,49	P	58,8	13,35	P	VP
Suero	R-407-086	3,6	4,4	P	41,12	7,63	P	VP
Suero	R-407-088	4,44	5,52	P	23,63	6,16	P	VP
Suero	R-407-089	0,06	0,1	N	0,15	0,04	N	VN
Suero	R-407-091	0,73	1,21	P	2,82	0,87	P	VP
Suero	R-408-001	1,52	1,49	P	1,62	0,4	P	VP
LBA	R-408-002	0,13	0,22	N	0,25	0,08	N	VN
Suero	R-408-004	1,05	1,03	P	0,91	0,22	P	VP
Suero	R-408-006	0,79	0,77	P	0,24	0,07	N	FN
Suero	R-408-007	1,08	1,06	P	0,85	0,25	P	VP
Suero	R-408-009	0,3	0,52	P	0,52	0,21	P	VP
Suero	R-408-010	0,14	0,24	N	0,38	0,14	N	VN
LBA	R-408-011	0,74	1,29	P	4,77	1,64	P	VP
LBA	R-408-012	0,31	0,55	P	10,7	2,94	P	VP
LBA	R-408-013	2,03	3,56	P	10,02	2,44	P	VP
LBA	R-408-014	0,96	0,95	P	0,7	0,24	P	VP
LBA	R-408-015	3,25	3,19	P	5,11	1,43	P	VP
LBA	R-408-016	4,44	4,35	P	19,96	6,24	P	VP
LBA	R-408-017	1,85	1,82	P	0,68	0,2	P	VP
LBA	R-408-018	0,39	0,69	P	1,56	0,59	P	VP
LBA	R-408-019	3,66	3,59	P	39,97	9,97	P	VP
Suero	R-408-020	0,4	0,7	P	0,86	0,32	P	VP

Tipo de muestra	Código muestra	Ensayo de referencia (ELISA)			Ensayo en evaluación (CLIA)			CORRELACIÓN
		Valor (DO)	Índice	Interpretación	Valor (RLU)	Índice	Interpretación	
Suero	R-408-021	3,48	3,41	P	3,89	0,99	P	VP
Suero	R-408-022	1,7	1,67	P	2,11	0,7	P	VP
LBA	R-408-023	1,4	1,38	P	1,21	0,33	P	VP
Suero	R-408-025	4,44	4,35	P	3,62	0,97	P	VP
LBA	R-408-027	3,35	3,13	P	18,51	6,12	P	VP
LBA	R-408-028	0,86	0,81	P	5,33	1,56	P	VP
LBA	R-408-029	1,39	1,3	P	3,37	0,87	P	VP
LBA	R-408-030	3,55	3,31	P	32,67	4,22	P	VP
LBA	R-408-031	3,92	3,66	P	10,54	3,43	P	VP
LBA	R-408-032	4,45	4,16	P	29,58	7,57	P	VP
LBA	R-409-038	0,02	0,04	N	0,2	0,04	N	VN
LBA	R-409-039	0,04	0,06	N	0,14	0,02	N	VN
LBA	R-409-040	0,04	0,07	N	0,16	0,03	N	VN
LBA	R-409-041	0,23	0,39	N	0,45	0,08	N	VN
LBA	R-409-042	0,57	0,56	P	9,03	1,64	P	VP
LBA	R-409-043	0,1	0,17	N	0,6	0,12	N	VN
LBA	R-409-044	2,62	2,59	P	17,31	3,11	P	VP
LBA	R-409-045	0,14	0,25	N	0,83	0,16	B	B
LBA	R-409-046	0,05	0,09	N	0,16	0,04	N	VN
LBA	R-409-047	0,03	0,05	N	0,1	0,03	N	VN
LBA	R-409-048	0,04	0,07	N	0,25	0,07	N	VN
LBA	R-409-049	0,03	0,05	N	0,11	0,03	N	VN
LBA	R-409-050	0,1	0,17	N	0,3	0,09	N	VN
LBA	R-409-051	0,11	0,19	N	0,33	0,14	N	VN
LBA	R-409-052	0,01	0,02	N	0,11	0,04	N	VN
LBA	R-409-053	0,03	0,05	N	0,16	0,07	N	VN
LBA	R-409-054	0,03	0,06	N	0,05	0,02	N	VN
LBA	R-409-055	0,05	0,09	N	0,19	0,08	N	VN
LBA	R-409-056	0,05	0,08	N	0,19	0,07	N	VN
LBA	R-409-057	0,04	0,08	N	0,36	0,14	N	VN
LBA	R-409-058	0,08	0,13	N	0,18	0,07	N	VN
LBA	R-409-059	1,11	1,1	P	1,6	0,76	P	VP
LBA	R-409-060	0,11	0,2	N	0,12	0,05	N	VN
LBA	R-409-061	0,05	0,09	N	0,1	0,04	N	VN
LBA	R-409-063	0,12	0,2	N	0,4	0,08	N	VN
LBA	R-409-064	0,04	0,06	N	0,11	0,02	N	VN
LBA	R-409-066	0,74	0,74	P	2,05	0,41	P	VP
LBA	R-409-067	0,03	0,06	N	0,17	0,03	N	VN
LBA	R-409-068	0,06	0,1	N	0,27	0,06	N	VN
LBA	R-409-069	0,02	0,04	N	0,18	0,06	N	VN
LBA	R-409-070	0,03	0,06	N	0,17	0,04	N	VN
LBA	R-409-071	0,07	0,12	N	0,39	0,08	N	VN
LBA	R-409-072	1,35	1,34	P	2,86	0,88	P	VP

Tipo de muestra	Código muestra	Ensayo de referencia (ELISA)			Ensayo en evaluación (CLIA)			CORRELACIÓN
		Valor (DO)	Índice	Interpretación	Valor (RLU)	Índice	Interpretación	
LBA	R-409-073	0,05	0,09	N	0,14	0,05	N	VN
LBA	R-409-074	2,1	2,08	P	2,64	0,72	P	VP
LBA	R-409-075	1,08	1,07	P	1,42	0,42	P	VP
LBA	R-409-076	0,02	0,03	N	0,05	0,02	N	VN
LBA	R-409-077	0,9	0,89	P	0,61	0,17	B	B
LBA	R-409-078	0,02	0,04	N	0,07	0,03	N	VN
LBA	R-409-079	0,35	0,35	N	10,02	2,73	P	FP
Suero	R-412-042	2,47	3,42	P	3,53	0,88	P	VP
Suero	R-412-043	1,34	1,86	P	2,85	0,78	P	VP
Suero	R-412-045	1,88	2,61	P	2,87	0,87	P	VP
Suero	R-412-046	0,35	0,49	N	4,79	1,29	P	FP
Suero	R-412-047	0,27	0,37	N	4,2	0,92	P	FP
Suero	R-412-048	3,32	4,61	P	6,52	1,56	P	VP
Suero	R-412-049	0,36	0,49	N	0,31	0,09	N	VN
Suero	R-412-050	3,34	4,64	P	30,13	8,81	P	VP
Suero	R-412-051	0,62	0,86	P	4,79	1,41	P	VP
Suero	R-412-052	3,43	4,76	P	14,45	4,15	P	VP
Suero	R-412-053	4,44	6,16	P	6,69	1,67	P	VP
Suero	R-412-054	0,19	0,27	N	2,97	0,75	P	FP
Suero	R-412-055	0,68	0,95	P	0,79	0,27	P	VP
Suero	R-412-056	2,32	3,23	P	16,68	6,52	P	VP
Suero	R-412-057	2,38	3,3	P	7,54	2,73	P	VP
Suero	R-412-058	0,08	0,1	N	0,12	0,04	N	VN
Suero	R-412-059	2,3	3,19	P	16,88	5,62	P	VP
Suero	R-412-060	3,8	5,28	P	4,61	1,69	P	VP
Plasma	A-126-001	0,03	0,03	N	0,1	0,03	N	TN
Plasma	A-126-002	0,05	0,07	N	0,13	0,03	N	TN
Plasma	A-126-003	0,05	0,06	N	0,14	0,04	N	TN
Plasma	A-126-004	0,05	0,06	N	0,15	0,04	N	TN
Plasma	A-126-005	0,06	0,07	N	0,06	0,02	N	TN
Plasma	A-126-006	0,02	0,03	N	0,07	0,02	N	TN
Plasma	A-126-007	0,05	0,06	N	0,07	0,02	N	TN
Plasma	A-126-008	0,04	0,04	N	0,08	0,02	N	TN
Plasma	A-126-009	0,03	0,04	N	0,08	0,02	N	TN
Plasma	A-126-010	0,02	0,02	N	0,06	0,02	N	TN
Plasma	A-126-014	0,03	0,04	N	0,12	0,04	N	TN
Plasma	A-126-018	0,01	0,02	N	0,06	0,02	N	TN
Plasma	A-126-019	0,02	0,02	N	0,06	0,02	N	TN
Plasma	A-126-020	0,05	0,07	N	0,05	0,02	N	TN
Plasma	A-126-021	0,05	0,06	N	0,08	0,04	N	TN
Plasma	A-126-022	0,03	0,04	N	0,06	0,03	N	TN
Plasma	A-126-023	0,04	0,05	N	0,07	0,03	N	TN
Plasma	A-126-024	0,04	0,05	N	0,06	0,03	N	TN

Tipo de muestra	Código muestra	Ensayo de referencia (ELISA)			Ensayo en evaluación (CLIA)			CORRELACIÓN
		Valor (DO)	Índice	Interpretación	Valor (RLU)	Índice	Interpretación	
Plasma	A-126-025	0,06	0,08	N	0,10	0,04	N	TN
Plasma	A-126-026	0,02	0,02	N	0,06	0,03	N	TN
Plasma	A-126-027	0,03	0,04	N	0,09	0,04	N	TN
Plasma	A-126-028	0,04	0,05	N	0,04	0,02	N	TN
Plasma	A-126-029	0,04	0,05	N	0,06	0,03	N	TN

ANEXO III. ANÁLISIS ROC ESTUDIO INTERNO GLOBAL.

VARIABLE = INDICE_VIRCLIA

POSITIVE GROUP = REF="P"

Sample size = 217

NEGATIVE GROUP = REF="N"

Sample size = 301

Disease prevalence (%) = 41,9

Area under the ROC curve = 0,944

Standard error = 0,011

95% Confidence interval = 0,920 to 0,962

Criterion	Sens. (95% C.I.)	Spec. (95% C.I.)	+LR	-LR	+PV	-PV
>=0,01	100,0 (100,0-100,0)	0,0 (0,0- 0,0)	1,00		41,9	
> 0,01	100,0 (100,0-100,0)	6,6 (4,1- 10,1)	1,07	0,00	43,6	100,0
> 0,016	100,0 (100,0-100,0)	7,0 (4,4- 10,5)	1,07	0,00	43,7	100,0
> 0,019	100,0 (100,0-100,0)	7,6 (4,9- 11,2)	1,08	0,00	43,8	100,0
> 0,02	99,1 (96,7- 99,9)	37,5 (32,1- 43,3)	1,59	0,02	53,3	98,3
> 0,022	99,1 (96,7- 99,9)	38,5 (33,0- 44,3)	1,61	0,02	53,8	98,3
> 0,023	99,1 (96,7- 99,9)	39,2 (33,7- 45,0)	1,63	0,02	54,0	98,3
> 0,024	99,1 (96,7- 99,9)	39,9 (34,3- 45,6)	1,65	0,02	54,3	98,4
> 0,025	99,1 (96,7- 99,9)	40,5 (34,9- 46,3)	1,67	0,02	54,6	98,4
> 0,026	99,1 (96,7- 99,9)	40,9 (35,3- 46,7)	1,68	0,02	54,7	98,4
> 0,03	99,1 (96,7- 99,9)	54,8 (49,0- 60,5)	2,19	0,02	61,3	98,8
> 0,031	99,1 (96,7- 99,9)	55,1 (49,3- 60,9)	2,21	0,02	61,4	98,8
> 0,033	99,1 (96,7- 99,9)	56,1 (50,3- 61,8)	2,26	0,02	62,0	98,8

> 0,035	99,1 (96,7- 99,9)	56,8 (51,0- 62,5)	2,29	0,02	62,3	98,8
> 0,036	99,1 (96,7- 99,9)	57,1 (51,3- 62,8)	2,31	0,02	62,5	98,9
> 0,039	99,1 (96,7- 99,9)	57,5 (51,7- 63,1)	2,33	0,02	62,7	98,9
> 0,04	99,1 (96,7- 99,9)	65,4 (59,8- 70,8)	2,87	0,01	67,4	99,0
> 0,041	99,1 (96,7- 99,9)	65,8 (60,1- 71,1)	2,90	0,01	67,6	99,0
> 0,042	99,1 (96,7- 99,9)	66,1 (60,5- 71,4)	2,92	0,01	67,8	99,0
> 0,05	99,1 (96,7- 99,9)	68,8 (63,2- 74,0)	3,17	0,01	69,6	99,0
> 0,06	98,6 (96,0- 99,7)	72,4 (67,0- 77,4)	3,58	0,02	72,1	98,6
> 0,07	97,7 (94,7- 99,2)	74,8 (69,4- 79,6)	3,87	0,03	73,6	97,8
> 0,08	96,3 (92,9- 98,4)	78,4 (73,3- 82,9)	4,46	0,05	76,3	96,7
> 0,09	95,4 (91,7- 97,8)	79,7 (74,7- 84,1)	4,71	0,06	77,2	96,0
> 0,1	94,9 (91,1- 97,4)	80,1 (75,1- 84,4)	4,76	0,06	77,4	95,6
> 0,11	93,5 (89,4- 96,4)	83,1 (78,3- 87,1)	5,52	0,08	79,9	94,7
> 0,12	92,6 (88,3- 95,7)	84,4 (79,8- 88,3)	5,93	0,09	81,0	94,1
> 0,13	91,7 (87,2- 95,0)	85,7 (81,2- 89,5)	6,42	0,10	82,2	93,5
> 0,14	91,2 (86,7- 94,6)	87,4 (83,1- 90,9)	7,23	0,10	83,9	93,3
> 0,15 *	90,8 (86,1- 94,3)	88,0 (83,8- 91,5)	7,59	0,10	84,5	93,0
> 0,16	88,9 (84,0- 92,8)	89,4 (85,3- 92,6)	8,37	0,12	85,8	91,8
> 0,17	87,6 (82,4- 91,6)	90,4 (86,5- 93,5)	9,09	0,14	86,8	91,0
> 0,18	85,3 (79,8- 89,7)	90,7 (86,8- 93,7)	9,16	0,16	86,9	89,5
> 0,19	83,4 (77,8- 88,1)	92,0 (88,4- 94,8)	10,46	0,18	88,3	88,5
> 0,2	82,5 (76,8- 87,3)	92,0 (88,4- 94,8)	10,35	0,19	88,2	87,9
> 0,21	79,7 (73,8- 84,9)	92,4 (88,8- 95,1)	10,43	0,22	88,3	86,3
> 0,22	77,4 (71,3- 82,8)	92,4 (88,8- 95,1)	10,13	0,24	88,0	85,0
> 0,23	74,2 (67,8- 79,9)	93,0 (89,5- 95,6)	10,63	0,28	88,5	83,3
> 0,24	73,7 (67,3- 79,5)	93,7 (90,3- 96,2)	11,68	0,28	89,4	83,2
> 0,25	71,9 (65,4- 77,8)	93,7 (90,3- 96,2)	11,39	0,30	89,1	82,2
> 0,26	69,1 (62,5- 75,2)	93,7 (90,3- 96,2)	10,95	0,33	88,8	80,8

> 0,27	68,7 (62,0- 74,8)	94,0 (90,7- 96,4)	11,48	0,33	89,2	80,6
> 0,28	66,8 (60,1- 73,0)	94,0 (90,7- 96,4)	11,17	0,35	89,0	79,7
> 0,29	66,4 (59,7- 72,6)	94,0 (90,7- 96,4)	11,10	0,36	88,9	79,5
> 0,3	65,4 (58,7- 71,7)	94,4 (91,1- 96,7)	11,59	0,37	89,3	79,1
> 0,31	65,0 (58,2- 71,3)	95,0 (91,9- 97,2)	13,04	0,37	90,4	79,0
> 0,32	64,5 (57,8- 70,9)	95,0 (91,9- 97,2)	12,95	0,37	90,3	78,8
> 0,33	63,1 (56,3- 69,6)	95,3 (92,3- 97,4)	13,57	0,39	90,7	78,2
> 0,35	62,2 (55,4- 68,7)	95,3 (92,3- 97,4)	13,38	0,40	90,6	77,8
> 0,36	62,2 (55,4- 68,7)	95,7 (92,7- 97,7)	14,40	0,39	91,2	77,8
> 0,37	61,3 (54,5- 67,8)	95,7 (92,7- 97,7)	14,19	0,40	91,1	77,4
> 0,38	60,8 (54,0- 67,4)	95,7 (92,7- 97,7)	14,08	0,41	91,0	77,2
> 0,4	59,4 (52,6- 66,0)	95,7 (92,7- 97,7)	13,76	0,42	90,8	76,6
> 0,41	58,5 (51,7- 65,2)	95,7 (92,7- 97,7)	13,55	0,43	90,7	76,2
> 0,42	57,6 (50,7- 64,3)	95,7 (92,7- 97,7)	13,34	0,44	90,6	75,8
> 0,44	57,1 (50,3- 63,8)	95,7 (92,7- 97,7)	13,23	0,45	90,5	75,6
> 0,48	55,8 (48,9- 62,5)	95,7 (92,7- 97,7)	12,91	0,46	90,3	75,0
> 0,51	55,3 (48,4- 62,0)	95,7 (92,7- 97,7)	12,80	0,47	90,2	74,8
> 0,53	54,8 (48,0- 61,6)	95,7 (92,7- 97,7)	12,70	0,47	90,2	74,6
> 0,54	53,0 (46,1- 59,8)	95,7 (92,7- 97,7)	12,27	0,49	89,8	73,8
> 0,55	52,5 (45,7- 59,3)	95,7 (92,7- 97,7)	12,16	0,50	89,8	73,7
> 0,59	52,1 (45,2- 58,9)	95,7 (92,7- 97,7)	12,06	0,50	89,7	73,5
> 0,65	51,6 (44,8- 58,4)	95,7 (92,7- 97,7)	11,95	0,51	89,6	73,3
> 0,67	51,2 (44,3- 58,0)	95,7 (92,7- 97,7)	11,84	0,51	89,5	73,1
> 0,7	50,2 (43,4- 57,1)	96,0 (93,1- 97,9)	12,60	0,52	90,1	72,8
> 0,71	49,8 (42,9- 56,6)	96,0 (93,1- 97,9)	12,48	0,52	90,0	72,6
> 0,72	49,3 (42,5- 56,2)	96,0 (93,1- 97,9)	12,37	0,53	89,9	72,4
> 0,74	48,8 (42,0- 55,7)	96,0 (93,1- 97,9)	12,25	0,53	89,8	72,2
> 0,75	48,8 (42,0- 55,7)	96,3 (93,6- 98,2)	13,37	0,53	90,6	72,3

> 0,76	47,5 (40,7- 54,3)	96,3 (93,6- 98,2)	12,99	0,55	90,4	71,8
> 0,78	46,1 (39,3- 53,0)	96,3 (93,6- 98,2)	12,61	0,56	90,1	71,3
> 0,85	45,2 (38,4- 52,0)	96,3 (93,6- 98,2)	12,36	0,57	89,9	70,9
> 0,87	43,8 (37,1- 50,7)	96,7 (94,0- 98,4)	13,18	0,58	90,5	70,5
> 0,88	42,9 (36,2- 49,7)	96,7 (94,0- 98,4)	12,90	0,59	90,3	70,1
> 0,89	42,4 (35,7- 49,3)	97,0 (94,4- 98,6)	14,18	0,59	91,1	70,0
> 0,9	41,9 (35,3- 48,8)	97,0 (94,4- 98,6)	14,03	0,60	91,0	69,9
> 0,92	41,9 (35,3- 48,8)	97,3 (94,8- 98,8)	15,78	0,60	91,9	69,9
> 0,94	41,5 (34,8- 48,3)	97,3 (94,8- 98,8)	15,60	0,60	91,8	69,8
> 0,96	40,6 (34,0- 47,4)	97,3 (94,8- 98,8)	15,26	0,61	91,7	69,4
> 0,97	40,1 (33,5- 46,9)	97,3 (94,8- 98,8)	15,08	0,62	91,6	69,3
> 0,99	39,6 (33,1- 46,5)	97,3 (94,8- 98,8)	14,91	0,62	91,5	69,1
> 1,02	39,2 (32,6- 46,0)	97,3 (94,8- 98,8)	14,74	0,62	91,4	68,9
> 1,03	38,7 (32,2- 45,5)	97,3 (94,8- 98,8)	14,56	0,63	91,3	68,8
> 1,09	38,7 (32,2- 45,5)	97,7 (95,3- 99,1)	16,65	0,63	92,3	68,9
> 1,11	38,2 (31,8- 45,1)	97,7 (95,3- 99,1)	16,45	0,63	92,2	68,7
> 1,19	37,8 (31,3- 44,6)	97,7 (95,3- 99,1)	16,25	0,64	92,1	68,5
> 1,2	37,3 (30,9- 44,1)	97,7 (95,3- 99,1)	16,05	0,64	92,0	68,4
> 1,21	36,9 (30,4- 43,7)	97,7 (95,3- 99,1)	15,85	0,65	92,0	68,2
> 1,24	36,4 (30,0- 43,2)	97,7 (95,3- 99,1)	15,65	0,65	91,9	68,1
> 1,26	35,9 (29,6- 42,7)	97,7 (95,3- 99,1)	15,46	0,66	91,8	67,9
> 1,27	35,5 (29,1- 42,2)	97,7 (95,3- 99,1)	15,26	0,66	91,7	67,7
> 1,29	35,5 (29,1- 42,2)	98,0 (95,7- 99,3)	17,80	0,66	92,8	67,8
> 1,33	35,0 (28,7- 41,8)	98,0 (95,7- 99,3)	17,57	0,66	92,7	67,7
> 1,36	34,6 (28,3- 41,3)	98,0 (95,7- 99,3)	17,34	0,67	92,6	67,5
> 1,37	34,1 (27,8- 40,8)	98,7 (96,6- 99,6)	25,66	0,67	94,9	67,5
> 1,39	33,6 (27,4- 40,3)	98,7 (96,6- 99,6)	25,31	0,67	94,8	67,3
> 1,41	32,3 (26,1- 38,9)	98,7 (96,6- 99,6)	24,27	0,69	94,6	66,9

> 1,43	31,8 (25,7- 38,4)	98,7 (96,6- 99,6)	23,93	0,69	94,5	66,7
> 1,44	31,3 (25,2- 38,0)	98,7 (96,6- 99,6)	23,58	0,70	94,4	66,6
> 1,48	30,9 (24,8- 37,5)	98,7 (96,6- 99,6)	23,23	0,70	94,4	66,4
> 1,5	30,0 (23,9- 36,5)	98,7 (96,6- 99,6)	22,54	0,71	94,2	66,1
> 1,55	29,5 (23,5- 36,0)	98,7 (96,6- 99,6)	22,19	0,71	94,1	66,0
> 1,56	28,6 (22,7- 35,1)	98,7 (96,6- 99,6)	21,50	0,72	93,9	65,7
> 1,59	28,6 (22,7- 35,1)	99,0 (97,1- 99,8)	28,67	0,72	95,4	65,8
> 1,64	27,6 (21,8- 34,1)	99,0 (97,1- 99,8)	27,74	0,73	95,2	65,5
> 1,66	27,2 (21,4- 33,6)	99,0 (97,1- 99,8)	27,28	0,74	95,2	65,4
> 1,67	26,7 (21,0- 33,1)	99,0 (97,1- 99,8)	26,82	0,74	95,1	65,2
> 1,69	26,3 (20,5- 32,7)	99,0 (97,1- 99,8)	26,35	0,74	95,0	65,1
> 1,71	25,8 (20,1- 32,2)	99,0 (97,1- 99,8)	25,89	0,75	94,9	64,9
> 1,72	25,8 (20,1- 32,2)	99,3 (97,6- 99,9)	38,84	0,75	96,6	65,0
> 1,88	25,3 (19,7- 31,7)	99,3 (97,6- 99,9)	38,15	0,75	96,5	64,9
> 1,96	24,4 (18,9- 30,7)	99,3 (97,6- 99,9)	36,76	0,76	96,4	64,6
> 2,22	24,0 (18,4- 30,2)	99,3 (97,6- 99,9)	36,06	0,77	96,3	64,4
> 2,31	23,5 (18,0- 29,7)	99,3 (97,6- 99,9)	35,37	0,77	96,2	64,3
> 2,44	23,0 (17,6- 29,2)	99,3 (97,6- 99,9)	34,68	0,77	96,2	64,2
> 2,73	22,6 (17,2- 28,7)	99,7 (98,2- 99,9)	67,97	0,78	98,0	64,1
> 2,8	22,1 (16,8- 28,2)	99,7 (98,2- 99,9)	66,58	0,78	98,0	64,0
> 2,84	21,7 (16,4- 27,7)	99,7 (98,2- 99,9)	65,19	0,79	97,9	63,8
> 2,94	21,2 (16,0- 27,2)	99,7 (98,2- 99,9)	63,81	0,79	97,9	63,7
> 3,11	20,7 (15,5- 26,7)	99,7 (98,2- 99,9)	62,42	0,80	97,8	63,6
> 3,22	20,3 (15,1- 26,2)	99,7 (98,2- 99,9)	61,03	0,80	97,8	63,4
> 3,39	19,8 (14,7- 25,7)	99,7 (98,2- 99,9)	59,65	0,80	97,7	63,3
> 3,43	19,4 (14,3- 25,2)	99,7 (98,2- 99,9)	58,26	0,81	97,7	63,2
> 3,45	18,9 (13,9- 24,7)	99,7 (98,2- 99,9)	56,87	0,81	97,6	63,0
> 3,86	18,4 (13,5- 24,2)	99,7 (98,2- 99,9)	55,48	0,82	97,6	62,9

> 3,89	18,0 (13,1- 23,7)	99,7 (98,2- 99,9)	54,10	0,82	97,5	62,8
> 4,15	17,5 (12,7- 23,2)	99,7 (98,2- 99,9)	52,71	0,83	97,4	62,6
> 4,22	17,1 (12,3- 22,7)	99,7 (98,2- 99,9)	51,32	0,83	97,4	62,5
> 4,5	16,6 (11,9- 22,2)	99,7 (98,2- 99,9)	49,94	0,84	97,3	62,4
> 4,52	16,1 (11,5- 21,7)	99,7 (98,2- 99,9)	48,55	0,84	97,2	62,2
> 4,54	15,7 (11,1- 21,2)	99,7 (98,2- 99,9)	47,16	0,85	97,1	62,1
> 4,75	15,2 (10,7- 20,7)	99,7 (98,2- 99,9)	45,77	0,85	97,1	62,0
> 4,78	14,7 (10,3- 20,2)	99,7 (98,2- 99,9)	44,39	0,86	97,0	61,9
> 5,21	14,3 (9,9- 19,7)	99,7 (98,2- 99,9)	43,00	0,86	96,9	61,7
> 5,25	13,8 (9,5- 19,1)	99,7 (98,2- 99,9)	41,61	0,86	96,8	61,6
> 5,3	13,4 (9,1- 18,6)	99,7 (98,2- 99,9)	40,23	0,87	96,7	61,5
> 5,59	12,9 (8,7- 18,1)	99,7 (98,2- 99,9)	38,84	0,87	96,6	61,3
> 5,62	12,4 (8,4- 17,6)	99,7 (98,2- 99,9)	37,45	0,88	96,4	61,2
> 5,74	12,0 (8,0- 17,1)	99,7 (98,2- 99,9)	36,06	0,88	96,3	61,1
> 5,78	12,0 (8,0- 17,1)	100,0 (100,0-100,0)		0,88	100,0	61,2
> 5,83	11,5 (7,6- 16,5)	100,0 (100,0-100,0)		0,88	100,0	61,1
> 6,12	11,1 (7,2- 16,0)	100,0 (100,0-100,0)		0,89	100,0	60,9
> 6,16	10,6 (6,8- 15,5)	100,0 (100,0-100,0)		0,89	100,0	60,8
> 6,24	10,1 (6,5- 14,9)	100,0 (100,0-100,0)		0,90	100,0	60,7
> 6,52	9,7 (6,1- 14,4)	100,0 (100,0-100,0)		0,90	100,0	60,6
> 6,64	9,2 (5,7- 13,9)	100,0 (100,0-100,0)		0,91	100,0	60,4
> 6,99	8,8 (5,4- 13,3)	100,0 (100,0-100,0)		0,91	100,0	60,3
> 7,11	8,3 (5,0- 12,8)	100,0 (100,0-100,0)		0,92	100,0	60,2
> 7,15	7,8 (4,6- 12,2)	100,0 (100,0-100,0)		0,92	100,0	60,1
> 7,24	7,4 (4,3- 11,7)	100,0 (100,0-100,0)		0,93	100,0	60,0
> 7,42	6,9 (3,9- 11,1)	100,0 (100,0-100,0)		0,93	100,0	59,8
> 7,48	6,5 (3,6- 10,6)	100,0 (100,0-100,0)		0,94	100,0	59,7
> 7,49	6,0 (3,2- 10,0)	100,0 (100,0-100,0)		0,94	100,0	59,6

> 7,57	5,1 (2,6- 8,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,95	100,0	59,4
> 7,63	4,6 (2,2- 8,3)	100,0 (100,0-100,0)	0,95	100,0	59,3
> 7,88	4,1 (1,9- 7,7)	100,0 (100,0-100,0)	0,96	100,0	59,1
> 8,74	3,7 (1,6- 7,1)	100,0 (100,0-100,0)	0,96	100,0	59,0
> 8,81	3,2 (1,3- 6,5)	100,0 (100,0-100,0)	0,97	100,0	58,9
> 9,33	2,8 (1,0- 5,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,97	100,0	58,8
> 9,84	2,3 (0,8- 5,3)	100,0 (100,0-100,0)	0,98	100,0	58,7
> 9,97	1,8 (0,5- 4,7)	100,0 (100,0-100,0)	0,98	100,0	58,6
> 10,58	1,4 (0,3- 4,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,99	100,0	58,4
> 11,41	0,9 (0,1- 3,3)	100,0 (100,0-100,0)	0,99	100,0	58,3
> 11,48	0,5 (0,1- 2,6)	100,0 (100,0-100,0)	1,00	100,0	58,2
> 13,35	0,0 (0,0- 0,0)	100,0 (100,0-100,0)	1,00		58,1

Sens. = Sensitivity

Spec. = Specificity

+LR = Positive likelihood ratio

-LR = Negative likelihood ratio

+PV = Positive predictive value

-PV = Negative predictive value

ANEXO IV. RESULTADOS BAL ESTUDIO INTERNO.

VARIABLE = INDEX_VIRCLIA

POSITIVE GROUP = REF="P"

Sample size = 70

NEGATIVE GROUP = REF="N"

Sample size = 136

Disease prevalence (%) = 34,0

Area under the ROC curve = 0,974

Standard error = 0,014

95% Confidence interval = 0,941 to 0,991

Criterion	Sens. (95% C.I.)	Spec. (95% C.I.)	+LR	-LR	+PV	-PV
>=0,01	100,0 (100,0-100,0)	0,0 (0,0- 0,0)	1,00		34,0	
> 0,01	100,0 (100,0-100,0)	4,4 (1,6- 9,4)	1,05	0,00	35,0	100,0
> 0,02	100,0 (100,0-100,0)	36,8 (28,7- 45,5)	1,58	0,00	44,9	100,0
> 0,03	100,0 (100,0-100,0)	58,1 (49,3- 66,5)	2,39	0,00	55,1	100,0
> 0,04	100,0 (100,0-100,0)	68,4 (59,9- 76,1)	3,16	0,00	61,9	100,0
> 0,05	100,0 (100,0-100,0)	72,1 (63,7- 79,4)	3,58	0,00	64,8	100,0
> 0,06	100,0 (100,0-100,0)	75,7 (67,6- 82,7)	4,12	0,00	68,0	100,0
> 0,07	100,0 (100,0-100,0)	79,4 (71,6- 85,9)	4,86	0,00	71,4	100,0
> 0,08	100,0 (100,0-100,0)	84,6 (77,4- 90,2)	6,48	0,00	76,9	100,0
> 0,09	100,0 (100,0-100,0)	86,0 (79,0- 91,4)	7,16	0,00	78,7	100,0
> 0,11	100,0 (100,0-100,0)	87,5 (80,7- 92,5)	8,00	0,00	80,5	100,0
> 0,12	100,0 (100,0-100,0)	88,2 (81,6- 93,1)	8,50	0,00	81,4	100,0
> 0,14	100,0 (100,0-100,0)	89,7 (83,3- 94,3)	9,71	0,00	83,3	100,0
> 0,15	98,6 (92,3- 99,8)	91,2 (85,1- 95,4)	11,17	0,02	85,2	99,2
> 0,16 *	98,6 (92,3- 99,8)	91,9 (86,0- 95,9)	12,19	0,02	86,3	99,2
> 0,17	97,1 (90,0- 99,6)	91,9 (86,0- 95,9)	12,01	0,03	86,1	98,4
> 0,18	94,3 (86,0- 98,4)	91,9 (86,0- 95,9)	11,66	0,06	85,7	96,9
> 0,19	91,4 (82,3- 96,8)	93,4 (87,8- 96,9)	13,82	0,09	87,7	95,5
> 0,2	90,0 (80,5- 95,9)	93,4 (87,8- 96,9)	13,60	0,11	87,5	94,8
> 0,21	90,0 (80,5- 95,9)	94,1 (88,7- 97,4)	15,30	0,11	88,7	94,8
> 0,24	88,6 (78,7- 94,9)	94,1 (88,7- 97,4)	15,06	0,12	88,6	94,1
> 0,31	88,6 (78,7- 94,9)	94,9 (89,7- 97,9)	17,21	0,12	89,9	94,2
> 0,33	87,1 (77,0- 93,9)	95,6 (90,6- 98,4)	19,75	0,13	91,0	93,5
> 0,41	85,7 (75,3- 92,9)	95,6 (90,6- 98,4)	19,43	0,15	90,9	92,9
> 0,42	82,9 (72,0- 90,8)	95,6 (90,6- 98,4)	18,78	0,18	90,6	91,5

> 0,51	81,4 (70,3- 89,7)	95,6 (90,6- 98,4)	18,46	0,19	90,5	90,9
> 0,53	80,0 (68,7- 88,6)	95,6 (90,6- 98,4)	18,13	0,21	90,3	90,3
> 0,59	78,6 (67,1- 87,5)	95,6 (90,6- 98,4)	17,81	0,22	90,2	89,7
> 0,65	77,1 (65,6- 86,3)	95,6 (90,6- 98,4)	17,49	0,24	90,0	89,0
> 0,72	75,7 (64,0- 85,2)	95,6 (90,6- 98,4)	17,16	0,25	89,8	88,4
> 0,74	74,3 (62,4- 84,0)	95,6 (90,6- 98,4)	16,84	0,27	89,7	87,8
> 0,76	71,4 (59,4- 81,6)	95,6 (90,6- 98,4)	16,19	0,30	89,3	86,7
> 0,87	70,0 (57,9- 80,4)	96,3 (91,6- 98,8)	19,04	0,31	90,7	86,2
> 0,88	68,6 (56,4- 79,1)	96,3 (91,6- 98,8)	18,65	0,33	90,6	85,6
> 0,89	68,6 (56,4- 79,1)	97,1 (92,6- 99,2)	23,31	0,32	92,3	85,7
> 0,9	67,1 (54,9- 77,9)	97,1 (92,6- 99,2)	22,83	0,34	92,2	85,2
> 0,96	65,7 (53,4- 76,6)	97,1 (92,6- 99,2)	22,34	0,35	92,0	84,6
> 1,02	64,3 (51,9- 75,4)	97,1 (92,6- 99,2)	21,86	0,37	91,8	84,1
> 1,03	62,9 (50,5- 74,1)	97,1 (92,6- 99,2)	21,37	0,38	91,7	83,5
> 1,11	61,4 (49,0- 72,8)	97,1 (92,6- 99,2)	20,89	0,40	91,5	83,0
> 1,19	60,0 (47,6- 71,5)	97,1 (92,6- 99,2)	20,40	0,41	91,3	82,5
> 1,2	58,6 (46,2- 70,2)	97,1 (92,6- 99,2)	19,91	0,43	91,1	82,0
> 1,26	57,1 (44,7- 68,9)	97,1 (92,6- 99,2)	19,43	0,44	90,9	81,5
> 1,27	55,7 (43,3- 67,6)	97,1 (92,6- 99,2)	18,94	0,46	90,7	81,0
> 1,33	54,3 (41,9- 66,3)	97,1 (92,6- 99,2)	18,46	0,47	90,5	80,5
> 1,41	52,9 (40,6- 64,9)	97,1 (92,6- 99,2)	17,97	0,49	90,2	80,0
> 1,43	51,4 (39,2- 63,6)	97,1 (92,6- 99,2)	17,49	0,50	90,0	79,5
> 1,44	50,0 (37,8- 62,2)	97,1 (92,6- 99,2)	17,00	0,52	89,7	79,0
> 1,56	48,6 (36,4- 60,8)	97,1 (92,6- 99,2)	16,51	0,53	89,5	78,6
> 1,59	48,6 (36,4- 60,8)	97,8 (93,7- 99,5)	22,02	0,53	91,9	78,7
> 1,64	45,7 (33,7- 58,1)	97,8 (93,7- 99,5)	20,72	0,56	91,4	77,8
> 1,71	44,3 (32,4- 56,7)	97,8 (93,7- 99,5)	20,08	0,57	91,2	77,3
> 1,72	44,3 (32,4- 56,7)	98,5 (94,8- 99,8)	30,11	0,57	93,9	77,5
> 1,88	42,9 (31,1- 55,3)	98,5 (94,8- 99,8)	29,14	0,58	93,8	77,0
> 1,96	41,4 (29,8- 53,8)	98,5 (94,8- 99,8)	28,17	0,59	93,5	76,6
> 2,22	40,0 (28,5- 52,4)	98,5 (94,8- 99,8)	27,20	0,61	93,3	76,1
> 2,44	38,6 (27,2- 51,0)	98,5 (94,8- 99,8)	26,23	0,62	93,1	75,7
> 2,73	38,6 (27,2- 51,0)	99,3 (96,0- 99,9)	52,46	0,62	96,4	75,8
> 2,84	37,1 (25,9- 49,5)	99,3 (96,0- 99,9)	50,51	0,63	96,3	75,4
> 2,94	35,7 (24,6- 48,1)	99,3 (96,0- 99,9)	48,57	0,65	96,2	75,0
> 3,11	34,3 (23,4- 46,6)	99,3 (96,0- 99,9)	46,63	0,66	96,0	74,6
> 3,43	32,9 (22,1- 45,1)	99,3 (96,0- 99,9)	44,69	0,68	95,8	74,2
> 3,45	31,4 (20,9- 43,6)	99,3 (96,0- 99,9)	42,74	0,69	95,7	73,8
> 3,86	30,0 (19,6- 42,1)	99,3 (96,0- 99,9)	40,80	0,71	95,5	73,4
> 3,89	28,6 (18,4- 40,6)	99,3 (96,0- 99,9)	38,86	0,72	95,2	73,0
> 4,22	27,1 (17,2- 39,1)	99,3 (96,0- 99,9)	36,91	0,73	95,0	72,6
> 4,52	25,7 (16,0- 37,6)	99,3 (96,0- 99,9)	34,97	0,75	94,7	72,2

> 4,75	24,3 (14,8- 36,0)	99,3 (96,0- 99,9)	33,03	0,76	94,4	71,8
> 4,78	22,9 (13,7- 34,4)	99,3 (96,0- 99,9)	31,09	0,78	94,1	71,4
> 5,21	21,4 (12,5- 32,9)	99,3 (96,0- 99,9)	29,14	0,79	93,8	71,1
> 5,3	20,0 (11,4- 31,3)	99,3 (96,0- 99,9)	27,20	0,81	93,3	70,7
> 5,78	20,0 (11,4- 31,3)	100,0 (100,0-100,0)		0,80	100,0	70,8
> 6,12	18,6 (10,3- 29,7)	100,0 (100,0-100,0)		0,81	100,0	70,5
> 6,24	17,1 (9,2- 28,0)	100,0 (100,0-100,0)		0,83	100,0	70,1
> 7,24	15,7 (8,1- 26,4)	100,0 (100,0-100,0)		0,84	100,0	69,7
> 7,42	14,3 (7,1- 24,7)	100,0 (100,0-100,0)		0,86	100,0	69,4
> 7,48	12,9 (6,1- 23,0)	100,0 (100,0-100,0)		0,87	100,0	69,0
> 7,49	11,4 (5,1- 21,3)	100,0 (100,0-100,0)		0,89	100,0	68,7
> 7,57	8,6 (3,2- 17,7)	100,0 (100,0-100,0)		0,91	100,0	68,0
> 7,88	7,1 (2,4- 15,9)	100,0 (100,0-100,0)		0,93	100,0	67,7
> 9,33	5,7 (1,6- 14,0)	100,0 (100,0-100,0)		0,94	100,0	67,3
> 9,84	4,3 (0,9- 12,0)	100,0 (100,0-100,0)		0,96	100,0	67,0
> 9,97	2,9 (0,4- 10,0)	100,0 (100,0-100,0)		0,97	100,0	66,7
> 11,41	1,4 (0,2- 7,7)	100,0 (100,0-100,0)		0,99	100,0	66,3
> 11,48	0,0 (0,0- 0,0)	100,0 (100,0-100,0)		1,00	66,0	

Sens. = Sensitivity

Spec. = Specificity

+LR = Positive likelihood ratio

-LR = Negative likelihood ratio

+PV = Positive predictive value

-PV = Negative predictive value

ANEXO V. RESULTADOS SUERO ESTUDIO INTERNO.

VARIABLE = INDEX_VIRCLIA

POSITIVE GROUP = REF="P"

Sample size = 147

NEGATIVE GROUP = REF="N"

Sample size = 142

Disease prevalence (%) = 50,9

Area under the ROC curve = 0,912

Standard error = 0,018

95% Confidence interval = 0,874 to 0,942

Criterion	Sens. (95% C.I.)	Spec. (95% C.I.)	+LR	-LR	+PV	-PV
>=0,01	100,0 (100,0-100,0)	0,0 (0,0- 0,0)	1,00		50,9	
> 0,01	100,0 (100,0-100,0)	9,9 (5,5- 16,0)	1,11	0,00	53,5	100,0
> 0,02	98,6 (95,2- 99,8)	42,3 (34,0- 50,8)	1,71	0,03	63,9	96,8
> 0,03	98,6 (95,2- 99,8)	51,4 (42,9- 59,9)	2,03	0,03	67,8	97,3
> 0,04	98,6 (95,2- 99,8)	58,5 (49,9- 66,7)	2,37	0,02	71,1	97,6
> 0,05	98,6 (95,2- 99,8)	60,6 (52,0- 68,7)	2,50	0,02	72,1	97,7
> 0,06	98,0 (94,1- 99,6)	64,8 (56,3- 72,6)	2,78	0,03	74,2	96,8
> 0,07	96,6 (92,2- 98,9)	66,2 (57,8- 73,9)	2,86	0,05	74,7	94,9
> 0,08	94,6 (89,6- 97,6)	69,0 (60,7- 76,5)	3,05	0,08	76,0	92,5
> 0,09	93,2 (87,8- 96,7)	70,4 (62,2- 77,8)	3,15	0,10	76,5	90,9
> 0,1	92,5 (87,0- 96,2)	71,1 (62,9- 78,4)	3,20	0,11	76,8	90,2
> 0,11	90,5 (84,5- 94,7)	76,1 (68,2- 82,8)	3,78	0,13	79,6	88,5
> 0,12	89,1 (82,9- 93,6)	78,2 (70,5- 84,7)	4,08	0,14	80,9	87,4

> 0,13	87,8 (81,3- 92,6)	81,0 (73,6- 87,1)	4,62	0,15	82,7	86,5
> 0,14	87,1 (80,6- 92,0)	83,1 (75,9- 88,9)	5,15	0,16	84,2	86,1
> 0,16	84,4 (77,5- 89,8)	85,2 (78,3- 90,6)	5,70	0,18	85,5	84,0
> 0,17 *	83,0 (75,9- 88,7)	87,3 (80,7- 92,3)	6,55	0,19	87,1	83,2
> 0,18	81,0 (73,7- 87,0)	88,0 (81,5- 92,9)	6,76	0,22	87,5	81,7
> 0,19	79,6 (72,2- 85,8)	89,4 (83,2- 94,0)	7,53	0,23	88,6	80,9
> 0,2	78,9 (71,4- 85,2)	89,4 (83,2- 94,0)	7,47	0,24	88,5	80,4
> 0,21	74,8 (67,0- 81,6)	89,4 (83,2- 94,0)	7,08	0,28	88,0	77,4
> 0,22	71,4 (63,4- 78,6)	89,4 (83,2- 94,0)	6,76	0,32	87,5	75,1
> 0,23	66,7 (58,4- 74,2)	90,8 (84,9- 95,0)	7,28	0,37	88,3	72,5
> 0,24	66,7 (58,4- 74,2)	92,3 (86,6- 96,1)	8,61	0,36	89,9	72,8
> 0,25	63,9 (55,6- 71,7)	92,3 (86,6- 96,1)	8,25	0,39	89,5	71,2
> 0,26	59,9 (51,5- 67,9)	92,3 (86,6- 96,1)	7,73	0,44	88,9	68,9
> 0,27	59,2 (50,8- 67,2)	93,0 (87,4- 96,6)	8,40	0,44	89,7	68,7
> 0,28	56,5 (48,0- 64,6)	93,0 (87,4- 96,6)	8,02	0,47	89,2	67,3
> 0,29	55,8 (47,4- 64,0)	93,0 (87,4- 96,6)	7,92	0,48	89,1	67,0
> 0,3	54,4 (46,0- 62,6)	93,7 (88,3- 97,1)	8,59	0,49	89,9	66,5
> 0,31	53,7 (45,3- 62,0)	94,4 (89,2- 97,5)	9,54	0,49	90,8	66,3
> 0,32	53,1 (44,7- 61,3)	94,4 (89,2- 97,5)	9,42	0,50	90,7	66,0
> 0,33	51,7 (43,3- 60,0)	94,4 (89,2- 97,5)	9,18	0,51	90,5	65,4
> 0,35	50,3 (42,0- 58,7)	94,4 (89,2- 97,5)	8,94	0,53	90,2	64,7
> 0,36	50,3 (42,0- 58,7)	95,1 (90,1- 98,0)	10,21	0,52	91,4	64,9
> 0,37	49,0 (40,7- 57,3)	95,1 (90,1- 98,0)	9,94	0,54	91,1	64,3
> 0,38	48,3 (40,0- 56,7)	95,1 (90,1- 98,0)	9,80	0,54	91,0	64,0
> 0,4	46,3 (38,0- 54,7)	95,1 (90,1- 98,0)	9,38	0,57	90,7	63,1
> 0,41	45,6 (37,4- 54,0)	95,1 (90,1- 98,0)	9,25	0,57	90,5	62,8
> 0,44	44,9 (36,7- 53,3)	95,1 (90,1- 98,0)	9,11	0,58	90,4	62,5
> 0,48	42,9 (34,7- 51,3)	95,1 (90,1- 98,0)	8,69	0,60	90,0	61,6

> 0,54	40,1 (32,1- 48,5)	95,1 (90,1- 98,0)	8,14	0,63	89,4	60,5
> 0,55	39,5 (31,5- 47,8)	95,1 (90,1- 98,0)	8,00	0,64	89,2	60,3
> 0,67	38,8 (30,9- 47,2)	95,1 (90,1- 98,0)	7,87	0,64	89,1	60,0
> 0,7	37,4 (29,6- 45,8)	95,8 (91,0- 98,4)	8,85	0,65	90,2	59,6
> 0,71	36,7 (28,9- 45,1)	95,8 (91,0- 98,4)	8,69	0,66	90,0	59,4
> 0,75	36,7 (28,9- 45,1)	96,5 (92,0- 98,8)	10,43	0,66	91,5	59,6
> 0,76	36,1 (28,3- 44,4)	96,5 (92,0- 98,8)	10,24	0,66	91,4	59,3
> 0,78	34,0 (26,4- 42,3)	96,5 (92,0- 98,8)	9,66	0,68	90,9	58,5
> 0,85	32,7 (25,2- 40,9)	96,5 (92,0- 98,8)	9,27	0,70	90,6	58,1
> 0,87	31,3 (23,9- 39,5)	96,5 (92,0- 98,8)	8,89	0,71	90,2	57,6
> 0,88	30,6 (23,3- 38,7)	96,5 (92,0- 98,8)	8,69	0,72	90,0	57,3
> 0,89	29,9 (22,7- 38,0)	96,5 (92,0- 98,8)	8,50	0,73	89,8	57,1
> 0,92	29,9 (22,7- 38,0)	97,2 (92,9- 99,2)	10,63	0,72	91,7	57,3
> 0,94	29,3 (22,0- 37,3)	97,2 (92,9- 99,2)	10,38	0,73	91,5	57,0
> 0,96	28,6 (21,4- 36,6)	97,2 (92,9- 99,2)	10,14	0,73	91,3	56,8
> 0,97	27,9 (20,8- 35,9)	97,2 (92,9- 99,2)	9,90	0,74	91,1	56,6
> 0,99	27,2 (20,2- 35,2)	97,2 (92,9- 99,2)	9,66	0,75	90,9	56,3
> 1,09	27,2 (20,2- 35,2)	97,9 (93,9- 99,5)	12,88	0,74	93,0	56,5
> 1,21	26,5 (19,6- 34,4)	97,9 (93,9- 99,5)	12,56	0,75	92,9	56,3
> 1,24	25,9 (19,0- 33,7)	97,9 (93,9- 99,5)	12,24	0,76	92,7	56,0
> 1,29	25,9 (19,0- 33,7)	98,6 (95,0- 99,8)	18,35	0,75	95,0	56,2
> 1,36	25,2 (18,4- 33,0)	98,6 (95,0- 99,8)	17,87	0,76	94,9	56,0
> 1,37	24,5 (17,8- 32,3)	100,0 (100,0-100,0)		0,76	100,0	56,1
> 1,39	23,8 (17,2- 31,5)	100,0 (100,0-100,0)		0,76	100,0	55,9
> 1,41	22,4 (16,0- 30,1)	100,0 (100,0-100,0)		0,78	100,0	55,5
> 1,48	21,8 (15,4- 29,3)	100,0 (100,0-100,0)		0,78	100,0	55,3
> 1,5	20,4 (14,2- 27,8)	100,0 (100,0-100,0)		0,80	100,0	54,8
> 1,55	19,7 (13,6- 27,1)	100,0 (100,0-100,0)		0,80	100,0	54,6

> 1,56	19,0 (13,0- 26,3)	100,0 (100,0-100,0)	0,81	100,0	54,4
> 1,66	18,4 (12,5- 25,6)	100,0 (100,0-100,0)	0,82	100,0	54,2
> 1,67	17,7 (11,9- 24,8)	100,0 (100,0-100,0)	0,82	100,0	54,0
> 1,69	17,0 (11,3- 24,1)	100,0 (100,0-100,0)	0,83	100,0	53,8
> 1,96	16,3 (10,8- 23,3)	100,0 (100,0-100,0)	0,84	100,0	53,6
> 2,31	15,6 (10,2- 22,5)	100,0 (100,0-100,0)	0,84	100,0	53,4
> 2,73	15,0 (9,6- 21,8)	100,0 (100,0-100,0)	0,85	100,0	53,2
> 2,8	14,3 (9,1- 21,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,86	100,0	53,0
> 3,22	13,6 (8,5- 20,2)	100,0 (100,0-100,0)	0,86	100,0	52,8
> 3,39	12,9 (8,0- 19,4)	100,0 (100,0-100,0)	0,87	100,0	52,6
> 4,15	12,2 (7,4- 18,7)	100,0 (100,0-100,0)	0,88	100,0	52,4
> 4,5	11,6 (6,9- 17,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,88	100,0	52,2
> 4,54	10,9 (6,4- 17,1)	100,0 (100,0-100,0)	0,89	100,0	52,0
> 5,25	10,2 (5,8- 16,3)	100,0 (100,0-100,0)	0,90	100,0	51,8
> 5,59	9,5 (5,3- 15,5)	100,0 (100,0-100,0)	0,90	100,0	51,6
> 5,62	8,8 (4,8- 14,7)	100,0 (100,0-100,0)	0,91	100,0	51,4
> 5,74	8,2 (4,3- 13,8)	100,0 (100,0-100,0)	0,92	100,0	51,3
> 5,83	7,5 (3,8- 13,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,93	100,0	51,1
> 6,16	6,8 (3,3- 12,2)	100,0 (100,0-100,0)	0,93	100,0	50,9
> 6,52	6,1 (2,8- 11,3)	100,0 (100,0-100,0)	0,94	100,0	50,7
> 6,64	5,4 (2,4- 10,4)	100,0 (100,0-100,0)	0,95	100,0	50,5
> 6,99	4,8 (1,9- 9,6)	100,0 (100,0-100,0)	0,95	100,0	50,4
> 7,11	4,1 (1,5- 8,7)	100,0 (100,0-100,0)	0,96	100,0	50,2
> 7,15	3,4 (1,1- 7,8)	100,0 (100,0-100,0)	0,97	100,0	50,0
> 7,63	2,7 (0,8- 6,8)	100,0 (100,0-100,0)	0,97	100,0	49,8
> 8,74	2,0 (0,4- 5,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,98	100,0	49,7
> 8,81	1,4 (0,2- 4,8)	100,0 (100,0-100,0)	0,99	100,0	49,5
> 10,58	0,7 (0,1- 3,7)	100,0 (100,0-100,0)	0,99	100,0	49,3

> 13,35 0,0 (0,0- 0,0) 100,0 (100,0-100,0) 1,00 49,1

Sens. = Sensitivity

Spec. = Specificity

+LR = Positive likelihood ratio

-LR = Negative likelihood ratio

+PV = Positive predictive value

-PV = Negative predictive value

ANEXO VI. DATOS BRUTOS ESTUDIO MULTICÉNTRICO EXTERNO.

Tipo de muestra	Código muestra	Ensayo de referencia (ELISA)			Ensayo en evaluación (CLIA)			CORRELACIÓN
		Valor (DO)	Índice	Interpretación	Valor (RLU)	Índice	Interpretación	
Suero	4007849	0,03	0,078	N	0,83	0,133	N	VN
LBA	4008968	0,11	0,312	N	1,84	0,256	P	FP
Suero	4008973	3,51	10,127	P	8,87	1,64	P	VP
LBA	4010385	0,04	0,124	N	0,69	0,123	N	VN
LBA	4010392	0,04	0,13	N	0,93	0,161	B	B
LBA	4010395	0,11	0,315	N	0,84	0,149	N	VN
LBA	4010398	0,05	0,148	N	1,44	0,177	B	B
LBA	4010441	2,52	7,281	P	17,49	7,417	P	VP
Suero	4010814	0,03	0,104	N	0,68	0,117	N	VN
Suero	4011413	0,05	0,136	N	0,1	0,037	N	VN
LBA	4011735	0,05	0,153	N	0,16	0,057	N	VN
LBA	4011752	0,05	0,162	N	0,16	0,058	N	VN
Suero	4012876	0,04	0,107	N	0,11	0,038	N	VN
LBA	4013033	0,9	2,597	P	5,46	1,612	P	VP
Suero	4013305	0,04	0,124	N	0,12	0,035	N	VN
LBA	4013492	0,05	0,15	N	0,28	0,089	N	VN
LBA	4014723	0,13	0,392	N	0,79	0,308	P	FP
LBA	4014725	0,11	0,335	N	0,96	0,312	P	FP
LBA	4014727	0,05	0,144	N	0,16	0,051	N	VN
LBA	4014733	0,09	0,277	N	0,16	0,058	N	VN
LBA	4014736	0,06	0,277	N	0,19	0,068	N	VN
LBA	4014740	0,04	0,127	N	0,16	0,04	N	VN
Suero	4014969	0,04	0,11	N	0,08	0,026	N	VN
Suero	4016839	0,06	0,14	N	0,11	0,035	N	VN
Suero	4016840	0,03	0,07	N	0,11	0,04	N	VN
LBA	4017231	0,04	0,08	N	0,22	0,08	N	VN
LBA	4018064	0,03	0,07	N	0,15	0,08	N	VN
LBA	4018067	0,03	0,07	N	0,19	0,08	N	VN
LBA	4018070	0,04	0,09	N	0,2	0,05	N	VN
LBA	4018076	0,03	0,07	N	0,17	0,06	N	VN
Suero	4018283	0,05	0,04	N	0,1	0,03	N	VN
Suero	4019539	1,54	3,54	P	2,09	0,866	P	VP
LBA	4019559	0,04	0,08	N	0,18	0,06	N	VN
LBA	4019569	0,03	0,06	N	0,13	0,039	N	VN
LBA	4021206	3,25	7,47	P	5,22	1,539	P	VP
LBA	4021220	0,04	0,08	N	0,18	0,072	N	VN
Suero	4021267	0,04	0,09	N	0,21	0,066	N	VN
Suero	4021478	0,02	0,05	N	0,1	0,03	N	VN
Suero	4021479	0,02	0,05	N	0,11	0,04	N	VN
LBA	4024687	0,04	0,08	N	0,17	0,08	N	VN

Tipo de muestra	Código muestra	Ensayo de referencia (ELISA)			Ensayo en evaluación (CLIA)			CORRELACIÓN
		Valor (DO)	Índice	Interpretación	Valor (RLU)	Índice	Interpretación	
LBA	4024688	0,05	0,1	N	0,16	0,06	N	VN
LBA	4025334	0,05	0,09	N	0,14	0,05	N	VN
LBA	4025597	3,24	6,54	P	13,72	5,37	P	VP
Suero	4025621	0,03	0,07	N	0,09	0,03	N	VN
Suero	4026554	0,04	0,08	N	0,11	0,04	N	VN
Suero	4026557	0,03	0,07	N	0,09	0,04	N	VN
LBA	4026646	0,04	0,08	N	0,13	0,05	N	VN
LBA	4026920	0,31	0,89	P	0,94	0,333	P	VP
Suero	4027587	0,04	0,07	N	0,13	0,05	N	VN
LBA	4028092	0,08	0,17	N	0,25	0,1	N	VN
LBA	4028290	0,08	0,16	N	0,18	0,06	N	VN
LBA	4028296	0,14	0,29	N	0,24	0,08	N	VN
LBA	4028306	0,06	0,13	N	0,17	0,06	N	VN
LBA	4028432	0,05	0,11	N	0,18	0,08	N	VN
Suero	4029680	0,14	0,41	N	0,17	0,058	N	VN
LBA	4029867	0,03	0,09	N	0,14	0,048	N	VN
LBA	4029872	0,04	0,12	N	0,19	0,064	N	VN
Suero	4030150	0,19	0,55	P	0,23	0,085	N	FN
LBA	4031237	0,09	0,25	N	0,21	0,077	N	VN
LBA	4032344	0,02	0,046	N	0,36	0,122	N	VN
LBA	4032347	1,01	2,196	P	2,89	0,786	P	VP
LBA	4032352	0,02	0,039	N	0,29	0,08	N	VN
Suero	4032695	0,04	0,083	N	0,26	0,07	N	VN
Suero	4032697	0,02	0,052	N	0,18	0,067	N	VN
Suero	4032698	0,03	0,059	N	0,2	0,059	N	VN
Suero	4032780	0,02	0,048	N	0,25	0,073	N	VN
LBA	4033828	0,03	0,067	N	0,4	0,129	N	VN
Suero	4035641	0,02	0,05	N	0,21	0,065	N	VN
Suero	4035642	0,02	0,054	N	0,23	0,065	N	VN
Suero	4036946	0,04	0,085	N	0,18	0,052	N	VN
Suero	4037019	0,05	0,103	N	0,12	0,035	N	VN
Suero	4037020	0,06	0,145	N	0,12	0,035	N	VN
LBA	4038311	0,23	0,485	N	0,56	0,229	P	FP
LBA	4038312	0,03	0,076	N	0,17	0,071	N	VN
LBA	4039318	0,03	0,07	N	0,18	0,068	N	VN
LBA	4039321	0,06	0,123	N	0,76	0,3	P	FP
LBA	4039324	0,06	0,121	N	0,42	0,179	B	B
LBA	4040009	0,03	0,07	N	0,2	0,079	N	VN
LBA	4040966	0,41	0,879	P	4,02	1,688	P	VP
LBA	4040977	0,05	0,104	N	0,36	0,157	N	VN
LBA	4042050	0,04	0,081	N	0,86	0,326	P	FP
LBA	4042052	0,06	0,129	N	0,19	0,076	N	VN
LBA	4042322	0,04	0,085	N	0,22	0,091	N	VN

Tipo de muestra	Código muestra	Ensayo de referencia (ELISA)			Ensayo en evaluación (CLIA)			CORRELACIÓN
		Valor (DO)	Índice	Interpretación	Valor (RLU)	Índice	Interpretación	
Suero	4042443	0,03	0,068	N	0,09	0,038	N	VN
LBA	4044942	0,05	0,097	N	0,17	0,052	N	VN
Suero	4045064	0,06	0,128	N	0,13	0,024	N	VN
Suero	4045204	0,03	0,061	N	0,11	0,041	N	VN
LBA	4046098	0,03	0,119	N	0,21	0,062	N	VN
LBA	4046109	0,08	0,303	N	0,96	0,351	P	FP
LBA	4047087	0,03	0,115	N	0,3	0,107	N	VN
Suero	4047096	0,02	0,073	N	0,08	0,027	N	VN
LBA	4049093	0,03	0,111	N	0,12	0,048	N	VN
Suero	4049210	0,03	0,107	N	0,16	0,06	N	VN
Suero	4050666	0,02	0,064	N	0,1	0,034	N	VN
Suero	4051641	0,05	0,164	N	0,13	0,046	N	VN
Suero	16005703	0,02	0,031	N	0,23	0,07	N	VN
Suero	16011696	0,59	1,032	P	1,4	0,444	P	VP
Suero	16031644	>3.5	>7	P	27,56	7,896	P	VP
Suero	16036014	0,31	0,5447	P	0,64	0,189	B	B
Suero	16036089	0,14	0,246	N	0,61	0,197	B	B
Suero	16036902	3,37	5,849	P	6,51	2,234	P	VP
Suero	16158351	0,04	0,073	N	0,28	0,118	N	VN
Suero	16158427	0,02	0,031	N	0,24	0,085	N	VN
Suero	16165378	0,05	0,092	N	0,28	0,104	N	VN
Suero	16169470	>3.5	>7	P	5,82	1,969	P	VP
LBA	16172368	1,98	3,5	P	2,67	1,063	P	VP
LBA	16173775	>3.5	>7	P	35,37	11,786	P	VP
Suero	16175698	1	1,733	P	1,23	0,4	P	VP
Suero	16230224	2,56	4,444	P	4,92	1,512	P	VP
LBA	16265664	>3.5	>7	P	5,98	1,964	P	VP
Suero	16267742	0,19	0,343	N	0,3	0,128	N	VN
Suero	16267853	0,09	0,228	N	0,67	0,285	P	FP
Suero	16283474	0,16	0,286	N	0,41	0,144	N	VN
Suero	16293485	0,48	1,28	P	0,29	0,111	N	FN
Suero	17006391	0,42	2,242	P	0,5	0,178	B	B
Suero	17006410	0,1	0,172	N	0,99	0,344	P	FP
Suero	17006780	0,18	0,317	N	1,36	0,552	P	FP
Suero	17012311	0,2	0,352	N	1,76	0,671	P	FP
Suero	17012732	0,14	0,243	N	1,27	0,433	P	FP
Suero	17014413	0,5	0,871	P	0,65	0,252	P	VP
Suero	17019416	0,1	0,177	N	0,86	0,315	P	FP
Suero	17039893	0,12	0,203	N	1,21	0,406	P	FP
Suero	17039911	0,02	0,042	N	0,07	0,027	N	VN
Suero	17041249	0,31	0,531	P	2,53	0,808	P	VP
Suero	17041700	0,4	0,694	P	2,6	1,016	P	VP
Suero	17050345	0,47	0,822	P	3,89	1,57	P	VP

Tipo de muestra	Código muestra	Ensayo de referencia (ELISA)			Ensayo en evaluación (CLIA)			CORRELACIÓN
		Valor (DO)	Índice	Interpretación	Valor (RLU)	Índice	Interpretación	
Suero	17050722	0,09	0,151	N	0,14	0,063	N	VN
Suero	17050830	0,61	1,063	P	5,02	1,943	P	VP
Suero	17056507	0,36	0,624	P	0,55	0,221	P	VP
Suero	17056639	0,37	0,647	P	0,68	0,225	P	VP
Suero	17060141	0,76	1,317	P	5,11	1,755	P	VP
Suero	17060470	0,75	1,23	P	4,24	1,599	P	VP
Suero	17060621	0,1	0,175	N	0,18	0,067	N	VN
Suero	17066063	0,69	1,202	P	3,71	1,274	P	VP
Suero	17066495	0,82	1,422	P	4,15	1,65	P	VP
Suero	17075111	0,68	1,173	P	3,67	1,49	P	VP
Suero	17075562	0,39	0,682	P	2,91	1,327	P	VP
Suero	17080041	0,91	1,582	P	5,63	2,507	P	VP
Suero	17080297	2,24	3,88	P	13,02	5,769	P	VP
Suero	17080550	1,97	3,426	P	12,31	6,078	P	VP
Suero	17095393	1,52	2,678	P	4,17	1,626	P	VP
Suero	17095547	0,16	0,859	P	1,35	0,486	P	VP
Suero	17098551	0,58	0,967	P	5,27	1,862	P	VP
Suero	17108989	0,24	0,39	N	2,31	0,658	P	FP
Suero	17117464	0,22	0,359	N	1,86	0,501	P	FP
Suero	17218848	0,37	0,616	P	0,72	0,265	P	VP
Suero	17232121	0,23	0,383	N	0,58	0,213	P	FP
Suero	17232851	1,14	1,879	P	2,64	0,785	P	VP
Suero	17242058	0,82	1,364	P	1,81	0,629	P	VP
Suero	17242268	0,06	0,099	N	0,29	0,099	N	VN
Suero	17242580	0,56	0,924	P	0,9	0,403	P	VP
Suero	17248423	0,37	0,605	P	0,79	0,308	P	VP
Suero	17248873	0,57	0,949	P	0,98	0,336	P	VP
Suero	17248878	0,46	0,764	P	0,93	0,337	P	VP
Suero	18004802	0,3	0,501	P	0,52	0,236	P	VP
Suero	18013318	>3,5	>7	P	24,17	8,836	P	VP
LBA	18015878	0,3	0,489	N	9,42	3,922	P	FP
Suero	18018156	0,21	0,341	N	0,3	0,119	N	VN
Suero	18018517	1,78	2,947	P	14,55	5,953	P	VP
Suero	18023187	0,17	0,281	N	0,38	0,144	N	VN
LBA	18027500	0,28	0,497	N	1,46	0,379	P	FP
Suero	18028396	0,78	1,296	P	3,47	1,233	P	VP
Suero	18028700	1,68	2,963	P	11,99	5,217	P	VP
LBA	18031376	>3,5	>7	P	9,78	3,512	P	VP
Suero	18032265	0,13	0,227	N	0,46	0,138	N	VN
Suero	18032534	0,51	0,88	P	5,49	1,669	P	VP
Suero	18037118	0,18	0,32	N	0,37	0,131	N	VN
Suero	18037422	0,25	0,43	N	0,47	0,149	N	VN
LBA	18042793	0,91	1,57	P	0,91	0,289	P	VP

Tipo de muestra	Código muestra	Ensayo de referencia (ELISA)			Ensayo en evaluación (CLIA)			CORRELACIÓN
		Valor (DO)	Índice	Interpretación	Valor (RLU)	Índice	Interpretación	
Suero	18043197	0,27	0,46	N	0,5	0,197	B	B
Suero	18043515	0,16	0,28	N	0,33	0,106	N	VN
Suero	18047712	0,56	0,96	P	6,6	2,382	P	VP
LBA	18051091	0,19	0,33	N	2,28	0,856	P	FP
Suero	18073214	>3,5	>7	P	37,82	12,53	P	VP
LBA	18076049	0,15	0,27	N	8,17	2,314	P	FP
Suero	18082079	0,35	0,61	P	1,25	0,438	P	VP
Suero	18082405	>3,5	>7	P	43,03	15,739	P	VP
Suero	18086014	0,27	0,48	N	0,81	0,291	P	FP
Suero	18094190	>3,5	>7	P	43,51	16,39	P	VP
Suero	18094332	>3,5	>7	P	37,65	12,662	P	VP
Suero	18097160	>3,5	>7	P	37,28	14,269	P	VP
Suero	18104408	3,32	5,74	P	8,42	2,909	P	VP
Suero	18104464	2,93	5,07	P	6,18	2,369	P	VP
Suero	18104602	2,95	5,11	P	9,64	3,463	P	VP
Suero	18114123	1,27	2,2	P	4,89	1,863	P	VP
Suero	18119752	>3,5	>7	P	37,99	12,607	P	VP
LBA	18142948	1,86	2,57	P	18,06	4,741	P	VP
LBA	18151933	1,43	2,57	P	3,3	0,943	P	VP
LBA	18253602	0,13	0,24	N	0,58	0,169	B	B
Suero	19060128	0,02	0,04	N	0,26	0,069	N	VN
Suero	19118917	0,02	0,031	N	0,2	0,076	N	VN
Suero	19118919	0,02	0,029	N	0,23	0,08	N	VN
Suero	19118921	0,02	0,034	N	0,23	0,075	N	VN
Suero	19118923	0,02	0,045	N	0,25	0,089	N	VN
Suero	19118925	0,03	0,05	N	0,22	0,077	N	VN
Suero	19118927	0,02	0,034	N	0,22	0,072	N	VN
Suero	19118928	0,02	0,034	N	0,24	0,119	N	VN
Suero	19118933	0,02	0,036	N	0,28	0,097	N	VN
Suero	19118935	0,02	0,029	N	0,21	0,079	N	VN
Suero	19118936	0,02	0,036	N	0,26	0,105	N	VN
Suero	19118937	0,03	0,061	N	0,18	0,061	N	VN
Suero	19118949	0,03	0,063	N	0,09	0,034	N	VN
Suero	19123150	0,06	0,113	N	0,12	0,042	N	VN
Suero	19123151	0,02	0,043	N	0,11	0,042	N	VN
Suero	19123152	0,04	0,065	N	0,1	0,035	N	VN
Suero	19123153	0,04	0,064	N	0,08	0,032	N	VN
Suero	19123154	0,04	0,074	N	0,14	0,05	N	VN
Suero	19123157	0,1	0,182	N	0,16	0,06	N	VN
Suero	19123158	0,03	0,051	N	0,08	0,033	N	VN
Suero	19123159	0,03	0,046	N	0,08	0,028	N	VN
Suero	19123160	0,03	0,055	N	0,08	0,032	N	VN
Suero	19123161	0,03	0,055	N	0,11	0,046	N	VN

Tipo de muestra	Código muestra	Ensayo de referencia (ELISA)			Ensayo en evaluación (CLIA)			CORRELACIÓN
		Valor (DO)	Índice	Interpretación	Valor (RLU)	Índice	Interpretación	
Suero	19123165	0,03	0,055	N	0,09	0,034	N	VN
Suero	19123166	0,03	0,055	N	0,11	0,035	N	VN
Suero	19123391	0,03	0,055	N	0,09	0,032	N	VN
Suero	22172110	0,04	0,085	N	0,18	0,079	N	VN
Suero	36377769	0,03	0,076	N	0,1	0,034	N	VN
Suero	37117244	0,05	0,1	N	0,09	0,04	N	VN
Suero	40137468	1,34	3,84	P	0,66	0,201	P	VP
Suero	50103017	0,23	0,52	P	0,26	0,074	N	FN
Suero	50978761	0,04	0,133	N	1,04	0,181	B	B
Suero	50983569	0,02	0,053	N	0,09	0,041	N	VN
Suero	53906954	-	1,22	P	-	0,589	P	VP
Suero	56957601	-	1,2	P	-	1,923	P	VP
Suero	57103027	-	0,16	N	-	0,236	P	FP
Suero	57816164	-	0,08	N	-	0,047	N	VN
Suero	57819989	-	0,07	N	-	0,038	N	VN
Suero	57823191	-	0,08	N	-	0,039	N	VN
Suero	57826510	-	0,08	N	-	0,029	N	VN
LBA	57826730	-	0,14	N	-	0,077	N	VN
Suero	57826786	-	0,07	N	-	0,046	N	VN
Suero	57826995	-	0,1	N	-	0,041	N	VN
Suero	57827716	-	0,16	N	-	0,054	N	VN
Suero	57827733	-	0,11	N	-	0,057	N	VN
Suero	57829743	-	0,08	N	-	0,054	N	VN
LBA	57844057	-	0,43	N	-	0,118	N	VN
Suero	57844058	-	0,08	N	-	0,047	N	VN
Suero	57844532	-	0,1	N	-	0,029	N	VN
Suero	57844538	-	0,08	N	-	0,032	N	VN
Suero	57845266	-	0,08	N	-	0,035	N	VN
Suero	57845270	-	0,07	N	-	0,028	N	VN
Suero	57845605	-	0,1	N	-	0,038	N	VN
Suero	57853037	-	0,1	N	-	0,024	N	VN
Suero	57853060	-	0,09	N	-	0,034	N	VN
Suero	57856119	-	0,09	N	-	0,018	N	VN
Suero	57857742	-	0,08	N	-	0,033	N	VN
Suero	57857753	-	0,12	N	-	0,027	N	VN
Suero	57857908	-	0,47	N	-	0,164	B	B
Suero	57859282	-	0,1	N	-	0,038	N	VN
Suero	57859324	-	0,37	N	-	0,038	N	VN
Suero	57860236	-	0,1	N	-	0,036	N	VN
Suero	57860357	-	0,11	N	-	0,039	N	VN
Suero	57860624	-	0,18	N	-	0,129	N	VN
Suero	57864188	-	0,1	N	-	0,042	N	VN
Suero	57864191	-	0,14	N	-	0,033	N	VN

Tipo de muestra	Código muestra	Ensayo de referencia (ELISA)			Ensayo en evaluación (CLIA)			CORRELACIÓN
		Valor (DO)	Índice	Interpretación	Valor (RLU)	Índice	Interpretación	
LBA	57869182	-	0,32	N	-	0,047	N	VN
Suero	57893843	-	0,08	N	-	0,058	N	VN
Suero	57894037	-	0,83	P	-	1,24	P	VP
Suero	57904571	-	4,21	P	-	3,364	P	VP
Suero	57904573	-	4,75	P	-	3,599	P	VP
Suero	57907509	-	0,09	N	-	0,018	N	VN
Suero	57907510	-	0,08	N	-	0,032	N	VN
Suero	57907514	-	0,1	N	-	0,05	N	VN
Suero	57907518	-	0,08	N	-	0,047	N	VN
Suero	57908810	-	0,07	N	-	0,032	N	VN
Suero	57909112	-	0,08	N	-	0,034	N	VN
Suero	57909481	-	0,08	N	-	0,027	N	VN
Suero	57909531	-	0,07	N	-	0,0437	N	VN
Suero	57911079	-	0,08	N	-	0,039	N	VN
Suero	57916306	-	0,11	N	-	0,0297	N	VN
Suero	57917672	-	0,08	N	-	0,022	N	VN
LBA	57919012	-	4,88	P	-	1,97	P	VP
LBA	57919017	-	4,88	P	-	4,671	P	VP
Suero	57927081	-	0,07	N	-	0,032	N	VN
Suero	57930095	-	0,08	N	-	0,038	N	VN
LBA	57930379	-	0,4	N	-	0,145	N	VN
Suero	60296572	0,03	0,055	N	0,11	0,038	N	VN
Suero	70167362	0,02	0,1	N	0,06	0,027	N	VN
Suero	70177082	0,03	0,123	N	0,08	0,033	N	VN
Suero	70989807	0,04	0,08	N	0,08	0,03	N	VN
Suero	70990178	0,03	0,05	N	0,09	0,03	N	VN
LBA	80528398	0,03	0,07	N	0,85	0,274	P	FP
Suero	85169747	0,03	0,06	N	0,1	0,03	N	VN
Suero	90151608	0,03	0,06	N	0,08	0,03	N	VN
Suero	90151610	0,03	0,05	N	0,09	0,02	N	VN
Suero	90151631	0,02	0,049	N	0,1	0,046	N	VN
Suero	90153123	0,02	0,096	N	0,06	0,026	N	VN
Suero	578553291	-	0,06	N	-	0,036	N	VN
Suero	5728125691	-	0,16	N	-	0,045	N	VN
Suero	5731019891	-	0,85	P	-	0,427	P	VP
Suero	5781766891	-	0,16	N	-	0,137	N	VN
Suero	5782749291	-	0,08	N	-	0,051	N	VN
Suero	5782758991	-	0,08	N	-	0,048	N	VN
Suero	5782762791	-	0,06	N	-	0,037	N	VN
Suero	5782767491	-	0,1	N	-	0,046	N	VN
Suero	5782769991	-	0,08	N	-	0,051	N	VN
Suero	5783181591	-	0,08	N	-	0,051	N	VN
Suero	5784508091	-	0,06	N	-	0,075	N	VN

Tipo de muestra	Código muestra	Ensayo de referencia (ELISA)			Ensayo en evaluación (CLIA)			CORRELACIÓN
		Valor (DO)	Índice	Interpretación	Valor (RLU)	Índice	Interpretación	
Suero	5784510791	-	0,05	N	-	0,057	N	VN
Suero	5784517791	-	0,17	N	-	0,036	N	VN
Suero	5784531291	-	0,07	N	-	0,027	N	VN
Suero	5784533391	-	0,07	N	-	0,046	N	VN
Suero	5784552091	-	0,11	N	-	0,034	N	VN
Suero	5785082991	-	0,36	N	-	0,034	N	VN
Suero	5785330191	-	0,09	N	-	0,127	N	VN
Suero	5785610591	-	0,09	N	-	0,033	N	VN
Suero	5785611291	-	0,09	N	-	0,034	N	VN
Suero	5785663191	-	0,09	N	-	0,046	N	VN
Suero	5785688891	-	0,07	N	-	0,232	P	FP
Suero	5786014791	-	0,1	N	-	0,029	N	VN
Suero	5786108191	-	0,09	N	-	0,061	N	VN
Suero	5787916191	-	0,34	N	-	0,105	N	VN
Suero	5789965991	-	0,07	N	-	0,022	N	VN
Suero	5790754191	-	0,1	N	-	0,03	N	VN
Suero	5790757191	-	0,08	N	-	0,03	N	VN
Suero	5790889091	-	0,1	N	-	0,084	N	VN
Suero	5790923891	-	0,08	N	-	0,0311	N	VN
Suero	5790925291	-	0,07	N	-	0,032	N	VN
Suero	5791274891	-	0,07	N	-	0,08	N	VN
Suero	5791319891	-	0,09	N	-	0,027	N	VN
Suero	5791572091	-	0,09	N	-	0,028	N	VN
Suero	5791634091	-	0,09	N	-	0,027	N	VN
Suero	5791635191	-	0,09	N	-	0,021	N	VN
Suero	5791659091	-	0,14	N	-	0,036	N	VN
Suero	5792507591	-	0,07	N	-	0,04	N	VN
Suero	5792522691	-	0,4	N	-	0,032	N	VN
Suero	5792874591	-	0,34	N	-	0,211	P	FP

ANEXO VII. ANÁLISIS ROC ESTUDIO MULTICENTRICO EXTERNO.

VARIABLE = INDEX_VIRCLIA

POSITIVE GROUP = BIORAD="P"

Sample size = 80

NEGATIVE GROUP = BIORAD="N"

Sample size = 247

Disease prevalence (%) = 24,5

Area under the ROC curve = 0,970

Standard error = 0,014

95% Confidence interval = 0,945 to 0,985

Criterion	Sens. (95% C.I.)	Spec. (95% C.I.)	+LR	-LR	+PV	-PV
>=0,018	100,0 (100,0-100,0)	0,0 (0,0- 0,0)	1,00		24,5	
> 0,018	100,0 (100,0-100,0)	0,8 (0,1- 2,9)	1,01	0,00	24,6	100,0
> 0,02	100,0 (100,0-100,0)	1,2 (0,3- 3,5)	1,01	0,00	24,7	100,0
> 0,021	100,0 (100,0-100,0)	1,6 (0,5- 4,1)	1,02	0,00	24,8	100,0
> 0,022	100,0 (100,0-100,0)	2,4 (0,9- 5,2)	1,02	0,00	24,9	100,0
> 0,024	100,0 (100,0-100,0)	3,2 (1,4- 6,3)	1,03	0,00	25,1	100,0
> 0,026	100,0 (100,0-100,0)	4,0 (2,0- 7,3)	1,04	0,00	25,2	100,0
> 0,027	100,0 (100,0-100,0)	7,3 (4,4- 11,3)	1,08	0,00	25,9	100,0
> 0,028	100,0 (100,0-100,0)	8,5 (5,3- 12,7)	1,09	0,00	26,1	100,0
> 0,029	100,0 (100,0-100,0)	9,7 (6,3- 14,1)	1,11	0,00	26,4	100,0
> 0,0297	100,0 (100,0-100,0)	10,1 (6,7- 14,6)	1,11	0,00	26,5	100,0
> 0,03	100,0 (100,0-100,0)	13,8 (9,7- 18,7)	1,16	0,00	27,3	100,0
> 0,0311	100,0 (100,0-100,0)	14,2 (10,1- 19,2)	1,17	0,00	27,4	100,0

> 0,032	100,0 (100,0-100,0)	17,8 (13,3- 23,2)	1,22	0,00	28,3	100,0
> 0,033	100,0 (100,0-100,0)	19,8 (15,1- 25,4)	1,25	0,00	28,8	100,0
> 0,034	100,0 (100,0-100,0)	23,5 (18,3- 29,3)	1,31	0,00	29,7	100,0
> 0,035	100,0 (100,0-100,0)	26,3 (20,9- 32,3)	1,36	0,00	30,5	100,0
> 0,036	100,0 (100,0-100,0)	27,9 (22,4- 34,0)	1,39	0,00	31,0	100,0
> 0,037	100,0 (100,0-100,0)	28,7 (23,2- 34,8)	1,40	0,00	31,3	100,0
> 0,038	100,0 (100,0-100,0)	32,0 (26,2- 38,2)	1,47	0,00	32,3	100,0
> 0,039	100,0 (100,0-100,0)	33,6 (27,7- 39,9)	1,51	0,00	32,8	100,0
> 0,04	100,0 (100,0-100,0)	36,4 (30,4- 42,8)	1,57	0,00	33,8	100,0
> 0,041	100,0 (100,0-100,0)	37,7 (31,6- 44,0)	1,60	0,00	34,2	100,0
> 0,042	100,0 (100,0-100,0)	38,9 (32,8- 45,3)	1,64	0,00	34,6	100,0
> 0,0437	100,0 (100,0-100,0)	39,3 (33,1- 45,7)	1,65	0,00	34,8	100,0
> 0,045	100,0 (100,0-100,0)	39,7 (33,5- 46,1)	1,66	0,00	34,9	100,0
> 0,046	100,0 (100,0-100,0)	42,5 (36,3- 48,9)	1,74	0,00	36,0	100,0
> 0,047	100,0 (100,0-100,0)	44,1 (37,8- 50,6)	1,79	0,00	36,7	100,0
> 0,048	100,0 (100,0-100,0)	45,3 (39,0- 51,8)	1,83	0,00	37,2	100,0
> 0,05	100,0 (100,0-100,0)	47,8 (41,4- 54,2)	1,91	0,00	38,3	100,0
> 0,051	100,0 (100,0-100,0)	49,4 (43,0- 55,8)	1,98	0,00	39,0	100,0
> 0,052	100,0 (100,0-100,0)	50,2 (43,8- 56,6)	2,01	0,00	39,4	100,0
> 0,054	100,0 (100,0-100,0)	51,0 (44,6- 57,4)	2,04	0,00	39,8	100,0
> 0,057	100,0 (100,0-100,0)	52,2 (45,8- 58,6)	2,09	0,00	40,4	100,0
> 0,058	100,0 (100,0-100,0)	53,8 (47,4- 60,2)	2,17	0,00	41,2	100,0
> 0,059	100,0 (100,0-100,0)	54,3 (47,8- 60,6)	2,19	0,00	41,5	100,0
> 0,06	100,0 (100,0-100,0)	57,1 (50,7- 63,3)	2,33	0,00	43,0	100,0
> 0,061	100,0 (100,0-100,0)	57,9 (51,5- 64,1)	2,37	0,00	43,5	100,0
> 0,062	100,0 (100,0-100,0)	58,3 (51,9- 64,5)	2,40	0,00	43,7	100,0
> 0,063	100,0 (100,0-100,0)	58,7 (52,3- 64,9)	2,42	0,00	44,0	100,0
> 0,064	100,0 (100,0-100,0)	59,1 (52,7- 65,3)	2,45	0,00	44,2	100,0

> 0,065	100,0 (100,0-100,0)	59,9 (53,5- 66,1)	2,49	0,00	44,7	100,0
> 0,066	100,0 (100,0-100,0)	60,3 (53,9- 66,5)	2,52	0,00	44,9	100,0
> 0,067	100,0 (100,0-100,0)	61,1 (54,7- 67,2)	2,57	0,00	45,5	100,0
> 0,068	100,0 (100,0-100,0)	61,9 (55,6- 68,0)	2,63	0,00	46,0	100,0
> 0,069	100,0 (100,0-100,0)	62,3 (56,0- 68,4)	2,66	0,00	46,2	100,0
> 0,07	100,0 (100,0-100,0)	63,2 (56,8- 69,2)	2,71	0,00	46,8	100,0
> 0,071	100,0 (100,0-100,0)	63,6 (57,2- 69,6)	2,74	0,00	47,1	100,0
> 0,072	100,0 (100,0-100,0)	64,4 (58,1- 70,3)	2,81	0,00	47,6	100,0
> 0,073	100,0 (100,0-100,0)	64,8 (58,5- 70,7)	2,84	0,00	47,9	100,0
> 0,074	98,8 (93,2- 99,8)	64,8 (58,5- 70,7)	2,80	0,02	47,6	99,4
> 0,075	98,8 (93,2- 99,8)	65,6 (59,3- 71,5)	2,87	0,02	48,2	99,4
> 0,076	98,8 (93,2- 99,8)	66,4 (60,1- 72,3)	2,94	0,02	48,8	99,4
> 0,077	98,8 (93,2- 99,8)	67,6 (61,4- 73,4)	3,05	0,02	49,7	99,4
> 0,079	98,8 (93,2- 99,8)	68,8 (62,6- 74,5)	3,17	0,02	50,6	99,4
> 0,08	98,8 (93,2- 99,8)	72,5 (66,4- 77,9)	3,59	0,02	53,7	99,4
> 0,084	98,8 (93,2- 99,8)	72,9 (66,9- 78,3)	3,64	0,02	54,1	99,4
> 0,085	97,5 (91,2- 99,6)	73,3 (67,3- 78,7)	3,65	0,03	54,2	98,9
> 0,089	97,5 (91,2- 99,6)	74,1 (68,2- 79,4)	3,76	0,03	54,9	98,9
> 0,091	97,5 (91,2- 99,6)	74,5 (68,6- 79,8)	3,82	0,03	55,3	98,9
> 0,097	97,5 (91,2- 99,6)	74,9 (69,0- 80,2)	3,88	0,03	55,7	98,9
> 0,099	97,5 (91,2- 99,6)	75,3 (69,4- 80,6)	3,95	0,03	56,1	98,9
> 0,1	97,5 (91,2- 99,6)	75,7 (69,9- 80,9)	4,01	0,03	56,5	98,9
> 0,104	97,5 (91,2- 99,6)	76,1 (70,3- 81,3)	4,08	0,03	56,9	98,9
> 0,105	97,5 (91,2- 99,6)	76,9 (71,2- 82,0)	4,23	0,03	57,8	99,0
> 0,106	97,5 (91,2- 99,6)	77,3 (71,6- 82,4)	4,30	0,03	58,2	99,0
> 0,107	97,5 (91,2- 99,6)	77,7 (72,0- 82,8)	4,38	0,03	58,6	99,0
> 0,111	96,3 (89,4- 99,2)	77,7 (72,0- 82,8)	4,32	0,05	58,3	98,5
> 0,117	96,3 (89,4- 99,2)	78,1 (72,5- 83,1)	4,40	0,05	58,8	98,5

> 0,118	96,3 (89,4- 99,2)	78,9 (73,3- 83,9)	4,57	0,05	59,7	98,5
> 0,119	96,3 (89,4- 99,2)	79,8 (74,2- 84,6)	4,75	0,05	60,6	98,5
> 0,122	96,3 (89,4- 99,2)	80,2 (74,6- 84,9)	4,85	0,05	61,1	98,5
> 0,123	96,3 (89,4- 99,2)	80,6 (75,1- 85,3)	4,95	0,05	61,6	98,5
> 0,127	96,3 (89,4- 99,2)	81,0 (75,5- 85,7)	5,06	0,05	62,1	98,5
> 0,128	96,3 (89,4- 99,2)	81,4 (76,0- 86,0)	5,17	0,05	62,6	98,5
> 0,129	96,3 (89,4- 99,2)	82,2 (76,8- 86,7)	5,40	0,05	63,6	98,5
> 0,131	96,3 (89,4- 99,2)	82,6 (77,3- 87,1)	5,53	0,05	64,2	98,6
> 0,133	96,3 (89,4- 99,2)	83,0 (77,7- 87,5)	5,66	0,05	64,7	98,6
> 0,137	96,3 (89,4- 99,2)	83,4 (78,2- 87,8)	5,80	0,04	65,3	98,6
> 0,138	96,3 (89,4- 99,2)	83,8 (78,6- 88,2)	5,94	0,04	65,8	98,6
> 0,144	96,3 (89,4- 99,2)	84,6 (79,5- 88,9)	6,26	0,04	67,0	98,6
> 0,145	96,3 (89,4- 99,2)	85,0 (79,9- 89,2)	6,43	0,04	67,5	98,6
> 0,149	96,3 (89,4- 99,2)	85,8 (80,8- 89,9)	6,79	0,04	68,7	98,6
> 0,157	96,3 (89,4- 99,2)	86,2 (81,3- 90,3)	6,99	0,04	69,4	98,6
> 0,161	96,3 (89,4- 99,2)	86,6 (81,8- 90,6)	7,20	0,04	70,0	98,6
> 0,164	96,3 (89,4- 99,2)	87,0 (82,2- 91,0)	7,43	0,04	70,6	98,6
> 0,169	96,3 (89,4- 99,2)	87,4 (82,7- 91,3)	7,67	0,04	71,3	98,6
> 0,177 *	96,3 (89,4- 99,2)	87,9 (83,1- 91,7)	7,92	0,04	72,0	98,6
> 0,178	95,0 (87,7- 98,6)	87,9 (83,1- 91,7)	7,82	0,06	71,7	98,2
> 0,179	95,0 (87,7- 98,6)	88,3 (83,6- 92,0)	8,09	0,06	72,4	98,2
> 0,181	95,0 (87,7- 98,6)	88,7 (84,0- 92,3)	8,38	0,06	73,1	98,2
> 0,189	93,8 (86,0- 97,9)	88,7 (84,0- 92,3)	8,27	0,07	72,8	97,8
> 0,197	93,8 (86,0- 97,9)	89,5 (85,0- 93,0)	8,91	0,07	74,3	97,8
> 0,201	92,5 (84,4- 97,2)	89,5 (85,0- 93,0)	8,79	0,08	74,0	97,4
> 0,211	92,5 (84,4- 97,2)	89,9 (85,4- 93,3)	9,14	0,08	74,7	97,4
> 0,213	92,5 (84,4- 97,2)	90,3 (85,9- 93,7)	9,52	0,08	75,5	97,4
> 0,221	91,3 (82,8- 96,4)	90,3 (85,9- 93,7)	9,39	0,10	75,3	97,0

> 0,225	90,0 (81,2- 95,6)	90,3 (85,9- 93,7)	9,26	0,11	75,0	96,5
> 0,229	90,0 (81,2- 95,6)	90,7 (86,4- 94,0)	9,67	0,11	75,8	96,6
> 0,232	90,0 (81,2- 95,6)	91,1 (86,8- 94,3)	10,10	0,11	76,6	96,6
> 0,236	88,8 (79,7- 94,7)	91,5 (87,3- 94,7)	10,44	0,12	77,2	96,2
> 0,252	87,5 (78,2- 93,8)	91,5 (87,3- 94,7)	10,29	0,14	76,9	95,8
> 0,256	87,5 (78,2- 93,8)	91,9 (87,8- 95,0)	10,81	0,14	77,8	95,8
> 0,265	86,3 (76,7- 92,9)	91,9 (87,8- 95,0)	10,65	0,15	77,5	95,4
> 0,274	86,3 (76,7- 92,9)	92,3 (88,2- 95,3)	11,21	0,15	78,4	95,4
> 0,285	86,3 (76,7- 92,9)	92,7 (88,7- 95,6)	11,84	0,15	79,3	95,4
> 0,289	85,0 (75,3- 92,0)	92,7 (88,7- 95,6)	11,66	0,16	79,1	95,0
> 0,291	85,0 (75,3- 92,0)	93,1 (89,2- 95,9)	12,35	0,16	80,0	95,0
> 0,3	85,0 (75,3- 92,0)	93,5 (89,7- 96,3)	13,12	0,16	81,0	95,1
> 0,308	83,8 (73,8- 91,0)	93,9 (90,2- 96,6)	13,79	0,17	81,7	94,7
> 0,312	83,8 (73,8- 91,0)	94,3 (90,7- 96,9)	14,78	0,17	82,7	94,7
> 0,315	83,8 (73,8- 91,0)	94,7 (91,2- 97,2)	15,91	0,17	83,8	94,7
> 0,326	83,8 (73,8- 91,0)	95,1 (91,7- 97,5)	17,24	0,17	84,8	94,8
> 0,333	82,5 (72,4- 90,1)	95,1 (91,7- 97,5)	16,98	0,18	84,6	94,4
> 0,336	81,3 (71,0- 89,1)	95,1 (91,7- 97,5)	16,72	0,20	84,4	94,0
> 0,337	80,0 (69,6- 88,1)	95,1 (91,7- 97,5)	16,47	0,21	84,2	93,6
> 0,344	80,0 (69,6- 88,1)	95,5 (92,2- 97,8)	17,96	0,21	85,3	93,7
> 0,351	80,0 (69,6- 88,1)	96,0 (92,7- 98,0)	19,76	0,21	86,5	93,7
> 0,379	80,0 (69,6- 88,1)	96,4 (93,2- 98,3)	21,96	0,21	87,7	93,7
> 0,4	78,7 (68,2- 87,1)	96,4 (93,2- 98,3)	21,61	0,22	87,5	93,3
> 0,403	77,5 (66,8- 86,1)	96,4 (93,2- 98,3)	21,27	0,23	87,3	93,0
> 0,406	77,5 (66,8- 86,1)	96,8 (93,7- 98,6)	23,93	0,23	88,6	93,0
> 0,427	76,2 (65,4- 85,0)	96,8 (93,7- 98,6)	23,54	0,25	88,4	92,6
> 0,433	76,2 (65,4- 85,0)	97,2 (94,2- 98,8)	26,91	0,24	89,7	92,7
> 0,438	75,0 (64,1- 84,0)	97,2 (94,2- 98,8)	26,46	0,26	89,6	92,3

> 0,444	73,7 (62,7- 83,0)	97,2 (94,2- 98,8)	26,02	0,27	89,4	92,0
> 0,486	72,5 (61,4- 81,9)	97,2 (94,2- 98,8)	25,58	0,28	89,2	91,6
> 0,501	72,5 (61,4- 81,9)	97,6 (94,8- 99,1)	29,85	0,28	90,6	91,6
> 0,552	72,5 (61,4- 81,9)	98,0 (95,3- 99,3)	35,82	0,28	92,1	91,7
> 0,589	71,2 (60,0- 80,8)	98,0 (95,3- 99,3)	35,20	0,29	91,9	91,3
> 0,629	70,0 (58,7- 79,7)	98,0 (95,3- 99,3)	34,58	0,31	91,8	91,0
> 0,658	70,0 (58,7- 79,7)	98,4 (95,9- 99,5)	43,22	0,30	93,3	91,0
> 0,671	70,0 (58,7- 79,7)	98,8 (96,5- 99,7)	57,63	0,30	94,9	91,0
> 0,785	68,7 (57,4- 78,6)	98,8 (96,5- 99,7)	56,60	0,32	94,8	90,7
> 0,786	67,5 (56,1- 77,6)	98,8 (96,5- 99,7)	55,57	0,33	94,7	90,4
> 0,808	66,2 (54,8- 76,4)	98,8 (96,5- 99,7)	54,55	0,34	94,6	90,0
> 0,856	66,2 (54,8- 76,4)	99,2 (97,1- 99,9)	81,82	0,34	96,4	90,1
> 0,866	65,0 (53,5- 75,3)	99,2 (97,1- 99,9)	80,28	0,35	96,3	89,7
> 0,943	63,7 (52,2- 74,2)	99,2 (97,1- 99,9)	78,73	0,37	96,2	89,4
> 1,016	62,5 (51,0- 73,1)	99,2 (97,1- 99,9)	77,19	0,38	96,2	89,1
> 1,063	61,3 (49,7- 71,9)	99,2 (97,1- 99,9)	75,64	0,39	96,1	88,8
> 1,233	60,0 (48,4- 70,8)	99,2 (97,1- 99,9)	74,10	0,40	96,0	88,4
> 1,24	58,7 (47,2- 69,6)	99,2 (97,1- 99,9)	72,56	0,42	95,9	88,1
> 1,274	57,5 (45,9- 68,5)	99,2 (97,1- 99,9)	71,01	0,43	95,8	87,8
> 1,327	56,2 (44,7- 67,3)	99,2 (97,1- 99,9)	69,47	0,44	95,7	87,5
> 1,49	55,0 (43,5- 66,1)	99,2 (97,1- 99,9)	67,93	0,45	95,7	87,2
> 1,512	53,7 (42,2- 65,0)	99,2 (97,1- 99,9)	66,38	0,47	95,6	86,9
> 1,539	52,5 (41,0- 63,8)	99,2 (97,1- 99,9)	64,84	0,48	95,5	86,6
> 1,57	51,2 (39,8- 62,6)	99,2 (97,1- 99,9)	63,29	0,49	95,3	86,3
> 1,599	50,0 (38,6- 61,4)	99,2 (97,1- 99,9)	61,75	0,50	95,2	86,0
> 1,612	48,7 (37,4- 60,2)	99,2 (97,1- 99,9)	60,21	0,52	95,1	85,7
> 1,626	47,5 (36,2- 59,0)	99,2 (97,1- 99,9)	58,66	0,53	95,0	85,4
> 1,64	46,2 (35,0- 57,8)	99,2 (97,1- 99,9)	57,12	0,54	94,9	85,1

> 1,65	45,0 (33,9- 56,5)	99,2 (97,1- 99,9)	55,58	0,55	94,7	84,8
> 1,669	43,7 (32,7- 55,3)	99,2 (97,1- 99,9)	54,03	0,57	94,6	84,5
> 1,688	42,5 (31,5- 54,1)	99,2 (97,1- 99,9)	52,49	0,58	94,4	84,2
> 1,755	41,2 (30,4- 52,8)	99,2 (97,1- 99,9)	50,94	0,59	94,3	83,9
> 1,862	40,0 (29,2- 51,6)	99,2 (97,1- 99,9)	49,40	0,60	94,1	83,6
> 1,863	38,7 (28,1- 50,3)	99,2 (97,1- 99,9)	47,86	0,62	93,9	83,3
> 1,923	37,5 (26,9- 49,0)	99,2 (97,1- 99,9)	46,31	0,63	93,7	83,1
> 1,943	36,2 (25,8- 47,8)	99,2 (97,1- 99,9)	44,77	0,64	93,5	82,8
> 1,964	35,0 (24,7- 46,5)	99,2 (97,1- 99,9)	43,23	0,66	93,3	82,5
> 1,969	33,7 (23,6- 45,2)	99,2 (97,1- 99,9)	41,68	0,67	93,1	82,2
> 1,97	32,5 (22,4- 43,9)	99,2 (97,1- 99,9)	40,14	0,68	92,9	81,9
> 2,234	31,3 (21,4- 42,6)	99,2 (97,1- 99,9)	38,59	0,69	92,6	81,7
> 2,314	31,3 (21,4- 42,6)	99,6 (97,8- 99,9)	77,19	0,69	96,2	81,7
> 2,369	30,0 (20,3- 41,3)	99,6 (97,8- 99,9)	74,10	0,70	96,0	81,5
> 2,382	28,7 (19,2- 40,0)	99,6 (97,8- 99,9)	71,01	0,72	95,8	81,2
> 2,507	27,5 (18,1- 38,6)	99,6 (97,8- 99,9)	67,92	0,73	95,7	80,9
> 2,909	26,3 (17,0- 37,3)	99,6 (97,8- 99,9)	64,84	0,74	95,5	80,7
> 3,364	25,0 (16,0- 35,9)	99,6 (97,8- 99,9)	61,75	0,75	95,2	80,4
> 3,463	23,8 (15,0- 34,6)	99,6 (97,8- 99,9)	58,66	0,77	95,0	80,1
> 3,512	22,5 (13,9- 33,2)	99,6 (97,8- 99,9)	55,57	0,78	94,7	79,9
> 3,599	21,3 (12,9- 31,8)	99,6 (97,8- 99,9)	52,49	0,79	94,4	79,6
> 3,922	21,3 (12,9- 31,8)	100,0 (100,0-100,0)		0,79	100,0	79,7
> 4,671	20,0 (11,9- 30,4)	100,0 (100,0-100,0)		0,80	100,0	79,4
> 4,741	18,8 (10,9- 29,0)	100,0 (100,0-100,0)		0,81	100,0	79,2
> 5,217	17,5 (9,9- 27,6)	100,0 (100,0-100,0)		0,82	100,0	78,9
> 5,37	16,3 (9,0- 26,2)	100,0 (100,0-100,0)		0,84	100,0	78,7
> 5,769	15,0 (8,0- 24,7)	100,0 (100,0-100,0)		0,85	100,0	78,4
> 5,953	13,8 (7,1- 23,3)	100,0 (100,0-100,0)		0,86	100,0	78,2

> 6,078	12,5 (6,2- 21,8)	100,0 (100,0-100,0)	0,88	100,0	77,9
> 7,417	11,3 (5,3- 20,3)	100,0 (100,0-100,0)	0,89	100,0	77,7
> 7,896	10,0 (4,4- 18,8)	100,0 (100,0-100,0)	0,90	100,0	77,4
> 8,836	8,8 (3,6- 17,2)	100,0 (100,0-100,0)	0,91	100,0	77,2
> 11,786	7,5 (2,8- 15,6)	100,0 (100,0-100,0)	0,93	100,0	76,9
> 12,53	6,2 (2,1- 14,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,94	100,0	76,7
> 12,607	5,0 (1,4- 12,3)	100,0 (100,0-100,0)	0,95	100,0	76,5
> 12,662	3,7 (0,8- 10,6)	100,0 (100,0-100,0)	0,96	100,0	76,2
> 14,269	2,5 (0,4- 8,8)	100,0 (100,0-100,0)	0,98	100,0	76,0
> 15,739	1,3 (0,2- 6,8)	100,0 (100,0-100,0)	0,99	100,0	75,8
> 16,39	0,0 (0,0- 0,0)	100,0 (100,0-100,0)	1,00		75,5

Sens. = Sensitivity

Spec. = Specificity

+LR = Positive likelihood ratio

-LR = Negative likelihood ratio

+PV = Positive predictive value

-PV = Negative predictive value

ANEXO VIII. ANÁLISIS ROC BIO-RAD FRENTE A CRITERIO EORTC/MSG.

VARIABLE = BIORAD

POSITIVE GROUP = EORTC_MSG="P"

Sample size = 83

NEGATIVE GROUP = EORTC_MSG="N"

Sample size = 25

Disease prevalence (%) = 76,9

Area under the ROC curve = 0,957

Standard error = 0,018

95% Confidence interval = 0,899 to 0,986

Criterion	Sens. (95% C.I.)	Spec. (95% C.I.)	+LR	-LR	+PV	-PV
>=0,029	100,0 (100,0-100,0)	0,0 (0,0- 0,0)	1,00		76,9	
> 0,029	100,0 (100,0-100,0)	8,0 (1,2- 26,1)	1,09	0,00	78,3	100,0
> 0,031	97,6 (91,5- 99,6)	12,0 (2,7- 31,2)	1,11	0,20	78,6	60,0
> 0,034	97,6 (91,5- 99,6)	24,0 (9,4- 45,1)	1,28	0,10	81,0	75,0
> 0,036	97,6 (91,5- 99,6)	32,0 (15,0- 53,5)	1,44	0,08	82,7	80,0
> 0,04	96,4 (89,8- 99,2)	32,0 (15,0- 53,5)	1,42	0,11	82,5	72,7
> 0,042	95,2 (88,1- 98,6)	32,0 (15,0- 53,5)	1,40	0,15	82,3	66,7
> 0,043	95,2 (88,1- 98,6)	36,0 (18,0- 57,5)	1,49	0,13	83,2	69,2
> 0,045	95,2 (88,1- 98,6)	40,0 (21,2- 61,3)	1,59	0,12	84,0	71,4
> 0,046	95,2 (88,1- 98,6)	44,0 (24,4- 65,1)	1,70	0,11	84,9	73,3
> 0,05	95,2 (88,1- 98,6)	48,0 (27,8- 68,7)	1,83	0,10	85,9	75,0
> 0,051	95,2 (88,1- 98,6)	52,0 (31,3- 72,2)	1,98	0,09	86,8	76,5
> 0,055	95,2 (88,1- 98,6)	72,0 (50,6- 87,9)	3,40	0,07	91,9	81,8

> 0,061	95,2 (88,1- 98,6)	76,0 (54,9- 90,6)	3,97	0,06	92,9	82,6
> 0,063	95,2 (88,1- 98,6)	80,0 (59,3- 93,1)	4,76	0,06	94,0	83,3
> 0,064	95,2 (88,1- 98,6)	84,0 (63,9- 95,4)	5,95	0,06	95,2	84,0
> 0,065	95,2 (88,1- 98,6)	88,0 (68,8- 97,3)	7,93	0,05	96,3	84,6
> 0,073	94,0 (86,5- 98,0)	88,0 (68,8- 97,3)	7,83	0,07	96,3	81,5
> 0,074	94,0 (86,5- 98,0)	92,0 (73,9- 98,8)	11,75	0,07	97,5	82,1
> 0,092	92,8 (84,9- 97,3)	92,0 (73,9- 98,8)	11,60	0,08	97,5	79,3
> 0,099	91,6 (83,4- 96,5)	92,0 (73,9- 98,8)	11,45	0,09	97,4	76,7
> 0,113 *	91,6 (83,4- 96,5)	96,0 (79,6- 99,3)	22,89	0,09	98,7	77,4
> 0,151	90,4 (81,9- 95,7)	96,0 (79,6- 99,3)	22,59	0,10	98,7	75,0
> 0,172	89,2 (80,4- 94,9)	96,0 (79,6- 99,3)	22,29	0,11	98,7	72,7
> 0,175	88,0 (79,0- 94,1)	96,0 (79,6- 99,3)	21,99	0,13	98,6	70,6
> 0,177	86,7 (77,5- 93,2)	96,0 (79,6- 99,3)	21,69	0,14	98,6	68,6
> 0,182	86,7 (77,5- 93,2)	100,0 (100,0-100,0)		0,13	100,0	69,4
> 0,203	85,5 (76,1- 92,3)	100,0 (100,0-100,0)		0,14	100,0	67,6
> 0,227	84,3 (74,7- 91,4)	100,0 (100,0-100,0)		0,16	100,0	65,8
> 0,228	83,1 (73,3- 90,5)	100,0 (100,0-100,0)		0,17	100,0	64,1
> 0,24	81,9 (71,9- 89,5)	100,0 (100,0-100,0)		0,18	100,0	62,5
> 0,243	80,7 (70,6- 88,6)	100,0 (100,0-100,0)		0,19	100,0	61,0
> 0,246	79,5 (69,2- 87,6)	100,0 (100,0-100,0)		0,20	100,0	59,5
> 0,27	78,3 (67,9- 86,6)	100,0 (100,0-100,0)		0,22	100,0	58,1
> 0,28	77,1 (66,6- 85,6)	100,0 (100,0-100,0)		0,23	100,0	56,8
> 0,281	75,9 (65,3- 84,6)	100,0 (100,0-100,0)		0,24	100,0	55,6
> 0,286	74,7 (64,0- 83,6)	100,0 (100,0-100,0)		0,25	100,0	54,3
> 0,317	73,5 (62,7- 82,6)	100,0 (100,0-100,0)		0,27	100,0	53,2
> 0,32	72,3 (61,4- 81,6)	100,0 (100,0-100,0)		0,28	100,0	52,1
> 0,33	71,1 (60,1- 80,5)	100,0 (100,0-100,0)		0,29	100,0	51,0
> 0,341	69,9 (58,8- 79,5)	100,0 (100,0-100,0)		0,30	100,0	50,0

> 0,343	68,7 (57,6- 78,4)	100,0 (100,0-100,0)	0,31	100,0	49,0
> 0,352	67,5 (56,3- 77,3)	100,0 (100,0-100,0)	0,33	100,0	48,1
> 0,359	66,3 (55,0- 76,3)	100,0 (100,0-100,0)	0,34	100,0	47,2
> 0,383	65,1 (53,8- 75,2)	100,0 (100,0-100,0)	0,35	100,0	46,3
> 0,39	63,9 (52,6- 74,1)	100,0 (100,0-100,0)	0,36	100,0	45,5
> 0,43	62,7 (51,3- 73,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,37	100,0	44,6
> 0,46	61,4 (50,1- 71,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,39	100,0	43,9
> 0,48	60,2 (48,9- 70,8)	100,0 (100,0-100,0)	0,40	100,0	43,1
> 0,489	59,0 (47,7- 69,7)	100,0 (100,0-100,0)	0,41	100,0	42,4
> 0,497	57,8 (46,5- 68,6)	100,0 (100,0-100,0)	0,42	100,0	41,7
> 0,501	56,6 (45,3- 67,5)	100,0 (100,0-100,0)	0,43	100,0	41,0
> 0,531	55,4 (44,1- 66,3)	100,0 (100,0-100,0)	0,45	100,0	40,3
> 0,5447	54,2 (42,9- 65,2)	100,0 (100,0-100,0)	0,46	100,0	39,7
> 0,605	53,0 (41,7- 64,1)	100,0 (100,0-100,0)	0,47	100,0	39,1
> 0,61	51,8 (40,6- 62,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,48	100,0	38,5
> 0,616	50,6 (39,4- 61,8)	100,0 (100,0-100,0)	0,49	100,0	37,9
> 0,624	49,4 (38,2- 60,6)	100,0 (100,0-100,0)	0,51	100,0	37,3
> 0,647	48,2 (37,1- 59,4)	100,0 (100,0-100,0)	0,52	100,0	36,8
> 0,682	47,0 (35,9- 58,3)	100,0 (100,0-100,0)	0,53	100,0	36,2
> 0,694	45,8 (34,8- 57,1)	100,0 (100,0-100,0)	0,54	100,0	35,7
> 0,764	44,6 (33,7- 55,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,55	100,0	35,2
> 0,822	43,4 (32,5- 54,7)	100,0 (100,0-100,0)	0,57	100,0	34,7
> 0,859	42,2 (31,4- 53,5)	100,0 (100,0-100,0)	0,58	100,0	34,2
> 0,871	41,0 (30,3- 52,3)	100,0 (100,0-100,0)	0,59	100,0	33,8
> 0,88	39,8 (29,2- 51,1)	100,0 (100,0-100,0)	0,60	100,0	33,3
> 0,924	38,6 (28,1- 49,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,61	100,0	32,9
> 0,949	37,3 (27,0- 48,7)	100,0 (100,0-100,0)	0,63	100,0	32,5
> 0,96	36,1 (25,9- 47,4)	100,0 (100,0-100,0)	0,64	100,0	32,1

> 0,967	34,9 (24,8- 46,2)	100,0 (100,0-100,0)	0,65	100,0	31,6
> 1,032	33,7 (23,7- 45,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,66	100,0	31,2
> 1,063	32,5 (22,7- 43,7)	100,0 (100,0-100,0)	0,67	100,0	30,9
> 1,173	31,3 (21,6- 42,4)	100,0 (100,0-100,0)	0,69	100,0	30,5
> 1,202	30,1 (20,5- 41,2)	100,0 (100,0-100,0)	0,70	100,0	30,1
> 1,23	28,9 (19,5- 39,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,71	100,0	29,8
> 1,28	27,7 (18,4- 38,6)	100,0 (100,0-100,0)	0,72	100,0	29,4
> 1,296	26,5 (17,4- 37,3)	100,0 (100,0-100,0)	0,73	100,0	29,1
> 1,317	25,3 (16,4- 36,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,75	100,0	28,7
> 1,364	24,1 (15,4- 34,7)	100,0 (100,0-100,0)	0,76	100,0	28,4
> 1,422	22,9 (14,4- 33,4)	100,0 (100,0-100,0)	0,77	100,0	28,1
> 1,57	21,7 (13,4- 32,1)	100,0 (100,0-100,0)	0,78	100,0	27,8
> 1,582	20,5 (12,4- 30,8)	100,0 (100,0-100,0)	0,80	100,0	27,5
> 1,733	19,3 (11,4- 29,4)	100,0 (100,0-100,0)	0,81	100,0	27,2
> 1,879	18,1 (10,5- 28,1)	100,0 (100,0-100,0)	0,82	100,0	26,9
> 2,2	16,9 (9,5- 26,7)	100,0 (100,0-100,0)	0,83	100,0	26,6
> 2,242	15,7 (8,6- 25,3)	100,0 (100,0-100,0)	0,84	100,0	26,3
> 2,57	13,3 (6,8- 22,5)	100,0 (100,0-100,0)	0,87	100,0	25,8
> 2,678	12,0 (5,9- 21,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,88	100,0	25,5
> 2,947	10,8 (5,1- 19,6)	100,0 (100,0-100,0)	0,89	100,0	25,3
> 2,963	9,6 (4,3- 18,1)	100,0 (100,0-100,0)	0,90	100,0	25,0
> 3,426	8,4 (3,5- 16,6)	100,0 (100,0-100,0)	0,92	100,0	24,8
> 3,5	7,2 (2,7- 15,1)	100,0 (100,0-100,0)	0,93	100,0	24,5
> 3,88	6,0 (2,0- 13,5)	100,0 (100,0-100,0)	0,94	100,0	24,3
> 4,444	4,8 (1,4- 11,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,95	100,0	24,0
> 5,07	3,6 (0,8- 10,2)	100,0 (100,0-100,0)	0,96	100,0	23,8
> 5,11	2,4 (0,4- 8,5)	100,0 (100,0-100,0)	0,98	100,0	23,6
> 5,74	1,2 (0,2- 6,6)	100,0 (100,0-100,0)	0,99	100,0	23,4

> 5,849 0,0 (0,0- 0,0) 100,0 (100,0-100,0) 1,00 23,1

Sens. = Sensitivity

Spec. = Specificity

+LR = Positive likelihood ratio

-LR = Negative likelihood ratio

+PV = Positive predictive value

-PV = Negative predictive value

ANEXO IX. ANÁLISIS ROC VIRCLIA FRENTE A CRITERIO EORTC/MSG.

VARIABLE = VIRCLIA

POSITIVE GROUP = EORTC_MSG="P"

Sample size = 95

NEGATIVE GROUP = EORTC_MSG="N"

Sample size = 25

Disease prevalence (%) = 79,2

Area under the ROC curve = 0,968

Standard error = 0,014

95% Confidence interval = 0,918 to 0,991

Criterion	Sens. (95% C.I.)	Spec. (95% C.I.)	+LR	-LR	+PV	-PV
>=0,027	100,0 (100,0-100,0)	0,0 (0,0- 0,0)	1,00		79,2	
> 0,027	98,9 (94,3- 99,8)	0,0 (0,0- 0,0)	0,99		79,0	0,0
> 0,028	98,9 (94,3- 99,8)	4,0 (0,7- 20,4)	1,03	0,26	79,7	50,0
> 0,032	98,9 (94,3- 99,8)	16,0 (4,6- 36,1)	1,18	0,07	81,7	80,0
> 0,033	98,9 (94,3- 99,8)	20,0 (6,9- 40,7)	1,24	0,05	82,5	83,3
> 0,034	98,9 (94,3- 99,8)	28,0 (12,1- 49,4)	1,37	0,04	83,9	87,5
> 0,035	98,9 (94,3- 99,8)	36,0 (18,0- 57,5)	1,55	0,03	85,5	90,0
> 0,042	98,9 (94,3- 99,8)	44,0 (24,4- 65,1)	1,77	0,02	87,0	91,7
> 0,046	98,9 (94,3- 99,8)	48,0 (27,8- 68,7)	1,90	0,02	87,9	92,3
> 0,05	98,9 (94,3- 99,8)	52,0 (31,3- 72,2)	2,06	0,02	88,7	92,9
> 0,06	98,9 (94,3- 99,8)	56,0 (34,9- 75,6)	2,25	0,02	89,5	93,3
> 0,061	98,9 (94,3- 99,8)	60,0 (38,7- 78,8)	2,47	0,02	90,4	93,7
> 0,063	97,9 (92,6- 99,7)	60,0 (38,7- 78,8)	2,45	0,04	90,3	88,2

> 0,067	96,8 (91,0- 99,3)	60,0 (38,7- 78,8)	2,42	0,05	90,2	83,3
> 0,069	95,8 (89,6- 98,8)	60,0 (38,7- 78,8)	2,39	0,07	90,1	78,9
> 0,07	94,7 (88,1- 98,2)	60,0 (38,7- 78,8)	2,37	0,09	90,0	75,0
> 0,072	94,7 (88,1- 98,2)	64,0 (42,5- 82,0)	2,63	0,08	90,9	76,2
> 0,075	94,7 (88,1- 98,2)	68,0 (46,5- 85,0)	2,96	0,08	91,8	77,3
> 0,076	94,7 (88,1- 98,2)	72,0 (50,6- 87,9)	3,38	0,07	92,8	78,3
> 0,077	94,7 (88,1- 98,2)	76,0 (54,9- 90,6)	3,95	0,07	93,7	79,2
> 0,079	94,7 (88,1- 98,2)	80,0 (59,3- 93,1)	4,74	0,07	94,7	80,0
> 0,08	94,7 (88,1- 98,2)	84,0 (63,9- 95,4)	5,92	0,06	95,7	80,8
> 0,085	93,7 (86,8- 97,6)	84,0 (63,9- 95,4)	5,86	0,08	95,7	77,8
> 0,089	93,7 (86,8- 97,6)	88,0 (68,8- 97,3)	7,81	0,07	96,7	78,6
> 0,097	93,7 (86,8- 97,6)	92,0 (73,9- 98,8)	11,71	0,07	97,8	79,3
> 0,099	92,6 (85,4- 97,0)	92,0 (73,9- 98,8)	11,58	0,08	97,8	76,7
> 0,104	91,6 (84,1- 96,3)	92,0 (73,9- 98,8)	11,45	0,09	97,8	74,2
> 0,105 *	91,6 (84,1- 96,3)	96,0 (79,6- 99,3)	22,89	0,09	98,9	75,0
> 0,106	90,5 (82,8- 95,6)	96,0 (79,6- 99,3)	22,63	0,10	98,9	72,7
> 0,111	89,5 (81,5- 94,8)	96,0 (79,6- 99,3)	22,37	0,11	98,8	70,6
> 0,118	88,4 (80,2- 94,1)	96,0 (79,6- 99,3)	22,11	0,12	98,8	68,6
> 0,119	87,4 (79,0- 93,3)	100,0 (100,0-100,0)		0,13	100,0	67,6
> 0,128	86,3 (77,7- 92,5)	100,0 (100,0-100,0)		0,14	100,0	65,8
> 0,131	85,3 (76,5- 91,7)	100,0 (100,0-100,0)		0,15	100,0	64,1
> 0,138	84,2 (75,3- 90,9)	100,0 (100,0-100,0)		0,16	100,0	62,5
> 0,144	82,1 (72,9- 89,2)	100,0 (100,0-100,0)		0,18	100,0	59,5
> 0,149	81,1 (71,7- 88,4)	100,0 (100,0-100,0)		0,19	100,0	58,1
> 0,169	80,0 (70,5- 87,5)	100,0 (100,0-100,0)		0,20	100,0	56,8
> 0,178	78,9 (69,4- 86,6)	100,0 (100,0-100,0)		0,21	100,0	55,6
> 0,189	77,9 (68,2- 85,8)	100,0 (100,0-100,0)		0,22	100,0	54,3
> 0,197	75,8 (65,9- 84,0)	100,0 (100,0-100,0)		0,24	100,0	52,1

> 0,213	74,7 (64,8- 83,1)	100,0 (100,0-100,0)	0,25	100,0	51,0
> 0,221	73,7 (63,6- 82,2)	100,0 (100,0-100,0)	0,26	100,0	50,0
> 0,225	72,6 (62,5- 81,3)	100,0 (100,0-100,0)	0,27	100,0	49,0
> 0,236	71,6 (61,4- 80,4)	100,0 (100,0-100,0)	0,28	100,0	48,1
> 0,252	70,5 (60,3- 79,4)	100,0 (100,0-100,0)	0,29	100,0	47,2
> 0,265	69,5 (59,2- 78,5)	100,0 (100,0-100,0)	0,31	100,0	46,3
> 0,285	68,4 (58,1- 77,6)	100,0 (100,0-100,0)	0,32	100,0	45,5
> 0,289	67,4 (57,0- 76,6)	100,0 (100,0-100,0)	0,33	100,0	44,6
> 0,291	66,3 (55,9- 75,7)	100,0 (100,0-100,0)	0,34	100,0	43,9
> 0,308	65,3 (54,8- 74,7)	100,0 (100,0-100,0)	0,35	100,0	43,1
> 0,315	64,2 (53,7- 73,8)	100,0 (100,0-100,0)	0,36	100,0	42,4
> 0,336	63,2 (52,6- 72,8)	100,0 (100,0-100,0)	0,37	100,0	41,7
> 0,337	62,1 (51,6- 71,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,38	100,0	41,0
> 0,344	61,1 (50,5- 70,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,39	100,0	40,3
> 0,379	60,0 (49,4- 69,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,40	100,0	39,7
> 0,4	58,9 (48,4- 68,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,41	100,0	39,1
> 0,403	57,9 (47,3- 68,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,42	100,0	38,5
> 0,406	56,8 (46,3- 67,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,43	100,0	37,9
> 0,433	55,8 (45,2- 66,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,44	100,0	37,3
> 0,438	54,7 (44,2- 65,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,45	100,0	36,8
> 0,444	53,7 (43,2- 64,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,46	100,0	36,2
> 0,486	52,6 (42,1- 63,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,47	100,0	35,7
> 0,501	51,6 (41,1- 62,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,48	100,0	35,2
> 0,552	50,5 (40,1- 60,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,49	100,0	34,7
> 0,629	49,5 (39,1- 59,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,51	100,0	34,2
> 0,658	48,4 (38,0- 58,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,52	100,0	33,8
> 0,671	47,4 (37,0- 57,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,53	100,0	33,3
> 0,785	46,3 (36,0- 56,8)	100,0 (100,0-100,0)	0,54	100,0	32,9

> 0,808	45,3 (35,0- 55,8)	100,0 (100,0-100,0)	0,55	100,0	32,5
> 0,856	44,2 (34,0- 54,8)	100,0 (100,0-100,0)	0,56	100,0	32,1
> 0,943	43,2 (33,0- 53,7)	100,0 (100,0-100,0)	0,57	100,0	31,6
> 1,016	42,1 (32,0- 52,7)	100,0 (100,0-100,0)	0,58	100,0	31,2
> 1,063	41,1 (31,1- 51,6)	100,0 (100,0-100,0)	0,59	100,0	30,9
> 1,233	40,0 (30,1- 50,6)	100,0 (100,0-100,0)	0,60	100,0	30,5
> 1,274	38,9 (29,1- 49,5)	100,0 (100,0-100,0)	0,61	100,0	30,1
> 1,327	37,9 (28,1- 48,4)	100,0 (100,0-100,0)	0,62	100,0	29,8
> 1,49	36,8 (27,2- 47,4)	100,0 (100,0-100,0)	0,63	100,0	29,4
> 1,512	35,8 (26,2- 46,3)	100,0 (100,0-100,0)	0,64	100,0	29,1
> 1,57	34,7 (25,3- 45,2)	100,0 (100,0-100,0)	0,65	100,0	28,7
> 1,599	33,7 (24,3- 44,1)	100,0 (100,0-100,0)	0,66	100,0	28,4
> 1,626	32,6 (23,4- 43,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,67	100,0	28,1
> 1,65	31,6 (22,4- 41,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,68	100,0	27,8
> 1,669	30,5 (21,5- 40,8)	100,0 (100,0-100,0)	0,69	100,0	27,5
> 1,755	29,5 (20,6- 39,7)	100,0 (100,0-100,0)	0,71	100,0	27,2
> 1,862	28,4 (19,6- 38,6)	100,0 (100,0-100,0)	0,72	100,0	26,9
> 1,863	27,4 (18,7- 37,5)	100,0 (100,0-100,0)	0,73	100,0	26,6
> 1,943	26,3 (17,8- 36,4)	100,0 (100,0-100,0)	0,74	100,0	26,3
> 1,964	25,3 (16,9- 35,2)	100,0 (100,0-100,0)	0,75	100,0	26,0
> 1,969	24,2 (16,0- 34,1)	100,0 (100,0-100,0)	0,76	100,0	25,8
> 2,234	23,2 (15,1- 32,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,77	100,0	25,5
> 2,314	22,1 (14,2- 31,8)	100,0 (100,0-100,0)	0,78	100,0	25,3
> 2,369	21,1 (13,4- 30,6)	100,0 (100,0-100,0)	0,79	100,0	25,0
> 2,382	20,0 (12,5- 29,5)	100,0 (100,0-100,0)	0,80	100,0	24,8
> 2,507	18,9 (11,6- 28,3)	100,0 (100,0-100,0)	0,81	100,0	24,5
> 2,909	17,9 (10,8- 27,1)	100,0 (100,0-100,0)	0,82	100,0	24,3
> 3,463	16,8 (9,9- 25,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,83	100,0	24,0

> 3,512	15,8 (9,1- 24,7)	100,0 (100,0-100,0)	0,84	100,0	23,8
> 3,922	14,7 (8,3- 23,5)	100,0 (100,0-100,0)	0,85	100,0	23,6
> 4,741	13,7 (7,5- 22,3)	100,0 (100,0-100,0)	0,86	100,0	23,4
> 5,217	12,6 (6,7- 21,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,87	100,0	23,1
> 5,769	11,6 (5,9- 19,8)	100,0 (100,0-100,0)	0,88	100,0	22,9
> 5,953	10,5 (5,2- 18,5)	100,0 (100,0-100,0)	0,89	100,0	22,7
> 6,078	9,5 (4,4- 17,2)	100,0 (100,0-100,0)	0,91	100,0	22,5
> 7,896	8,4 (3,7- 15,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,92	100,0	22,3
> 8,836	7,4 (3,0- 14,6)	100,0 (100,0-100,0)	0,93	100,0	22,1
> 11,786	6,3 (2,4- 13,2)	100,0 (100,0-100,0)	0,94	100,0	21,9
> 12,53	5,3 (1,8- 11,9)	100,0 (100,0-100,0)	0,95	100,0	21,7
> 12,607	4,2 (1,2- 10,4)	100,0 (100,0-100,0)	0,96	100,0	21,6
> 12,662	3,2 (0,7- 9,0)	100,0 (100,0-100,0)	0,97	100,0	21,4
> 14,269	2,1 (0,3- 7,4)	100,0 (100,0-100,0)	0,98	100,0	21,2
> 15,739	1,1 (0,2- 5,7)	100,0 (100,0-100,0)	0,99	100,0	21,0
> 16,39	0,0 (0,0- 0,0)	100,0 (100,0-100,0)	1,00		20,8

Sens. = Sensitivity

Spec. = Specificity

+LR = Positive likelihood ratio

-LR = Negative likelihood ratio

+PV = Positive predictive value

-PV = Negative predictive value

ANEXO X. REPETITIVIDAD Y REPRODUCIBILIDAD.

Calibrador:

Día	Instrumento 1			Instrumento 2			Promedio diario	Instrumento 1	Instrumento 2	(Promedio Instrumento 1 – Promedio Instrumento 2) ²
	Resultado 1	Resultado 2	Promedio	Resultado 1	Resultado 2	Promedio		(Resultado 1-Resultado 2) ²	(Resultado 1-Resultado 2) ²	
1	4,12	4,25	4,19	5,04	5,42	5,23	4,71	0,02	0,14	1,08
2	4,60	4,27	4,43	5,21	5,02	5,12	4,77	0,11	0,04	0,47
3	4,79	4,60	4,70	4,98	5,42	5,20	4,95	0,04	0,19	0,25
4	5,30	4,76	5,03	5,10	4,88	4,99	5,01	0,29	0,05	0,00
5	5,49	5,53	5,51	5,52	5,07	5,30	5,40	0,00	0,20	0,05
6	5,09	3,86	4,47	4,95	5,00	4,97	4,72	1,53	0,00	0,25
7	5,20	4,36	4,78	5,13	5,32	5,23	5,00	0,71	0,04	0,20
8	4,66	4,30	4,48	5,31	5,28	5,30	4,89	0,12	0,00	0,67
9	4,95	4,10	4,53	5,22	5,41	5,32	4,92	0,72	0,04	0,63
10	4,71	4,87	4,79	4,98	5,09	5,04	4,91	0,03	0,01	0,06
11	5,66	4,74	5,20	4,82	5,37	5,10	5,15	0,84	0,30	0,01
12	5,71	4,79	5,25	5,27	4,86	5,06	5,16	0,86	0,17	0,03
13	4,62	4,33	4,48	5,01	5,26	5,14	4,81	0,09	0,06	0,44
14	4,41	4,47	4,44	5,31	5,00	5,16	4,80	0,00	0,10	0,51
15	4,00	4,90	4,45	4,60	4,67	4,64	4,54	0,81	0,01	0,03
16	4,34	4,74	4,54	5,02	4,91	4,97	4,75	0,16	0,01	0,18
17	5,22	4,24	4,73	5,23	4,80	5,01	4,87	0,97	0,19	0,08
18	4,69	5,66	5,17	4,95	5,32	5,14	5,15	0,94	0,14	0,00
19	5,69	5,10	5,39	5,21	4,37	4,79	5,09	0,35	0,71	0,36
20	4,78	5,14	4,96	5,51	5,13	5,32	5,14	0,13	0,14	0,13
							4,94	8,72	2,55	5,44
							Promedio global	Suma (1)	Suma (2)	Suma (3)

Muestra negativa:

Día	Instrumento 1			Instrumento 2			Promedio diario	Instrumento 1	Instrumento 2	(Promedio Instrumento 1 – Promedio Instrumento 2) ²
	Resultado 1	Resultado 2	Promedio	Resultado 1	Resultado 2	Promedio		(Resultado 1-Resultado 2) ²	(Resultado 1-Resultado 2) ²	
1	0,18	0,22	0,20	0,55	0,57	0,56	0,38	0,00	0,00	0,13
2	0,30	0,40	0,35	0,60	0,56	0,58	0,47	0,01	0,00	0,05
3	0,33	0,51	0,42	0,52	0,60	0,56	0,49	0,03	0,01	0,02
4	0,41	0,51	0,46	0,50	0,53	0,51	0,49	0,01	0,00	0,00
5	0,48	0,40	0,44	0,61	0,58	0,59	0,52	0,01	0,00	0,02
6	0,36	0,41	0,39	0,54	0,50	0,52	0,46	0,00	0,00	0,02
7	0,50	0,47	0,49	0,56	0,51	0,53	0,51	0,00	0,00	0,00
8	0,49	0,44	0,47	0,55	0,45	0,50	0,48	0,00	0,01	0,00
9	0,54	0,51	0,52	0,60	0,52	0,56	0,54	0,00	0,01	0,00
10	0,48	0,37	0,43	0,51	0,50	0,51	0,47	0,01	0,00	0,01
11	0,51	0,41	0,46	0,49	0,48	0,48	0,47	0,01	0,00	0,00
12	0,77	0,53	0,65	0,59	0,49	0,54	0,59	0,06	0,01	0,01
13	0,35	0,41	0,38	0,51	0,49	0,50	0,44	0,00	0,00	0,01
14	0,51	0,50	0,51	0,49	0,50	0,50	0,50	0,00	0,00	0,00
15	0,47	0,38	0,42	0,47	0,50	0,49	0,45	0,01	0,00	0,00
16	0,31	0,41	0,36	0,50	0,47	0,49	0,42	0,01	0,00	0,02
17	0,60	0,51	0,56	0,49	0,58	0,53	0,55	0,01	0,01	0,00
18	0,45	0,48	0,47	0,57	0,46	0,52	0,49	0,00	0,01	0,00
19	0,44	0,54	0,49	0,49	0,53	0,51	0,50	0,01	0,00	0,00
20	0,37	0,50	0,44	0,51	0,42	0,46	0,45	0,02	0,01	0,00
							0,48	0,20	0,07	0,31
							Promedio global	Suma (1)	Suma (2)	Suma (3)

Muestra positiva:

Día	Instrumento 1			Instrumento 2			Promedio diario	Instrumento 1	Instrumento 2	(Promedio Instrumento 1 – Promedio Instrumento 2) ²
	Resultado 1	Resultado 2	Promedio	Resultado 1	Resultado 2	Promedio		(Resultado 1-Resultado 2) ²	(Resultado 1-Resultado 2) ²	
1	8,21	8,19	8,20	8,23	9,69	8,96	8,58	0,00	2,14	0,58
2	8,27	8,80	8,53	9,55	9,20	9,38	8,95	0,28	0,12	0,72
3	8,93	9,23	9,08	9,35	8,98	9,17	9,13	0,09	0,13	0,01
4	8,75	9,34	9,04	8,96	9,29	9,12	9,08	0,35	0,11	0,01
5	8,99	8,75	8,87	9,87	9,58	9,73	9,30	0,06	0,08	0,73
6	9,74	9,07	9,41	8,90	9,31	9,11	9,26	0,45	0,17	0,09
7	8,41	9,71	9,06	9,24	9,07	9,16	9,11	1,69	0,03	0,01
8	9,71	9,33	9,52	8,79	9,11	8,95	9,24	0,14	0,11	0,33
9	8,30	9,74	9,02	9,56	9,41	9,49	9,25	2,09	0,02	0,22
10	9,56	9,67	9,62	9,25	9,51	9,38	9,50	0,01	0,07	0,05
11	9,17	9,26	9,22	8,46	8,74	8,60	8,91	0,01	0,08	0,38
12	8,31	8,27	8,29	8,98	8,22	8,60	8,44	0,00	0,58	0,10
13	9,71	8,76	9,23	9,44	9,35	9,39	9,31	0,89	0,01	0,03
14	9,07	9,14	9,10	8,99	9,03	9,01	9,06	0,01	0,00	0,01
15	9,44	9,97	9,71	9,13	8,83	8,98	9,35	0,28	0,09	0,52
16	8,70	9,71	9,21	9,55	9,17	9,36	9,28	1,02	0,14	0,02
17	9,14	9,41	9,28	9,32	9,74	9,53	9,40	0,07	0,18	0,07
18	9,78	8,64	9,21	8,64	9,28	8,96	9,08	1,30	0,41	0,06
19	8,67	8,24	8,45	8,93	9,31	9,12	8,79	0,18	0,14	0,44
20	8,31	8,90	8,61	9,99	9,00	9,49	9,05	0,34	0,96	0,79
							9,10	9,27	5,58	5,16
							Promedio global	Suma (1)	Suma (2)	Suma (3)

Control negativo:

Día	Instrumento 1			Instrumento 2			Promedio diario	Instrumento 1	Instrumento 2	(Promedio Instrumento 1 – Promedio Instrumento 2) ²
	Resultado 1	Resultado 2	Promedio	Resultado 1	Resultado 2	Promedio		(Resultado 1-Resultado 2) ²	(Resultado 1-Resultado 2) ²	
1	0,10	0,08	0,09	0,30	0,32	0,31	0,20	0,00	0,00	0,05
2	0,17	0,20	0,18	0,28	0,30	0,29	0,24	0,00	0,00	0,01
3	0,20	0,20	0,20	0,30	0,29	0,29	0,25	0,00	0,00	0,01
4	0,20	0,20	0,20	0,30	0,26	0,28	0,24	0,00	0,00	0,01
5	0,16	0,21	0,19	0,31	0,35	0,33	0,26	0,00	0,00	0,02
6	0,19	0,20	0,19	0,31	0,28	0,30	0,24	0,00	0,00	0,01
7	0,20	0,19	0,19	0,32	0,31	0,32	0,26	0,00	0,00	0,01
8	0,20	0,17	0,18	0,29	0,30	0,30	0,24	0,00	0,00	0,01
9	0,23	0,18	0,21	0,35	0,30	0,33	0,27	0,00	0,00	0,01
10	0,20	0,20	0,20	0,24	0,25	0,25	0,22	0,00	0,00	0,00
11	0,20	0,20	0,20	0,13	0,13	0,13	0,17	0,00	0,00	0,00
12	0,18	0,27	0,23	0,26	0,27	0,27	0,25	0,01	0,00	0,00
13	0,13	0,12	0,12	0,16	0,19	0,18	0,15	0,00	0,00	0,00
14	0,18	0,17	0,18	0,20	0,18	0,19	0,18	0,00	0,00	0,00
15	0,16	0,20	0,18	0,17	0,20	0,19	0,18	0,00	0,00	0,00
16	0,21	0,20	0,21	0,20	0,21	0,21	0,21	0,00	0,00	0,00
17	0,18	0,20	0,19	0,19	0,20	0,19	0,19	0,00	0,00	0,00
18	0,35	0,16	0,26	0,21	0,16	0,19	0,22	0,04	0,00	0,01
19	0,25	0,20	0,23	0,13	0,20	0,16	0,20	0,00	0,01	0,00
20	0,19	0,25	0,22	0,21	0,23	0,22	0,22	0,00	0,00	0,00
							0,22	0,06	0,02	0,17
							Promedio global	Suma (1)	Suma (2)	Suma (3)

ANEXO XI. REACTIVIDAD CRUZADA DEBIDO A OTRAS INFECCIONES.

Nº	Muestra	Especificidad	Valor obtenido	Método	Interpretación
			(RLU)		
1	A-20-039	Mycoplasma	2,06	VirClia	P
		Galactomanano	0,041	VirClia	N
2	A-07-057	Mycoplasma	2,17	VirClia	P
		Galactomanano	0,028	VirClia	N
3	A-10-026	Mycoplasma	2,29	VirClia	P
		Galactomanano	0,028	VirClia	N
4	A-05-044	Mycoplasma	1,84	VirClia	P
		Galactomanano	0,019	VirClia	N
5	A-07-098	Mycoplasma	2,87	VirClia	P
		Galactomanano	0,033	VirClia	N
6	A-06-077	Mycoplasma	1,32	VirClia	P
		Galactomanano	0,019	VirClia	N
7	A-08-058	Mycoplasma	3,62	VirClia	P
		Galactomanano	0,02	VirClia	N
8	A-25-034	Mycoplasma	1,49	VirClia	P
		Galactomanano	0,023	VirClia	N
9	A-44-082	Mycoplasma	1,71	VirClia	P
		Galactomanano	0,034	VirClia	N
10	A-44-080	Mycoplasma	1,1	VirClia	P
		Galactomanano	0,028	VirClia	N
11	A-39-084	Mycoplasma	1,93	VirClia	P
		Galactomanano	0,031	VirClia	N
12	A-40-060	Mycoplasma	0,95	VirClia	D
		Galactomanano	0,031	VirClia	N
13	A-42-062	Mycoplasma	1,78	VirClia	P
		Galactomanano	0,071	VirClia	N
14	A-39-001	Mycoplasma	2,1	VirClia	P
		Galactomanano	0,041	VirClia	N
15	A-50-016	Mycoplasma	4,41	VirClia	P
		Galactomanano	0,063	VirClia	N
16	A-02-171	Toxoplasma	3,8	VirClia	P
		Galactomanano	0,028	VirClia	N
17	A-20-040	Toxoplasma	7,48	VirClia	P
		Galactomanano	0,045	VirClia	N
18	A-20-031	Toxoplasma	8,05	VirClia	P
		Galactomanano	0,032	VirClia	N
19	A-17-071	Toxoplasma	1,52	VirClia	P
		Galactomanano	0,04	VirClia	N
20	A-02-196	Toxoplasma	3,74	VirClia	P
		Galactomanano	0,041	VirClia	N
21	A-13-086	Toxoplasma	3,07	VirClia	P
		Galactomanano	0,04	VirClia	N
22	A-16-086	Toxoplasma	3,45	VirClia	P
		Galactomanano	0,034	VirClia	N

Nº	Muestra	Especificidad	Valor obtenido	Método	Interpretación
			(RLU)		
23	A-20-017	Toxoplasma	3,11	VirClia	P
		Galactomanano	0,033	VirClia	N
24	A-39-088	Toxoplasma	3,91	VirClia	P
		Galactomanano	0,031	VirClia	N
25	A-38-096	Toxoplasma	0,92	VirClia	D
		Galactomanano	0,037	VirClia	N
26	A-38-094	Toxoplasma	4,25	VirClia	P
		Galactomanano	0,024	VirClia	N
27	A-08-092	Toxoplasma	0,95	VirClia	P
		Galactomanano	0,029	VirClia	N
28	A-39-004	Toxoplasma	1,24	VirClia	P
		Galactomanano	0,033	VirClia	N
29	A-42-087	Toxoplasma	1,25	VirClia	P
		Galactomanano	0,03	VirClia	N
30	A-40-098	Toxoplasma	1,02	VirClia	P
		Galactomanano	0,04	VirClia	N
31	A-43-096	Toxoplasma	2,14	VirClia	P
		Galactomanano	0,031	VirClia	N
32	A-42-090	Toxoplasma	1,88	VirClia	P
		Galactomanano	0,054	VirClia	N
33	A-01-089	Cytomegalovirus	1,51	VirClia	P
		Galactomanano	0,02	VirClia	N
34	A-07-024	Cytomegalovirus	4,25	VirClia	P
		Galactomanano	0,039	VirClia	N
35	A-09-026	Cytomegalovirus	6,49	VirClia	P
		Galactomanano	0,034	VirClia	N
36	A-14-087	Cytomegalovirus	3,6	VirClia	P
		Galactomanano	0,037	VirClia	N
37	A-18-002	Cytomegalovirus	2,74	VirClia	P
		Galactomanano	0,04	VirClia	N
38	A-17-064	Cytomegalovirus	4,25	VirClia	P
		Galactomanano	0,042	VirClia	N
39	A-38-093	Cytomegalovirus	2,66	VirClia	P
		Galactomanano	0,022	VirClia	N
40	A-01-088	Cytomegalovirus	3,52	VirClia	P
		Galactomanano	0,018	VirClia	N
41	R-003-065	Cytomegalovirus	1,95	VirClia	P
		Galactomanano	0,036	VirClia	N
42	A-46-028	Cytomegalovirus	1,42	VirClia	P
		Galactomanano	0,036	VirClia	N
43	A-39-003	Cytomegalovirus	1,17	VirClia	P
		Galactomanano	0,025	VirClia	N
44	A-39-085	Cytomegalovirus	4,48	VirClia	P
		Galactomanano	0,04	VirClia	N
45	A-39-006	Cytomegalovirus	1,14	VirClia	P

Nº	Muestra	Especificidad	Valor obtenido	Método	Interpretación
			(RLU)		
		Galactomanano	0,032	VirClia	N
46	A-44-056	Cytomegalovirus	4,14	VirClia	P
		Galactomanano	0,718	VirClia	P
47	A-02-010	Rubella	3,74	VirClia	P
		Galactomanano	0,016	VirClia	N
48	A-02-027	Rubella	2,05	VirClia	P
		Galactomanano	0,032	VirClia	N
49	A-02-032	Rubella	3,71	VirClia	P
		Galactomanano	0,055	VirClia	N
50	A-02-108	Rubella	2,15	VirClia	P
		Galactomanano	0,018	VirClia	N
51	A-02-109	Rubella	5,01	VirClia	P
		Galactomanano	0,026	VirClia	N
52	A-02-110	Rubella	2,82	VirClia	P
		Galactomanano	0,031	VirClia	N
53	A-02-111	Rubella	1,32	VirClia	P
		Galactomanano	0,024	VirClia	N
54	A-02-112	Rubella	3,18	VirClia	P
		Galactomanano	0,022	VirClia	N
55	A-82-047	Rubella	4,07	VirClia	P
		Galactomanano	0,059	VirClia	N
56	A-82-049	Rubella	1,9	VirClia	P
		Galactomanano	0,031	VirClia	N
57	A-82-048	Rubella	4,55	VirClia	P
		Galactomanano	0,03	VirClia	N
58	A-82-051	Rubella	3,52	VirClia	P
		Galactomanano	0,033	VirClia	N
59	A-82-050	Rubella	4,58	VirClia	P
		Galactomanano	0,038	VirClia	N
60	A-03-034	Sífilis	2,29	VirClia	P
		Galactomanano	0,029	VirClia	N
61	A-03-084	Sífilis	2,98	VirClia	P
		Galactomanano	0,028	VirClia	N
62	A-03-087	Sífilis	1,34	VirClia	P
		Galactomanano	0,029	VirClia	N
63	A-03-095	Sífilis	4,6	VirClia	P
		Galactomanano	0,022	VirClia	N
64	A-03-097	Sífilis	3,39	VirClia	P
		Galactomanano	0,025	VirClia	N
65	A-04-027	Sífilis	1,55	VirClia	P
		Galactomanano	0,029	VirClia	N
66	A-04-029	Sífilis	3,67	VirClia	P
		Galactomanano	0,028	VirClia	N
67	A-37-041	Sífilis	2,22	VirClia	P
		Galactomanano	0,045	VirClia	N

Nº	Muestra	Especificidad	Valor obtenido	Método	Interpretación
			(RLU)		
68	A-72-039	Sífilis	3,27	VirClia	P
		Galactomanano	0,024	VirClia	N
69	A-31-079	Sífilis	1,15	VirClia	P
		Galactomanano	0,025	VirClia	N
70	A-72-040	Sífilis	1,87	VirClia	P
		Galactomanano	0,029	VirClia	N
71	A-72-036	Sífilis	2,58	VirClia	P
		Galactomanano	0,032	VirClia	N
72	A-29-085	Sífilis	1,24	VirClia	P
		Galactomanano	0,032	VirClia	N
73	A-72-037	Sífilis	2,95	VirClia	P
		Galactomanano	0,03	VirClia	N
74	A-72-038	Sífilis	1,36	VirClia	P
		Galactomanano	0,033	VirClia	N
75	R-337-060	Hepatitis C	-	BIOMNIS	P
		Galactomanano	0,018	VirClia	N
76	R-337-062	Hepatitis C	-	BIOMNIS	P
		Galactomanano	0,026	VirClia	N
77	R-337-078	Hepatitis C	-	BIOMNIS	P
		Galactomanano	0,035	VirClia	N
78	R-337-087	Hepatitis C	-	BIOMNIS	P
		Galactomanano	0,022	VirClia	N
79	R-338-019	Hepatitis C	-	BIOMNIS	P
		Galactomanano	0,023	VirClia	N
80	R-338-020	Hepatitis C	-	BIOMNIS	P
		Galactomanano	0,03	VirClia	N
81	R-338-021	Hepatitis C	-	BIOMNIS	P
		Galactomanano	0,014	VirClia	N
82	R-338-023	Hepatitis C	-	BIOMNIS	P
		Galactomanano	0,043	VirClia	N
83	R-338-026	Hepatitis C	-	BIOMNIS	P
		Galactomanano	0,018	VirClia	N
84	R-215-100	Rheumatoid factor	RHEUMAJET 3+↑	AGLUTINACIÓN	P
		Galactomanano	0,02	VirClia	N
85	R-216-002	Rheumatoid factor	RHEUMAJET 3+↑	AGLUTINACIÓN	P
		Galactomanano	0,024	VirClia	N
86	R-216-003	Rheumatoid factor	RHEUMAJET 3+↑	AGLUTINACIÓN	P
		Galactomanano	0,029	VirClia	N
87	R-216-005	Rheumatoid factor	RHEUMAJET 3+↑	AGLUTINACIÓN	P
		Galactomanano	0,026	VirClia	N
88	R-216-006	Rheumatoid factor	RHEUMAJET 3+↑	AGLUTINACIÓN	P
		Galactomanano	0,039	VirClia	N
89	R-216-010	Rheumatoid factor	RHEUMAJET 3+↑	AGLUTINACIÓN	P
		Galactomanano	0,03	VirClia	N
90	R-216-011	Rheumatoid factor	RHEUMAJET 3+↑	AGLUTINACIÓN	P

Nº	Muestra	Especificidad	Valor obtenido	Método	Interpretación
			(RLU)		
		Galactomanano	0,034	VirClia	N
91	R-216-012	Rheumatoid factor	RHEUMAJET 3+↑	AGLUTINACIÓN	P
		Galactomanano	0,052	VirClia	N
92	A-68-010	Hepatitis E	18,61	VirClia	P
		Galactomanano	0,02	VirClia	N
93	A-79-030	Hepatitis E	8,59	VirClia	P
		Galactomanano	0,033	VirClia	N
94	A-79-031	Hepatitis E	3,61	VirClia	P
		Galactomanano	0,029	VirClia	N
95	A-79-032	Hepatitis E	3,97	VirClia	P
		Galactomanano	0,029	VirClia	N
96	A-79-033	Hepatitis E	1,42	VirClia	P
		Galactomanano	0,024	VirClia	N
97	A-79-034	Hepatitis E	4,49	VirClia	P
		Galactomanano	0,03	VirClia	N
98	A-67-025	Hepatitis E	7,02	VirClia	P
		Galactomanano	0,022	VirClia	N
99	A-79-035	Hepatitis E	2,15	VirClia	P
		Galactomanano	0,033	VirClia	N
100	R-312-038	ANA	-	BIOMNIS	P
		Galactomanano	0,035	VirClia	N
101	R-312-039	ANA	-	BIOMNIS	P
		Galactomanano	0,072	VirClia	N
102	R-312-040	ANA	-	BIOMNIS	P
		Galactomanano	0,109	VirClia	N
103	R-312-041	ANA	-	BIOMNIS	P
		Galactomanano	0,038	VirClia	N
104	R-312-042	ANA	-	BIOMNIS	P
		Galactomanano	0,107	VirClia	N

ANEXO XII. INTERFERENCIAS ENDÓGENAS.

Muestra positiva:

	Control (sin aditivo)	6 g/l Bilirrubina	8,5 g/l Hemoglobina	5,8 g/l Colesterol	5,5 g/l Tributirina	60g/l γ -globulina	60g/l Albúmina
Réplica 1 (RLU)	15,36	15,72	12,87	12,48	16,65	16,04	14,79
Réplica 2 (RLU)	14,19	15,16	13,00	12,98	16,78	15,43	14,12
Réplica 3 (RLU)	14,38	14,95	11,28	12,97	16,16	14,63	13,74
Promedio (RLU)	14,65	15,28	12,38	12,81	16,53	15,37	14,22

Muestra cut off:

	Control (sin aditivo)	6 g/l Bilirrubina	8,5 g/l Hemoglobina	5,8 g/l Colesterol	5,5 g/l Tributirina	60g/l γ -globulina	60g/l Albúmina
Réplica 1 (RLU)	4,87	4,72	4,16	3,53	4,00	3,63	3,85
Réplica 2 (RLU)	3,64	4,58	4,79	2,96	3,58	3,30	3,44
Réplica 3 (RLU)	3,56	4,77	4,13	3,28	3,41	4,19	3,43
Promedio (RLU)	4,02	4,69	4,36	3,25	3,66	3,71	3,57

Muestra negativa:

	Control (sin aditivo)	6 g/l Bilirrubina	8,5 g/l Hemoglobina	5,8 g/l Colesterol	5,5 g/l Tributirina	60g/l γ -globulina	60g/l Albúmina
Réplica 1 (RLU)	0,05	0,07	0,16	0,07	0,05	0,24	0,08
Réplica 2 (RLU)	0,04	0,06	0,14	0,06	0,05	0,24	0,09
Réplica 3 (RLU)	0,04	0,06	0,17	0,06	0,06	0,23	0,07
Promedio (RLU)	0,04	0,06	0,16	0,06	0,05	0,24	0,08

