

## DETECCIÓN DE OCRATOXINA A EN HIGOS SECOS UTILIZANDO EL ANTICUERPO MAPI Y UNA TÉCNICA DE ELISA COMPETITIVO

Miguel Ángel Pavón Moreno<sup>1</sup>, Ruth Blanco Rojo<sup>1</sup>, Isabel González Alonso<sup>1</sup>.

Tutores: Teresa García Lacarra<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> del Rosario Martín de Santos.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria, UCM.

### INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por numerosas especies de mohos, principalmente pertenecientes a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium*. Actualmente se conocen más de 300 micotoxinas, entre las que se incluyen las aflatoxinas, esterigmatocistina, ocratoxinas, tricotecenos, fumonisinas, zearalenona, citrinina, patulina y otras muchas, aumentando su número a medida que se analizan otras especies de mohos y se perfeccionan las técnicas de detección. Aunque la toxicidad aguda y subaguda de algunas micotoxinas es bien conocida, preocupan más los efectos de su ingestión a largo plazo, puesto que las pequeñas cantidades ingeridas con los alimentos de forma continuada se acumulan en el organismo pudiendo producir, en algunos casos, efectos mutagénicos y cancerígenos (Martín y col., 1990).

Las ocratoxinas son un grupo de micotoxinas producidas principalmente por los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* sobre diferentes sustratos. Existen varios tipos de ocratoxinas de las cuales la ocratoxina A (OTA) es la más tóxica. La ocratoxina A se encuentra en diversos alimentos como carne y productos cárnicos, chocolate, frutas, cereales, aceite de oliva, alimentos infantiles y productos fermentados como el vino y la cerveza. Químicamente es N-[(5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirano-7-il)carbonil]-L-fenilalanina, una dihidrocomarina clorada unida a través de un grupo carboxilo por una unión amida a una molécula de L-β-fenilalanina (Figura 1). Otros tipos de ocratoxinas son la ocratoxina B (OTB), derivado no clorado de la OTA y menos tóxica, ocratoxina C (OTC), éster de la OTA, con un excaso potencial tóxico, ocratoxina α (OTα) y ocratoxina β (OTβ), productos de la hidrólisis de la OTA y OTB, respectivamente, que no poseen la molécula de fenilalanina y no se consideran tóxicos (EFSA 2006).

En los últimos años, las ocratoxinas y en particular la ocratoxina A, han recibido una especial atención, debido a su elevado poder toxicológico. La ocratoxina A, que tiene un marcado carácter nefrotóxico, se ha relacionado con enfermedades graves, como la “nefropatía endémica de los Balcanes” o tumores en el tracto urinario en personas y la “nefropatía espontánea porcina” o la “nefropatía aviar” en los animales. Además, los estudios realizados con animales y en líneas celulares humanas han puesto de manifiesto sus propiedades carcinogénicas, genotóxicas, inmunotóxicas y teratogénicas. Por ello, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer ha incluido la ocratoxina A dentro de la categoría 2B, para indicar que la evaluación de las pruebas disponibles permite suponer que se trata de un agente posiblemente cancerígeno para el hombre (IARC, 1993).

Para controlar la presencia de OTA en materias primas vegetales y productos transformados, es necesario disponer de técnicas adecuadas. El método más frecuentemente empleado para la detección y cuantificación de ocratoxina A en alimentos y piensos consiste en la purificación a través de una columna de afinidad, seguida del análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección fluorimétrica. Las técnicas cromatográficas han demostrado ser sensibles y específicas para la detección y cuantificación de ocratoxina A. Sin embargo, presentan el inconveniente de resultar laboriosas y caras, por lo que no resultan apropiadas cuando se tiene que analizar un número elevado de muestras. En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas para la detección y cuantificación rápida de micotoxinas basadas en la utilización de anticuerpos, entre ellas las que emplean inmunosensores, inmunifluorescencia, inmunocromatografía y las técnicas inmunoenzimáticas ELISA. Estas últimas presentan las ventajas, frente a otros métodos analíticos, de ser sensibles, específicas, rápidas y sencillas de realizar.

El desarrollo de técnicas ELISA puede emplear diferentes tipos de anticuerpos principalmente policlonales o monoclonales. Los policlonales se obtienen directamente por inmunización de animales de experimentación, mientras que el desarrollo de tecnología de obtención de hibridomas permite la obtención de clones de células híbridas entre linfocitos (productores del anticuerpo de interés) y células tumorales que producen de forma continua e ilimitada, anticuerpos monoclonales de actividad biológica conocida y especificidad constante. Estas cualidades son especialmente convenientes para el desarrollo de kits comerciales, evitando la variabilidad entre lotes.

En este contexto, los objetivos de este trabajo han consistido en la producción de anticuerpos monoclonales frente a OTA y su utilización en el desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) para la detección y cuantificación de la presencia de ocratoxina A en higos secos.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### Obtención de anticuerpos monoclonales frente a OTA

Utilizando el método de conjugación mediante EDC ([1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimide Hydrochloride] (PIERCE Biotechnology, Rockford, Estados Unidos) se prepararon conjugados de ocratoxina A con hemocianina de *Megathura crenulata* (KLH), seroalbúmina bovina (BSA) y peroxidasa de rábano (HRP). Una vez realizados los conjugados de ocratoxina A se inmunizaron dos lotes de 4 ratones Balb/c (hembras de 8 semanas de edad). Uno de los lotes se inmunizó con el conjugado OTA-BSA y el otro con OTA-KLH. Para ello tras comprobar la ausencia de anticuerpos frente a OTA en el suero de los ratones, se inocularon por vía subcutánea a cada ratón 0,1 mg del conjugado correspondiente, emulsionado con adyuvante completo de Freund. A intervalos regulares de 4 semanas se administraron por vía intraperitoneal dosis de recuerdo con el mismo inmunógeno, emulsionado con adyuvante incompleto de Freund. Periódicamente se comprobó mediante un ELISA indirecto el grado de inmunización de los ratones y la especificidad de los anticuerpos obtenidos. Los ratones seleccionados para la fusión celular recibieron una última dosis del antígeno y cuatro días después se sacrificaron bajo anestesia.

Se realizaron 3 fusiones celulares, dos de ellas con ratones inmunizados con el conjugado OTA-KLH y una con el ratón que alcanzó mayor título de anticuerpos frente al conjugado OTA-BSA. Los linfocitos del bazo de los ratones seleccionados se fusionaron con células tumorales de mieloma de ratón en presencia de polietilenglicol, siguiendo esencialmente el método descrito por Köller y Milstein (1975). Las placas de fusión con los hibridomas se incubaron a 37 °C con atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> en medio selectivo HAT-CDMEM (GIBCO, Paisley, Reino Unido) durante dos semanas. A los quince días de la fusión celular se evaluó la existencia de hibridomas productores de anticuerpos frente a OTA mediante el análisis de los sobrenadantes de cultivo por técnicas de ELISA indirecto y directo.

En la técnica de ELISA indirecto, los pocillos de una placa de poliestireno se sensibilizaron con 100  $\mu$ L de un conjugado de OTA con una proteína distinta de la empleada en la inmunización, disuelto en tampón carbonato-bicarbonato (pH 9,6). A continuación, tras lavar los pocillos con tampón PBST (0,14 M NaCl; 0,0015 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,081 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ; 0,0027 M KCl; pH 7,2 y 1% Tween 20), se añadieron 50  $\mu$ L del sobrenadante a analizar y 50  $\mu$ L de tampón PBST y se incubaron las placas durante 1h a 37°C. Tras lavar nuevamente los pocillos se añadieron 100  $\mu$ L de un conjugado de anti-inmunoglobulinas de ratón con peroxidasa de rábano (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca) diluido 1/1000 en tampón PBST. Las placas se incubaron durante 1h a 37°C y se lavaron cuidadosamente con agua destilada. A continuación se añadieron 100  $\mu$ L de una solución de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Roche, Indianapolis, Estados Unidos) a cada pocillo. Después de 15 min de incubación, la reacción se paró con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M y se midió la absorbancia de los pocillos a 450 nm en un lector espectrofotométrico de placas de ELISA. Para la técnica de ELISA directo, los pocillos de una placa de poliestireno se sensibilizaron con 100  $\mu$ L de un anticuerpo comercial anti-inmunoglobulinas de ratón (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca), diluido 1/100 en tampón carbonato-bicarbonato (pH 9,6). Después de lavar los pocillos con tampón PBST, se añadieron 50  $\mu$ L del sobrenadante a analizar y 50  $\mu$ L de tampón PBST y se incubaron las placas durante 1h a 37°C. Tras lavar nuevamente los pocillos se añadieron 100  $\mu$ L del conjugado de OTA con peroxidasa de rábano (OTA-HRP) diluido 1/250 en tampón PBST. Las placas se incubaron durante 1h a 37°C y se lavaron cuidadosamente con agua destilada. A continuación se añadieron 100  $\mu$ L de TMB a cada pocillo. Después de 15 min de incubación, la reacción se paró con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M y se midió la absorbancia de los pocillos a 450 nm.

Los hibridomas seleccionados se clonaron por dilución límite, se expandieron a frascos de cultivo y se congelaron a -85°C en suero bovino fetal con dimetil-sulfóxido para su conservación. El isotipado de los anticuerpos producidos por los hibridomas de interés se determinó utilizando el Kit "Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents" (Sigma, Missouri, Estados Unidos).

Determinación del potencial de los anticuerpos monoclonales obtenidos para detectar y cuantificar mediante técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) la presencia de ocratoxina A en higos secos

La evaluación de los anticuerpos monoclonales obtenidos para detectar y cuantificar la presencia de OTA en muestras problema se realizó mediante la técnica de ELISA competitivo directo. El ELISA competitivo directo se diferencia del ELISA directo en que se añaden conjuntamente al pocillo el conjugado OTA-HRP y concentraciones conocidas de OTA libre, compitiendo ambas moléculas, ligada y libre, por unirse a los anticuerpos monoclonales inmovilizados en el pocillo. En consecuencia, la presencia de OTA en la muestra produce una inhibición de la respuesta, que será proporcional a la concentración de la micotoxina libre.

#### Extracción de Ocratoxina A a partir de muestras de higos secos

La extracción de OTA se realizó a partir de 100 g de producto según el método descrito por Senyuva y col. (2005). Una vez homogeneizada la muestra con un volumen igual de agua destilada, se utilizaron 40 g para la extracción con metanol y bicarbonato sódico y el resto se congeló a -20°C para posteriores determinaciones. El extracto obtenido se filtró, se diluyó en tampón PBS y se purificó por columnas de inmunoafinidad Neocolum for Ochratoxin, (Neogen, Auchincruive, Reino Unido). La determinación de la ocratoxina en los extractos se analizó mediante ELISA competitivo directo.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La ocratoxina A es una molécula de bajo peso molecular (403,8Da), que no es inmunógena por sí misma. Por ello para conseguir la inducción de una respuesta inmunitaria en los animales de experimentación, es preciso conjugarla previamente con una molécula portadora que tenga una estructura y tamaño adecuados. Teniendo en cuenta la estructura molecular de la ocratoxina A (Figura 1), se consideró que la reactividad del grupo carboxilo de la micotoxina podría resultar adecuada para la conjugación de esta molécula con los grupos amino primarios presentes en las proteínas portadoras. En consecuencia, se seleccionó el método de conjugación mediante EDC (Grabareck y Gergely, 1990) para unir la ocratoxina a BSA, KLH Y HRP.

Para la obtención de anticuerpos monoclonales frente a OTA se realizaron tres fusiones celulares, dos con ratones inmunizados frente a OTA-KLH y una con un ratón inmunizado frente a OTA-BSA. Utilizando técnicas de ELISA indirecto y ELISA directo, se analizaron 500-600 clones de cada fusión, obteniéndose una media de 10 hibridomas positivos frente a OTA en cada una de ellas. Todos los hibridomas que resultaron positivos

frente a OTA producían IgG. De los hibridomas obtenidos se seleccionó el anticuerpo monoclonal MAP1 mediante ELISA competitivo directo, debido a que con este anticuerpo la presencia de OTA libre consiguió desplazar a la conjugada con peroxidasa de rábano, obteniéndose un 50% de inhibición de la reacción ( $ID_{50}$ ) con una concentración de ocratoxina de 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Figura 2). En consecuencia, este anticuerpo monoclonal se consideró adecuado para el desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas con el fin de evaluar la presencia de OTA en higos secos. En el caso de otros hibridomas evaluados, la ocratoxina libre no consiguió desplazar satisfactoriamente a la OTA-HRP en su unión al anticuerpo a las concentraciones analizadas (0,15-5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). El límite de detección de la técnica de ELISA competitivo directo fue aproximadamente de 0,5  $\mu\text{g}$  de OTA/kg.

El análisis de 25 muestras de higos secos adquiridas en establecimientos minoristas de la comunidad de Madrid, puso de manifiesto que en 3 de las 25 muestras analizadas (12%) la concentración de OTA era superior a la máxima permitida en la UE para uvas pasas (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Los resultados obtenidos permiten concluir que la técnica de ELISA desarrollada, utilizando el anticuerpo monoclonal MAP1, construye un método de cribado adecuado para el análisis de un elevado número de muestras en programas de control de OTA en higos secos.

## **AGRADECIMIENTOS**

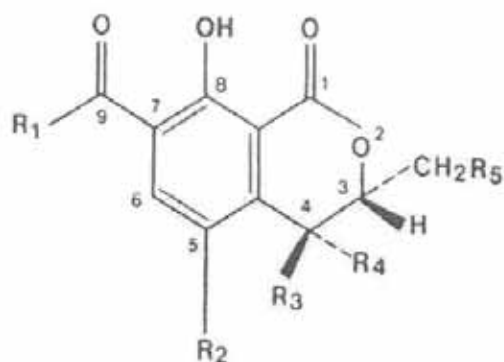
Este trabajo ha sido financiado por el Banco Santander/UCM (proyecto PR27/05-13995) y por la Dirección General de Universidades de la Comunidad de Madrid (Programa de Vigilancia Sanitaria S-0505/AGR/000265). Miguel Ángel Pavón disfruta una Beca Predoctoral del Ministerio de Educación y Ciencia y Ruth Blanco una Beca de Colaboración del mismo ministerio.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- EFSA (European Food Safety Authority) (2006). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a Request from the Commission related to ochratoxin A in food. Adopted on 4 April 2006. **The EFSA Journal**, 365: 1-56.

- GRABAREK, Z. y GERGELY, J. (1990). Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. **Analytical Biochemistry**, 185: 131-135.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1993). Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans; Vol. 56: Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Lyon, Francia, pags. 489-521.
- KÖHLER, G. y MILSTEIN, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, 266: 495-497.
- MARTÍN, R., HERNÁNDEZ, P.E. Y SANZ, B. (1990). Intoxicaciones alimentarias de origen fúngico: Micotoxicosis. **Revista de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos**, 30:315-332.
- SENYUVA, H.Z., GILBERT, J., OZCAN, S. y ULKEN, U. (2005). Survey for co-occurrence of ochratoxin A and Aflatoxin B<sub>1</sub> in dried figs in Turkey by using a single laboratory-validated alkaline extraction method for ochratoxin A. **Journal of Food Protection**, 68(7): 1512-1512

Figura 1: Estructura química de las ocratoxinas.



| R1                       | R2 | R3 | R4 | R5 |                     |
|--------------------------|----|----|----|----|---------------------|
| Fenilalanina             | Cl | H  | H  | H  | Ocratoxina A        |
| Fenilalanina             | H  | H  | H  | H  | Ocratoxina B        |
| Fenilalanina, etil éster | Cl | H  | H  | H  | Ocratoxina C        |
| OH                       | Cl | H  | H  | H  | Ocratoxina $\alpha$ |
| OH                       | H  | H  | H  | H  | Ocratoxina $\beta$  |



Figura 2: Curva de calibración para la detección de ocratoxina, utilizando el anticuerpo monoclonal MAP1 y un ELISA competitivo directo

