



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

Departamento de Biotecnología

Selección y caracterización de anticuerpos recombinantes para fungicidas. Aplicación al desarrollo de técnicas inmunoanalíticas.

TESIS
que para optar al Grado de Doctor en Biotecnología presenta
EMMA PLANA ANDANI



Valencia
2010

D. *Ángel Montoya Baidés*, director

D. *Juan José Manclús Ciscar*, investigador

del Grupo de Inmunotecnología, Instituto Interuniversitario de Investigación en Bioingeniería y Tecnología Orientada al Ser Humano (I3BH), Universidad Politécnica de Valencia.

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada **Selección y caracterización de anticuerpos recombinantes para fungicidas. Aplicación al desarrollo de técnicas inmunoanalíticas**, ha sido realizada bajo su dirección, en el Grupo de Inmunotecnología, por la Licenciada en Bioquímica Dña. *Emma Plana Andani*.

Y para que conste a los efectos legales oportunos, se extiende la presente certificación en Valencia, a 5 de Mayo de 2010.

Fdo:

Fdo:

D. *Ángel Montoya Baidés*

D. *Juan José Manclús Ciscar*

A David y a mi familia

“La ciencia se compone de errores, que a su vez, son los pasos hacia la verdad”

Julio Verne

“En todas las cosas humanas, cuando se examinan de cerca, se demuestra que no pueden apartarse los obstáculos sin que de ellos surjan otros”

Nicolás Maquiavelo

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este trabajo de investigación quiero mostrar mi agradecimiento a todas las personas, sin las cuales, su realización no hubiera sido posible.

En primer lugar, quiero dar las gracias a Ángel y a Juanjo por haberme dado esta oportunidad, porque de ella y de ellos he aprendido mucho. Gracias por confiar en mí y por haberme hecho sentir cómoda desde el principio, no sólo en lo que al trabajo se refiere.

A todos mis compañeros, a los que han pasado más o menos fugazmente por el laboratorio y a los que todavía siguen en él. Porque son muchas las horas que se pasan entre esas cuatro paredes y es un privilegio poder hacerlo en buena compañía. En especial, a Fede por estar siempre dispuesto a echar una mano haciendo así que el trabajo se vuelva más fácil. Y, por supuesto, a Maria José, por todo lo que me ha enseñado, por haber trabajado conmigo durante una parte de esta tesis y por responder, siempre pacientemente, a mis innumerables preguntas.

Me gustaría agradecerle a José María Carrasco haber aceptado ejercer como tutor al comienzo de esta tesis y a Ismael Rodrigo haber tomado su relevo en esta última etapa.

No puedo olvidarme de darle las gracias a mi familia. A mis padres, porque les debo mi educación y porque siempre me han empujado a seguir adelante, aunque a veces no se lo haya puesto del todo fácil. A mis hermanos, por “aguantarme” o “soportarme” como hacen los hermanos y que, en mi caso, no es poco. A David, por su infinita paciencia, por darme su apoyo durante todo este tiempo y por compartir conmigo tantas cosas.

También quiero darle las gracias a todos los que, de algún modo u otro, se han interesado, o al menos lo han intentado, por mi trabajo. Por darme la oportunidad de compartir, aunque sólo sea por un momento, mis motivaciones o mis frustraciones.

Finalmente, quisiera dejar constancia de que la realización de este estudio ha sido posible gracias a la concesión de una beca predoctoral por parte de la *Conselleria d'Educació de la Generalitat Valenciana*.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.	1
I. INTRODUCCIÓN.	5
1. PLAGUICIDAS.	7
2. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS.	10
2.1. Métodos cromatográficos.	10
2.2. Métodos inmunológicos.	11
3. ELISA DE PLAGUICIDAS: CONCEPTOS BÁSICOS.	14
3.1. Haptenos y conjugados.	14
3.2. Formatos de ELISA.	15
3.3. Heterología.	16
4. LOS ANTICUERPOS: HERRAMIENTAS INMUNOANALÍTICAS.	18
4.1. Estructura del anticuerpo.	19
4.2. Estructura del anticuerpo recombinante.	20
5. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES.	22
5.1. Construcción de bibliotecas de anticuerpos recombinantes.	24
5.1.1. Obtención de mRNA.	25
5.1.2. Síntesis de la primera cadena de cDNA.	26
5.1.3. Amplificación de las cadenas variables V_H y V_L	27
5.1.4. Formación de fragmentos scFv mediante ensamblaje de las cadenas variables V_H y V_L	27
5.1.5. Clonación del fragmento recombinante y transformación.	28
5.2. Selección de anticuerpos recombinantes mediante su expresión en la superficie de fagos (phage display).	29
5.2.1. El fago M13.	29
5.2.1.1. El genoma del fago.	30
5.2.1.2. Estructura del fago filamentoso.	31
5.2.1.3. Ciclo infectivo del fago filamentoso.	32
5.2.2. Expresión de proteínas foráneas en la superficie de fagos filamentosos.	34
5.2.2.1. Tipos de vectores.	34
5.2.3. Enriquecimiento de bibliotecas: <i>biopanning</i>	38
5.2.4. Análisis de fagos recombinantes.	41
5.3. Expresión de anticuerpos recombinantes.	42
6. APLICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS RECOMBINANTES AL ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS.	44

7.FUNGICIDAS AZÓLICOS.	47
7.1. Generalidades.	47
7.2. Tetraconazol, hexaconazol e imazalil.	49
8.DETERMINACIÓN DE FUNGICIDAS AZÓLICOS.	54
8.1. Determinación de fungicidas azólicos mediante técnicas cromatográficas.	54
8.2. Determinación de fungicidas azólicos mediante ELISA.	56
9.OBJETIVOS.	57
II. MATERIALES Y MÉTODOS.	59
1.REACTIVOS E INSTRUMENTOS.	61
2.PREPARACIÓN DE CONJUGADOS Y OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.	64
3.OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES.	66
3.1. Construcción de bibliotecas de AcRbs a partir de hibridomas.	68
3.1.1. Extracción de mRNA y síntesis de cDNA.	68
3.1.1.1. Precipitación de mRNA con etanol.	68
3.1.2. Síntesis de la cadena ligera y la cadena pesada.	69
3.1.3. Construcción del fragmento de anticuerpo recombinante scFv.	69
3.1.4. Clonación del fragmento scFv en el vector pAK100.	70
3.1.4.1. Precipitación de DNA con etanol.	70
3.1.4.2. Preparación de células electrocompetentes.	71
3.1.4.3. Transformación de células electrocompetentes.	71
3.2. Construcción de bibliotecas de AcRbs a partir de linfocitos.	72
3.2.1. Extracción de mRNA y síntesis de cDNA.	72
3.2.2. Síntesis de la cadena ligera y la cadena pesada.	73
3.2.3. Construcción y clonación del fragmento scFv.	73
3.3. Detección de clones positivos mediante ELISA de fagos.	74
3.3.1. Recuperación de fagos.	74
3.3.2. ELISA de fagos.	75
3.4. Detección de clones positivos mediante ELISA de fracción soluble.	75
3.5. Enriquecimiento de bibliotecas (<i>panning</i>).	76
3.5.1. Producción de fagos recombinantes.	76
3.5.2. Enriquecimiento de bibliotecas utilizando placas de ELISA como soporte sólido.	76
3.5.3. Enriquecimiento de bibliotecas utilizando partículas magnéticas como soporte sólido.	77
3.5.3.1. Inmovilización covalente de los conjugados a las partículas magnéticas.	77
3.5.3.2. Selección de fagos por elución específica.	77

3.6. Producción de fragmentos solubles de AcRb.	78
3.6.1. Producción de fragmentos solubles como proteínas de fusión scFv-pIII.	78
3.6.2. Producción de fragmentos solubles como proteínas libres scFv.....	79
3.6.2.1. Preparación de células competentes mediante CaCl ₂	79
3.6.2.2. Transformación de células competentes.	80
3.7. Determinación de la secuencia de los fragmentos scFv.	80
4. INMUNOENSAYOS (ELISA).	81
4.1. Preparación de las disoluciones estándar.	81
4.2. Condiciones generales de los inmunoensayos.....	82
4.2.1. ELISA con anticuerpos monoclonales.....	82
4.2.2. ELISA con anticuerpos recombinantes.....	83
4.2.3. Determinación de las condiciones óptimas de los inmunoensayos....	85
5. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS INMUNOENSAYOS.....	87
5.1. Parámetros de las curvas competitivas estándar.....	87
5.2. Estimación de la reactividad cruzada.	88
6. ANÁLISIS DE ZUMOS.	89
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	91
1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES A PARTIR DE HIBRIDOMAS.	93
1.1. Construcción de bibliotecas.....	93
1.2. Estudio del método de cribado y selección de clones positivos.	96
1.3. Enriquecimiento de las bibliotecas mediante <i>panning</i>	98
2. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES A PARTIR DE LINFOCITOS DE RATONES INMUNIZADOS.....	100
2.1. Construcción de bibliotecas.....	100
2.2. Enriquecimiento de las bibliotecas mediante el proceso de <i>panning</i>	108
2.2.1. Enriquecimiento de la biblioteca de tetraconazol: <i>panning</i> en pocillos de placa ELISA.	108
2.2.2. Estudio de diferentes condiciones de <i>panning</i>	110
2.2.3. Enriquecimiento de la biblioteca de hexaconazol mediante el proceso de <i>panning</i> en soporte de partículas magnéticas.	114
2.2.4. Enriquecimiento de la biblioteca de imazalil mediante el proceso de <i>panning</i> en soporte de partículas magnéticas.....	116
3. EXPRESIÓN DE FRAGMENTOS SOLUBLES scFv Y PROTEÍNAS DE FUSIÓN scFv-pIII.	117

4. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS ANTICUERPOS RECOMBINANTES FRENTE A TETRACONAZOL.	119
5. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE LOS INMUNOENSAYOS.	122
5.1. Inmunoensayos con anticuerpos monoclonales.	122
5.1.1. Determinación de las concentraciones óptimas de los inmunorreactivos.	122
5.1.2. Influencia del detergente.	124
5.1.3. Influencia de la fuerza iónica.	126
5.1.4. Influencia del pH.	129
5.1.5. Tolerancia a disolventes orgánicos.	132
5.2. Inmunoensayos con anticuerpos recombinantes.	135
6. COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LOS ANTICUERPOS RECOMBINANTES Y DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.	139
6.1. Parámetros analíticos del ensayo.	139
6.2. Estudio de la especificidad de los inmunoensayos.	144
6.3. Recapitulación.	150
7. APLICACIÓN DE LOS INMUNOENSAYOS AL ANÁLISIS DE LOS PLAGUICIDAS EN MUESTRAS FORTIFICADAS.	154
7.1. Determinación de tetraconazol en zumos de fruta.	154
7.2. Determinación de hexaconazol en zumos de fruta.	158
7.3. Determinación de imazalil en zumos de fruta.	161
7.4. Recapitulación.	164
IV. CONCLUSIONES.	167
V. BIBLIOGRAFÍA.	171
APÉNDICE I: Publicaciones derivadas de la tesis.	189

ABREVIATURAS.

2xYT	medio de cultivo para bacteriófagos filamentosos (triptona 1.6% p/v, extracto de levadura 1% p/v y NaCl 0.5% p/v)
2xYTGC	medio 2xYT con 1% de glucosa y 25 µg/ml de cloramfenicol
2xYTGC-agar	medio 2xYT con 1% de glucosa y 25 µg/ml de cloramfenicol y 1.5% de agar
aa	aminoácido
AcMo	anticuerpo monoclonal
AcRb	anticuerpo recombinante
AED	detector de emisión atómica
A _{max}	absorbancia máxima
API	ionización por presión atmosférica
BSA	seroalbumina bovina
cDNA	primera cadena de DNA complementaria al mRNA
CDR	regiones determinantes de complementariedad
cfu	unidad formadora de colonias
C _T	C terminal
CV	coeficiente de variación
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DNA	ácido desoxirribonucleico
dsFv	fragmento variable de cadena sencilla con puente disulfuro
DTP	2-(2,4-Dichlorophenyl)-3-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-yl)propanol
DTPH	ácido 6-[2-(2,4-Dicloro-fenil)-3-[1,2,4]triazol-1-il-propoxi]-hexanoico
DTPO	ácido succínico mono-[2-(2,4-dicloro-fenil) -3-[1,2,4]triazol-1-il-propil] éster
ECD	detector de captura electrónica
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	inmunoensayo enzimático sobre soporte sólido
ESI	ionización por electrospray

ABREVIATURAS

Fab	fragmento del anticuerpo donde reside la función de unión al antígeno
Fc	fragmento constante
FD	detector de fluorescencia
FID	detección de ionización de llama
FPD	detector fotométrico de llama
FR	región altamente conservada (<i>Framework region</i>)
FTD	detector térmico de llama
Fv	fragmento variable
GC	cromatografía de gases
GLC	cromatografía líquida y gaseosa
HFCS	suplemento del medio de cultivo para la fusión y clonación de hibridomas (<i>Hybridoma Fusion and Cloning Supplement</i>)
HH	ácido [5-(2,4-diclorofenil)-5-hidroxi-6-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il)hexanoico
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HRP	peroxidasa de rábano (<i>horseradish peroxidase</i>)
HT	suplemento con hipoxantina y timidina
I ₅₀	concentración de analito en el inmunoensayo que reduce la señal al 50% del valor de la asíntota máxima
Ig	inmunoglobulina
IMH	ácido [1-(2,4-diclorofenil)-2-(1-imidazolil) hexanoico
IPTG	isopropil-β-tiogalactopiranosido
LC	cromatografía líquida
LMR	límite máximo de residuos
LOD	límite de detección del inmunoensayo
LOQ	límite de cuantificación del inmunoensayo
mRNA	RNA mensajero
MS	espectrometría de masas
NPD	detector de nitrógeno y fósforo
N _T	N terminal

OPD	<i>o</i> -fenilendiamina
OVA	ovoalbúmina
pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino, fosfato sódico 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4
PBS-T	tampón PBS con un 0.05% de Tween 20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PEG	polietilenglicol
PS	señal de empaquetamiento
RC	reactividad cruzada
RF DNA	forma replicativa del DNA
RNA	ácido ribonucleico
RT-PCR	PCR de transcripción inversa
SBF	suero bovino fetal
scFv	fragmento variable de cadena sencilla (<i>Single Chain Fragment Variable</i>)
scFv-pIII	proteína de fusión: scFv unido a la proteína pIII truncada del fago M13
SOB	medio de cultivo (triptona 2% p/v, extracto de levadura 0.5% p/v, NaCl 0.05% p/v, KCl 2.5 mM, MgCl ₂ 10 mM)
SOC	medio SOB con 4 mg/ml de glucosa.
SOE-PCR	PCR de solapamiento (<i>Splicing by Overlapping Extension-PCR</i>)
ssDNA	DNA monocatenario
TAE	tampón de electroforesis preparativa (Tris 2 M, EDTA-Na ₂ -2H ₂ O 0.05M, ácido acético glacial 1 M)
TB	tampón de bloqueo
TBE	tampón de electroforesis analítica (Tris 0.89 M, EDTA-Na ₂ -2H ₂ O 0.20 M, Ácido bórico 0.89 M)
UV	ultravioleta
V _H	fragmento variable de cadena pesada
V _L	fragmento variable de cadena ligera

I. INTRODUCCIÓN

1. PLAGUICIDAS.

Según la definición dada por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) *un plaguicida es una sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo vectores de enfermedad humana o animal, especies indeseadas de plantas o animales capaces de causar daños o interferir de cualquier otra forma con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte o mercado de los alimentos, otros productos agrícolas, madera y sus derivados o alimentos animales, o que puedan ser administrados a los animales para el control de insectos, arácnidos y otras plagas en sus organismos* (FAO, 2002).

Los plaguicidas se pueden clasificar, en función de la plaga sobre la que ejercen su acción, como insecticidas, acaricidas, fungicidas, antibióticos, rodenticidas y herbicidas o, según el grupo químico que los caracteriza, como organofosforados, organoclorados, carbamatos, piretroides, compuestos bipiridílicos, etc...

El empleo de sustancias para proteger las cosechas se remonta a la antigüedad. Homero ya escribió sobre las propiedades “purificadoras” del azufre, del que se sabía que atacaba al moho. En tiempos de Jerjes, rey de Persia (s.V a.C.) se empleaban flores de piretro como insecticida, y se sabe que hacia el año 900 la cultura china usaba arsenitos para el control de roedores y otras plagas.

Sin embargo, el concepto moderno de plaguicida surgió en el s. XIX, cuando se sintetizaron múltiples sustancias con propiedades tóxicas, que se utilizaron en años posteriores. La investigación de compuestos arsenicales dio lugar al empleo de arsenito de cobre para combatir un tipo de escarabajo en EE.UU., y la extensión de su empleo promovió la primera legislación conocida sobre plaguicidas en el año 1900. El diclorodifeniltricloroetano (DDT) se sintetizó en 1874, pero no fue hasta 1939 cuando se demostró su actividad insecticida, y como tal comenzó a utilizarse en 1942. El hexaclorociclohexano (HCH), sintetizado en 1825, se usó como gas tóxico en la 1ª Guerra Mundial y como insecticida a partir de 1942. En la 2ª mitad del s. XX se aceleró la síntesis de productos organofosforados (dimefox en 1949, malation en 1950) y de carbamatos (carbaryl en 1956, aldicarb en 1965) (Ferrer, 2003).

Actualmente, los plaguicidas o productos fitosanitarios son imprescindibles para la producción agrícola, pues los estragos potenciales de las diferentes clases de plagas determinarían la inviabilidad de muchos cultivos e incluso la posibilidad de mantener las cosechas almacenadas. Sin embargo, la utilización de productos fitosanitarios puede tener otros efectos no deseables y es imprescindible que estos efectos no sean, en ningún modo, peligrosos para la salud humana o el medio ambiente. En consecuencia, en la mayoría de estados de la Unión Europea se aplican los mecanismos necesarios para que sólo puedan comercializarse aquellos productos fitosanitarios que sean útiles y eficaces para combatir las plagas, pero que no comporten otros riesgos colaterales. En concreto, en España, para que un producto pueda comercializarse debe estar autorizado previamente e inscrito necesariamente en el Registro Oficial de Productos Fitosanitarios (Ministerio del Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, MARM, 2009a).

La normativa de los países miembros de la Unión Europea relativa a la comercialización de productos fitosanitarios se recoge en la Directiva 91/414/CEE. Según dicha normativa, actualmente (septiembre de 2009) existen 973 sustancias activas de productos fitosanitarios, de las cuales 304 se han incluido en el anexo I como sustancias permitidas, 348 se han excluido por diversos motivos y las restantes están pendientes de revisión comunitaria. Además, existen también otras 98 sustancias no consideradas como fitosanitarias y 147 sustancias nuevas (MARM, 2009b).

Como consecuencia de la peligrosidad que pueden presentar los residuos de plaguicidas, no sólo es necesario desarrollar una normativa con respecto a su comercialización sino también regular su concentración máxima aceptable en alimentos. Para ello, muchos países han establecido los denominados límites máximos de residuos (LMRs). Se entiende por LMR la concentración máxima de un residuo de plaguicida que se permite o reconoce legalmente como aceptable en o sobre un alimento, producto agrícola o alimento para animales. Actualmente, los LMRs en España, así como en otros estados europeos, están regulados por el Reglamento (CE) 396/2005 de la Unión Europea, que entró en vigor en 2008 con la publicación de sus Anexos II y III por el Reglamento (CE) 149/2008.

En base a la normativa anterior a dicho reglamento, existía la posibilidad de coexistencia entre límites comunitarios y nacionales. En el caso de España, con

un importante número de cultivos y unas condiciones agroambientales muy propicias al desarrollo de muchas plagas, existían más LMRs nacionales que comunitarios. La principal dificultad que presentaban estos LMRs nacionales era que una cosecha producida legalmente en un estado miembro de la Unión Europea resultaba ser ilegal en otro, lo que daba lugar a frecuentes problemas en el comercio, principalmente debido a los rechazos de mercancías (frutas y hortalizas). Los problemas relacionados con las diferentes legislaciones nacionales sobre LMRs han desaparecido con la entrada en vigor del Reglamento 396/2005. Sin embargo, la necesidad de fijar LMRs para cada producto vegetal, implica la realización de nuevos estudios, por cuya carencia se han anulado numerosos LMRs nacionales y, en consecuencia, se han retirado las autorizaciones de muchos productos fitosanitarios (MARM, 2009c).

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS.

2.1. Métodos cromatográficos.

Actualmente, la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) son los métodos más frecuentemente empleados para la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos.

La GC es, sin duda, la técnica más habitual, y se emplea en combinación con diversos sistemas de detección tales como los detectores de nitrógeno y fósforo (NPD), los de emisión atómica (AED), de captura de electrones (ECD), de espectrometría de masas (MS) o los detectores fotométricos de llama (FPD), entre otros (Santos y Galceran, 2002). Por otro lado, la HPLC, usualmente acoplada a un espectrómetro de masas, ha ido ganando terreno en el análisis de plaguicidas, ya que permite la determinación de compuestos termolábiles, poco volátiles y/o polares (Morozova *et al.*, 2005).

La principal ventaja de los métodos cromatográficos es que permiten el análisis simultáneo de compuestos con propiedades fisicoquímicas similares (métodos multirresiduo). Actualmente, estos métodos constituyen una herramienta fundamental para el control de residuos por parte de las agencias de control y regulación, ya que proporcionan información de un gran número de plaguicidas presentes en una muestra dada. Sin embargo, los métodos cromatográficos presentan una serie de inconvenientes. En primer lugar, el equipamiento necesario para el análisis es complejo y caro, y requiere personal altamente cualificado para su manejo. Además, los continuos avances para mejorar la sensibilidad de los instrumentos incrementan, como es lógico, el coste de los mismos. Por otro lado, la etapa correspondiente a la preparación de cada muestra, necesaria para eliminar los compuestos que puedan interferir en la determinación, es una etapa lenta que dificulta un amplio muestreo. Por ello, el análisis de una gran cantidad de muestras (situación habitual en el análisis medioambiental) es difícil de llevar a cabo. Por último, las técnicas cromatográficas no son adaptables al análisis *in situ* (Morozova *et al.*, 2005).

2.2. Métodos inmunológicos.

Los inmunoensayos son métodos de análisis basados en la interacción específica entre un antígeno y un anticuerpo. Los primeros métodos inmunológicos de detección se desarrollaron frente a moléculas de gran tamaño. En 1959, Yallow y Berson publicaron el primer radioinmunoensayo para la detección de la hormona insulina. En los años 70 comenzaron a desarrollarse inmunoensayos frente a pequeñas moléculas orgánicas tales como fármacos y drogas. En 1975 (Langone y Van Vunakis) se desarrolló el primer radioinmunoensayo para la detección de plaguicidas (aldrin y dieldrin). La capacidad de acoplar los inmunorreactivos (tanto anticuerpos como antígenos) a una enzima (Avrameas y Uriel, 1966; Nakane y Pierce, 1971) y de inmovilizarlos sobre soportes sólidos (Engvall y Perlmann, 1971; Van Weemen y Schuurs, 1971) dio lugar al desarrollo de la técnica conocida como ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). En 1982, Wie y Hammock describieron el primer ELISA para plaguicidas (diflubenzuron). A partir de entonces, el empleo de este tipo de inmunoensayos ha ido aumentando de manera espectacular y, a finales de los años 90, aproximadamente el 90% de los inmunoensayos de detección de plaguicidas eran ELISAs (Gabaldón *et al.*, 1999). La aparición de nuevos plaguicidas y agentes contaminantes, así como de las normativas de control y regulación de los mismos, tiene como consecuencia que, en la actualidad, se publiquen continuos avances en el desarrollo de técnicas inmunoanalíticas. Por un lado, recientemente, se han publicado trabajos sobre modificaciones en los formatos de los inmunoensayos que tienen como finalidad mejorar la sensibilidad de los mismos (Kaur *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009). Además, en la última década, también se está trabajando en la mejora de otros aspectos de los inmunoensayos como son la reducción del tiempo de ensayo, la posibilidad de realizar el análisis *in situ*, la miniaturización y automatización del sistema y la determinación simultánea de varios analitos (multianalito) (Morozova *et al.*, 2005). Por otro lado, nuevas y prometedoras técnicas inmunoanalíticas como los biosensores (Suri *et al.*, 2009) o los *microarrays* (Seidel y Neissner, 2008) se están abriendo paso en la detección de pequeñas moléculas de interés agroalimentario.

La creciente popularidad de los métodos inmunológicos radica, principalmente, en las ventajas que estos métodos aportan con respecto a las técnicas tradicionales:

- En primer lugar, una de las características más interesantes de los inmunoensayos es la rapidez y sencillez de la determinación analítica. Estos métodos permiten el análisis de un gran número de muestras al día, sin la necesidad de requerir personal altamente cualificado.
- Esta sencillez de manejo junto con la posible automatización de los métodos convierten a los inmunoensayos en técnicas potencialmente aplicables al análisis *in situ*. Por ello, algunos trabajos como el de Queffelec *et al.* (2001) han ido encaminados a estudiar esta aplicación de los inmunoensayos.
- Otro aspecto a tener en cuenta es la elevada sensibilidad de los inmunoensayos, que se refleja en los bajos límites de detección de estos métodos. Sin embargo, en este aspecto no son superiores aunque sí comparables, en algunos casos, a los métodos cromatográficos empleados hoy en día.
- La elevada especificidad de los inmunoensayos es un arma de doble filo. Por un lado se puede considerar como una ventaja ya que permite la detección de un solo analito incluso en presencia de otros plaguicidas y derivados, minimizando así el tratamiento de la muestra. Sin embargo, la dificultad de realizar análisis multiresiduo sigue siendo uno de los principales inconvenientes de los métodos inmunológicos. Aunque es posible adaptar los inmunoensayos para la determinación de varios analitos simultáneamente, el número de analitos que pueden ser analizados mediante estas técnicas es bastante más limitado que mediante cromatografía.
- Finalmente, los análisis mediante métodos inmunológicos resultan significativamente más económicos que los realizados mediante las técnicas clásicas. En concreto, el coste de los reactivos empleados en un ELISA es entre 20 y 100 veces menor que en el caso de GC o HPLC, y el del instrumental necesario es aproximadamente 5 veces menor (Morozova *et al.*, 2005).

Sin embargo, al igual que todo método analítico, los inmunoensayos también presentan ciertas limitaciones que hay que tener en cuenta:

- En primer lugar, como ya se ha comentado antes, su elevada especificidad puede ser un problema para poder aplicarlos como métodos multirresiduos y, en tal caso, el número de analitos analizados simultáneamente es muy limitado.
- Aunque el análisis en sí sea rápido y sencillo, el desarrollo y puesta a punto de cada inmunoensayo es un proceso relativamente lento que puede durar varios meses o incluso más de un año.
- Finalmente, los inmunoensayos pueden verse afectados por interacciones inespecíficas producidas por los componentes de la matriz. Estos efectos dependen de cada matriz, por lo que hay que validar los inmunoensayos para cada matriz en cuestión.

El conocimiento de las ventajas e inconvenientes de cada uno de los métodos analíticos permite determinar las aplicaciones más adecuadas para cada uno de ellos. En cualquier caso, el objetivo de los métodos inmunoanalíticos no es sustituir sino complementar a las técnicas cromatográficas existentes, aportando aplicaciones analíticas que subsanen las limitaciones de estas técnicas.

3. ELISA DE PLAGUICIDAS: CONCEPTOS BÁSICOS.

Los ELISAs son inmunoensayos que se caracterizan porque una de las especies implicadas en la reacción inmunoquímica ha de estar inmovilizada a un soporte sólido y, a su vez, otra de las especies ha de tener acoplada una enzima que genere una señal detectable.

El tipo de soporte sólido más empleado son las placas de poliestireno de 96 pocillos (placas ELISA), aunque también se ha descrito el uso de otros soportes como partículas esféricas de poliestireno, partículas magnéticas y tubos de plástico o vidrio modificado (Morozova *et al.*, 2005). Además, el método más común de inmovilización a las placas es por adsorción pasiva, ya que es sencillo y proporciona buenos resultados.

De entre todas las enzimas empleadas para acoplarlas a los inmunorreactivos, las más habituales son la peroxidasa del rábano picante (*horseradish peroxidase*, *HRP*) y la fosfatasa alcalina, mientras que otras como la β -galactosidasa o la glucosa oxidasa se utilizan en menor medida. En los inmunoensayos descritos en este trabajo, se ha empleado la HRP. Esta enzima, cataliza la oxidación de sustratos (entre ellos la *o*-fenilendiamina, OPD) cuya forma oxidada absorbe en el espectro visible (máximo a 492 nm). Estos cambios de absorción pueden medirse espectrofotométricamente o, incluso, se pueden detectar cualitativamente de forma visual. También pueden emplearse sistemas de detección basados en la medida de productos de reacción fluorescentes (Lukens *et al.*, 1977; Schwalbe *et al.*, 1984) o luminiscentes (Erhard *et al.*, 1992; Aherne, 1993) aunque su aplicación está menos extendida.

3.1. Haptenos y conjugados.

Para poder desarrollar un ELISA es necesario disponer de anticuerpos capaces de reconocer al compuesto que se quiere detectar. Cuando se trata de moléculas grandes como proteínas o microorganismos, dichos anticuerpos se pueden obtener inyectando directamente la molécula en cuestión en animales de experimentación. Sin embargo, el caso de los plaguicidas es distinto, ya que desde el punto de vista inmunológico son haptenos, es decir, moléculas que debido a su pequeño tamaño (<1000 Da) son incapaces de provocar respuesta inmune por sí mismos, pero que acoplados a una proteína adquieren carácter inmunogénico. Para poder acoplar el analito a proteínas es necesario que

disponga de algún grupo funcional libre tipo -COOH -OH, -NH₂, o -SH. Sin embargo, esta característica no se cumple en la mayoría de los plaguicidas, por lo que la primera etapa para la obtención de inmunógenos es la síntesis de moléculas que imiten la estructura del analito y que contengan un brazo espaciador con algún grupo funcional terminal.

Una vez se han sintetizado los haptenos correspondientes, el método de conjugación empleado para su acoplamiento a la proteína depende del grupo funcional que contengan. Con frecuencia, el grupo funcional escogido para el acoplamiento es el grupo carboxilo y, en ese caso, los métodos de conjugación más habituales son el conocido como el método del anhídrido mixto (Rajkowski *et al.*, 1977) y el método del éster activo (Langone y Van Vunakis, 1982). Algunas de las proteínas empleadas habitualmente para la conjugación son OVA (ovoalbúmina), BSA (seroalbúmina bovina) y KLH (*keyhole limpet hemocyanin*).

Cuando un conjugado hapteno-proteína se inyecta en un animal se desencadena una respuesta inmunitaria frente al complejo y, como consecuencia, algunos de los anticuerpos producidos van dirigidos contra el hapteno acoplado. Debido a la similitud estructural entre éste y el plaguicida, una parte de esos anticuerpos puede reconocer también al analito de interés.

Por otro lado, los conjugados hapteno-proteína no se utilizan únicamente como inmunógenos, sino que también constituyen uno de los componentes fundamentales de los ELISA. Para obtener los conjugados de ensayo se utilizan distintas proteínas que permiten la inmovilización del hapteno a la placa de ELISA (OVA, BSA, etc) o que actúan como marcadores enzimáticos (HRP). En cualquier caso, la proteína empleada para preparar el conjugado de ensayo ha de ser distinta a la empleada en la preparación del inmunógeno para evitar las interacciones anticuerpo-proteína portadora.

3.2. Formatos de ELISA.

El pequeño tamaño de las moléculas de plaguicida no sólo condiciona la obtención de anticuerpos sino también el desarrollo de los inmunoensayos. Así, la mayoría de los inmunoensayos frente a este tipo de moléculas son ensayos competitivos, donde intervienen tres componentes: un anticuerpo específico, el plaguicida a analizar (analito) y un hapteno (relacionado estructuralmente con el analito) conjugado a una molécula auxiliar. El fundamento de la detección es la

competición que se establece entre el analito y el hapteno conjugado por la unión al anticuerpo en concentraciones limitantes.

Se pueden diferenciar dos formatos básicos de inmunoensayos en función del componente (anticuerpo o hapteno conjugado) que se detecta y, por tanto, también del componente que se ha inmovilizado.

En el formato de anticuerpo inmovilizado, el anticuerpo específico se inmoviliza en el soporte, bien directamente o bien indirectamente mediante un anticuerpo de captura. Por otro lado, el hapteno se acopla covalentemente a una enzima marcadora, de modo que este conjugado enzimático al unirse al anticuerpo generará, en último término, la señal. En presencia del analito libre se establece una competición entre el analito y el hapteno conjugado por unirse al anticuerpo inmovilizado y, como consecuencia, se generará una señal inversamente proporcional a la concentración de analito presente en la muestra.

En el formato de conjugado inmovilizado, como su nombre indica, es el conjugado hapteno-proteína el que se inmoviliza en el soporte. A continuación se añade el anticuerpo específico (si se trata de un ensayo no competitivo) o el anticuerpo y el analito (si se trata de ensayo competitivo), detectándose la unión del anticuerpo al conjugado. Nuevamente, en función de la concentración de analito libre y de la afinidad del anticuerpo hacia éste, se producirá mayor o menor pérdida de señal. El anticuerpo específico puede estar marcado con una enzima (ELISA directo) o bien se detecta indirectamente mediante el uso de un anticuerpo secundario marcado (ELISA indirecto).

3.3. Heterología.

Según el tipo de conjugado empleado, los ELISAs se pueden clasificar en homólogos o heterólogos. Los ELISAs homólogos son aquellos en los que el hapteno de ensayo es el mismo que el empleado como inmunógeno, aunque esté acoplado a una proteína distinta. Por el contrario, si el hapteno del conjugado de ensayo es distinto al que se empleó para desencadenar la respuesta inmune, se denomina ELISA heterólogo. Muchas veces, en los ensayos homólogos se da la circunstancia de que el anticuerpo reconoce mejor al conjugado que al analito libre, por lo que, a menudo, hay que recurrir a la heterología de haptenos para mejorar la sensibilidad del ensayo competitivo. Así, si el anticuerpo presenta menor afinidad hacia el conjugado heterólogo se favorece la competición con el analito, aumentando la sensibilidad del ensayo. Generalmente, se recomienda

sintetizar una colección de haptenos para una familia de analitos dada, los cuales se evaluarán en ensayos de heterología para seleccionar aquel que proporcione un ensayo con los parámetros analíticos que más se aproximen a los deseados.

4. LOS ANTICUERPOS: HERRAMIENTAS INMUNOANALÍTICAS.

Los primeros anticuerpos obtenidos frente a plaguicidas fueron anticuerpos policlonales. Los anticuerpos policlonales, también conocidos como antisueros, consisten en una población heterogénea de anticuerpos con diferente afinidad y especificidad hacia el analito de interés. Son relativamente fáciles de obtener y permiten el desarrollo de inmunoensayos con elevada sensibilidad. Sin embargo, presentan ciertas limitaciones, ya que la cantidad de anticuerpos depende de la talla del animal inmunizado, y las propiedades de los anticuerpos varían de un individuo a otro siendo prácticamente irreproducibles (Hammock *et al.*, 1995).

En 1975 se produjo un gran avance en los inmunoensayos, gracias a la tecnología de hibridomas desarrollada por Köhler y Milstein (1975). Tras la inmunización del animal, los linfocitos B se fusionan con células tumorales (mielomas) dando lugar a líneas celulares inmortales, conocidas como hibridomas, productoras de anticuerpos frente a un analito determinado. A continuación, los hibridomas se someten a un proceso de cribado, selección y clonación hasta conseguir identificar un único clon capaz de producir un anticuerpo con las propiedades deseadas. Cada hibridoma se puede expandir en el medio de cultivo, convirtiéndose en una fuente inagotable de un único tipo de anticuerpo, con propiedades determinadas, conocido como anticuerpo monoclonal. Precisamente, estas dos características, tanto la posibilidad de seleccionar anticuerpos monoclonales con diferentes propiedades en función de la aplicación deseada como la capacidad de producirlos de manera ilimitada, suponen las dos ventajas principales de esta tecnología.

A finales de los años 80, se publicaron los primeros trabajos que describían la expresión de fragmentos de anticuerpo en bacterias (Skerra y Plunkthün, 1988; Bird *et al.*, 1988; Huston *et al.*, 1988). Estos estudios sentaron las bases para la obtención de la llamada tercera generación de anticuerpos empleados como herramientas inmunoanalíticas: los anticuerpos recombinantes. Unos años más tarde, Clackson *et al.* (1991) desarrollaron plataformas de selección basadas en la presentación de los fragmentos de anticuerpo en la superficie de fagos. El fundamento de esta estrategia es la unión entre genotipo (información genética) y fenotipo (actividad biológica) y supone una importante herramienta para seleccionar los fragmentos de anticuerpo en función de unas características determinadas. Las técnicas de biología molecular empleadas para obtener

anticuerpos recombinantes ofrecen ciertas ventajas frente a la obtención de anticuerpos policlonales y monoclonales. En primer lugar, el fácil acceso al material genético proporciona información sobre los sitios de unión antígeno-anticuerpo y, además, permite su modificación dando lugar a anticuerpos con distintas propiedades. En segundo lugar, en teoría, es posible generar bibliotecas de gran diversidad, lo que aumenta la probabilidad de encontrar un anticuerpo de interés. Por otro lado, una vez generada una biblioteca determinada, es posible buscar anticuerpos para diferentes analitos, sin necesidad de volver a inmunizar animales. Finalmente, la producción de anticuerpos recombinantes es rápida, ya que en algunos casos permite evitar la etapa de producción de hibridomas, y de bajo coste, puesto que los medios de cultivo de bacterias son más económicos y sencillos que los de otros tipos celulares. Los aspectos más importantes de la obtención de anticuerpos recombinantes se describen detalladamente en apartados posteriores.

4.1. Estructura del anticuerpo.

Los anticuerpos, también llamados inmunoglobulinas, son glicoproteínas producidas por los linfocitos B como parte de la respuesta del sistema inmunológico ante la presencia de moléculas o cuerpos extraños en el organismo. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgM e IgG, siendo esta última la más abundante en el suero. Las IgG (150 kD) están formadas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras, también idénticas, unidas entre sí por puentes disulfuro, que adoptan una estructura característica en forma de Y (Figura 1.1). Cada cadena ligera se pliega formando dos dominios funcionales, y cada cadena pesada, cuatro. Funcionalmente, la molécula de anticuerpo contiene dos tipos de fragmentos, el fragmento constante (Fc) con una función efectora, y el fragmento donde reside la función de unión al antígeno (Fab), unidos por una región polipeptídica conocida como bisagra. En concreto, en el fragmento Fab, la zona de reconocimiento del antígeno se denomina fragmento variable (Fv) y está constituida por los dominios N-terminales (N_T) tanto de la cadena ligera (V_L) como de la cadena pesada (V_H). En cada uno de estos dominios variables existen tres regiones no contiguas hipervariables llamadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que son las que establecen el contacto con el antígeno y que se encuentran separadas por regiones altamente conservadas denominadas FRs (*framework regions*). De entre todas las CDR, la que presenta

mayor variación en términos de longitud y secuencia es la CDR3 de la cadena pesada (HCDR3).

4.2. Estructura del anticuerpo recombinante.

Una molécula de anticuerpo de tipo IgG posee cierta complejidad. Gracias al desarrollo de técnicas de biología molecular, se han podido obtener unidades de reconocimiento más pequeñas: los anticuerpos recombinantes (AcRbs). Los AcRbs más comúnmente empleados son los fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) o su variante con puente disulfuro (dsFv), y los fragmentos Fab que están formados por un dominio variable y un dominio constante de cada cadena (Figura 1.1). Existen multitud de variantes menos comunes, desde dímeros o multímeros, hasta anticuerpos multifuncionales que combinan la detección del antígeno con otra función biológica de una molécula fusionada al anticuerpo (Brichta *et al.*, 2005).

El fragmento scFv, formado por los dominios V_H y V_L de la molécula de anticuerpo, tiene un peso molecular de 27-30 KDa y supone el fragmento más pequeño de anticuerpo, codificado por un único gen, que mantiene completo el sitio de unión del antígeno. Para la formación de este tipo de fragmentos, se incorpora un espaciador polipeptídico flexible que une el extremo C-terminal (C_T) de uno de los dominios variables con el extremo N_T del otro dominio. La incorporación de dicho espaciador puede ser en sentido V_L -espaciador- V_H o V_H -espaciador- V_L .

La longitud del espaciador es un aspecto muy importante a tener en cuenta, ya que espaciadores relativamente largos (15-20 aa) suelen favorecer la formación de moléculas monoméricas, mientras que espaciadores pequeños (5 aa) favorecen la dimerización, donde el fragmento V_H de una de las moléculas se une al V_L de otra y viceversa (Burton, 2001). Además, el espaciador puede influir en la orientación de los dominios y, por tanto, en la afinidad del sitio de unión. Un espaciador habitualmente empleado en la formación de los fragmentos scFv es $(Gly_4Ser)_3$, de 15 aa, en el que los residuos de Gly confieren flexibilidad, mientras que los residuos de Ser proporcionan hidrofiliidad (Brichta *et al.*, 2005).

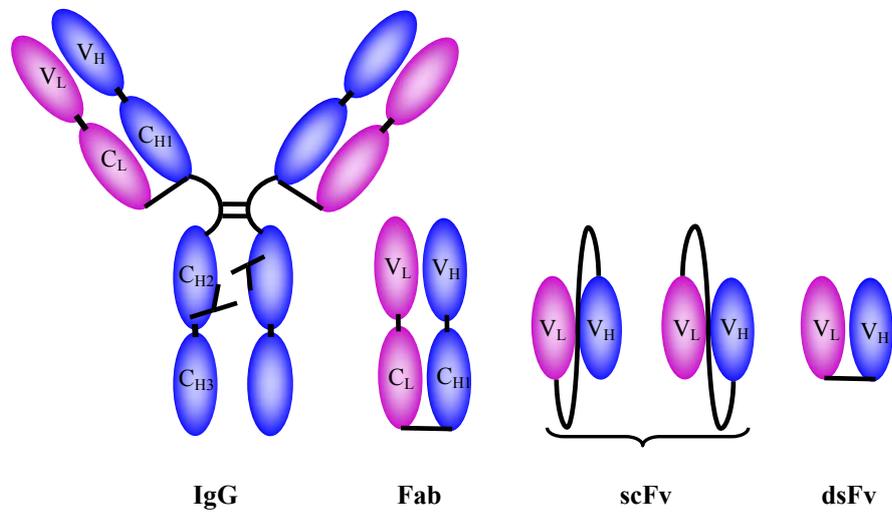


Figura 1.1. Representación esquemática de una molécula de IgG y de los fragmentos de anticuerpos recombinantes más comunes.

5. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES.

Una de las decisiones más importantes a las que hay que enfrentarse a la hora de construir una biblioteca de anticuerpos recombinantes es la de escoger el tipo de fragmento que se quiere obtener: scFv o Fab. Aunque la molécula scFv presenta grandes ventajas frente a Fab para aplicaciones biomédicas (Leong y Chen, 2008), para aplicaciones analíticas de haptenos, no parece haber un criterio claro al respecto. Así, aunque un gran número de investigadores como Webb *et al.* (1997), Alcocer *et al.* (2000), Charlton *et al.* (2001), Li *et al.* (2000), Choi *et al.* (2004), Navarro-Teulon *et al.* (1995), Garret *et al.* (1997), Pan *et al.* (2006), Nishi *et al.* (2005), Graham *et al.* (1995) Yuan *et al.* (1997), Tout *et al.* (2001) y Li *et al.* (2006) han optado por el fragmento scFv; otros como Yau *et al.* (1998), Sholthof *et al.* (1997), Lee *et al.* (1998), Gerdes *et al.* (1999) y Chiu *et al.* (2000) han preferido el fragmento Fab. No obstante, se han descrito más ventajas asociadas al fragmento scFv que al fragmento Fab (Burton *et al.*, 2001).

En primer lugar, las síntesis del fragmento scFv se puede realizar mediante PCR de solapamiento, lo que simplifica el número de pasos implicados en el proceso de construcción de las bibliotecas. Por otro lado, la producción del fragmento scFv en *E. coli* suele dar mayores rendimientos que la producción del fragmento Fab. Algunos autores afirman, además, que el fragmento scFv es más estable a 37 °C (Brichta *et al.*, 2005). Finalmente, otro aspecto a tener en cuenta es la capacidad del scFv de multimerizar, lo que puede ser una ventaja o un inconveniente, según el caso. Así, aunque la capacidad de multimerización puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en el caso de detección de moléculas pequeñas, el aumento de sitios de unión puede resultar desfavorable para la competición (Grant *et al.*, 1999).

Por otro lado, la principal ventaja del fragmento Fab es que se trata de una molécula estable y bien caracterizada, con poca tendencia a multimerizar. Por tanto, cualquier modificación de la afinidad del fragmento hacia el analito está directamente relacionada con las propiedades intrínsecas del anticuerpo y no con la formación de estructuras oligoméricas.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, el tipo de fragmento seleccionado para este trabajo ha sido el scFv; por ello, las etapas para la obtención de anticuerpos recombinantes descritas en este apartado hacen

referencia a este tipo de fragmentos. A continuación (Figura 1.2) se muestra un resumen de las distintas etapas de obtención de anticuerpos recombinantes.

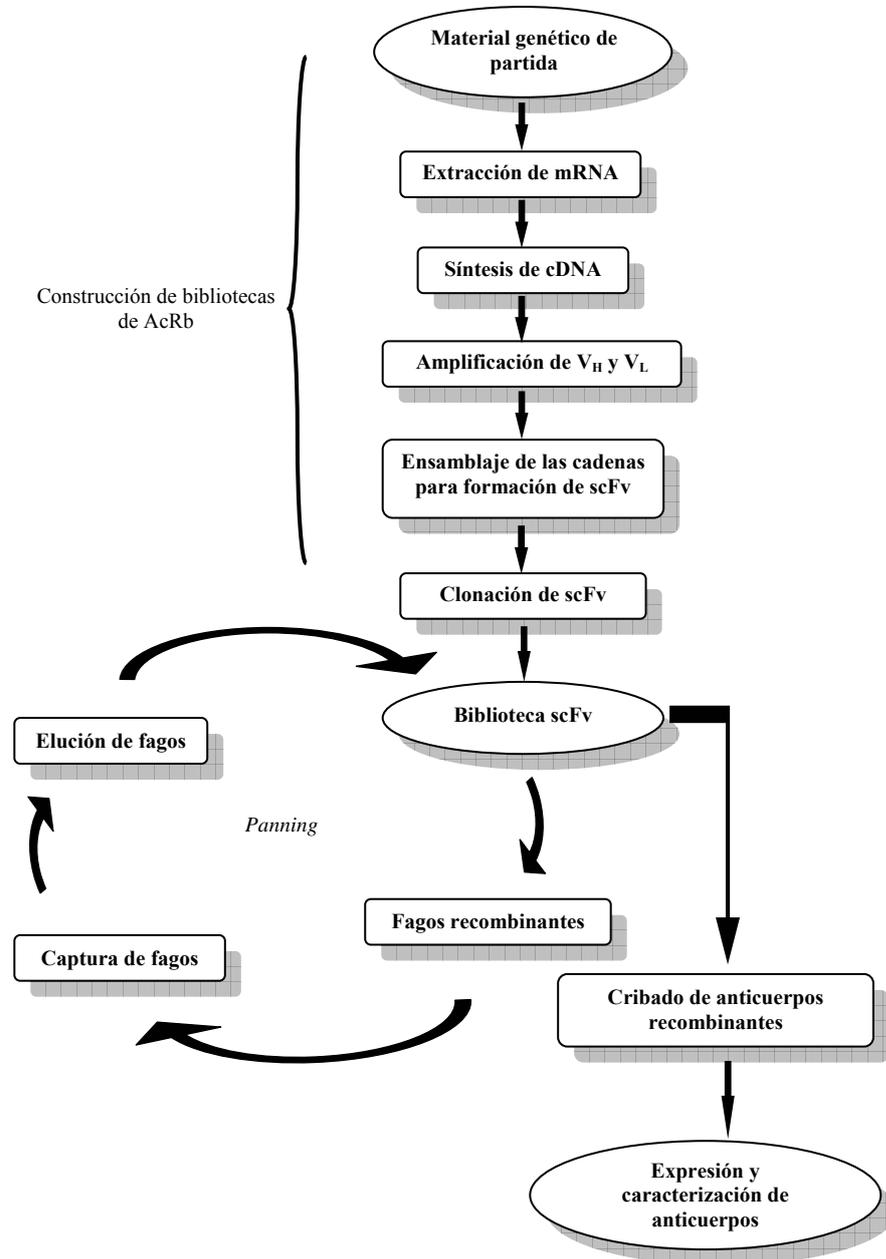


Figura 1.2. Esquema de la tecnología de producción de anticuerpos recombinantes.

5.1. Construcción de bibliotecas de anticuerpos recombinantes.

Existen dos tipos fundamentales de bibliotecas de AcRbs en función del material de partida empleado: bibliotecas inmunes y bibliotecas no inmunes.

Las bibliotecas inmunes, como su nombre indica, se obtienen a partir del material genético de animales previamente inmunizados frente a una o varias moléculas para las cuales se pretende obtener el anticuerpo en cuestión. Habitualmente, se utilizan dos tipos de células productoras de anticuerpos: hibridomas o linfocitos B. El empleo de este tipo de bibliotecas implica ciertas ventajas. En primer lugar, los anticuerpos capaces de reconocer al inmunógeno predominan sobre otros anticuerpos y además, se han sometido a una maduración de la afinidad *in vivo* gracias a los mecanismos celulares del donante (Clackson *et al.*, 1991 y Burton *et al.*, 1991). Otra ventaja importante es que para obtener anticuerpos de alta afinidad no es necesario preparar bibliotecas de gran tamaño. En la bibliografía, se ha descrito la obtención de bibliotecas inmunes frente a diversas moléculas a partir de una amplia variedad de especies como pollos, ratones, conejos, ovejas, camellos o humanos (Benhar, 2001). Sin embargo, la generación de bibliotecas inmunes también presenta ciertos inconvenientes como es el tiempo requerido para la inmunización o los problemas derivados de la falta de inmunogenicidad del antígeno o de su toxicidad (Azzazy y Highsmith, 2005).

Por otro lado, las bibliotecas no inmunes pueden dividirse a su vez en dos tipos: bibliotecas generales y bibliotecas sintéticas o semisintéticas. Las primeras se obtienen a partir de genes naturales procedentes de donantes no inmunizados. El empleo de este tipo de bibliotecas implica una mayor diversidad de anticuerpos, lo que aumenta la probabilidad de encontrar anticuerpos con diferentes propiedades. Además, una única biblioteca puede servir para obtener anticuerpos frente a una gran variedad de antígenos. Al evitar el paso de inmunización, las bibliotecas generales presentan menos restricciones para la obtención de anticuerpos humanos y se puede reducir el tiempo de generación de anticuerpos (Brichta *et al.*, 2005); aunque esto no siempre es cierto, ya que en ocasiones es más rápido y sencillo inmunizar que aplicar procedimientos de mejora de afinidad a bibliotecas generales preexistentes (Burton, 2001). Sin embargo, el empleo de este tipo de bibliotecas presenta un inconveniente importante, ya que es necesario disponer de un repertorio muy elevado ($>10^8$) para poder obtener anticuerpos de alta afinidad (Benhar, 2001). A pesar de esta limitación, se han descrito en la bibliografía algunos ejemplos de obtención de

AcRb frente a moléculas de pequeño tamaño a partir de este tipo de bibliotecas (Sheedy *et al.*, 2007).

El otro tipo de bibliotecas no inmunes son las conocidas como bibliotecas sintéticas. Estas bibliotecas se generan introduciendo DNA sintético degenerado en las regiones que codifican las CDRs de los dominios variables de una secuencia definida (Sidhu *et al.*, 2006). El diseño de este tipo de bibliotecas permite el control sobre la diversidad de las cadenas y evita las redundancias producidas en las bibliotecas naturales (Hoogenboon, 2005). Uno de los inconvenientes derivados del uso de las bibliotecas sintéticas es que pueden dar lugar a un mal plegamiento de las proteínas y a la formación de agregados. Algunos autores han combinado ambos tipos de bibliotecas no inmunes dando lugar a las llamadas bibliotecas semisintéticas en las que algunas de las CDR presentan diversidad natural, mientras que otras se han generado de manera sintética. En la actualidad, aún existen pocos artículos que describan la aplicación de este tipo de bibliotecas para la obtención de anticuerpos frente a pequeñas moléculas (Sheedy *et al.*, 2007). En general, este tipo de bibliotecas suele presentar el mismo problema descrito para las bibliotecas no inmunes generales, ya que la afinidad de los anticuerpos obtenidos suele ser proporcional al tamaño de la biblioteca generada (Hoogenboon, 2005).

Sin duda, hasta la fecha, las que mayor éxito han cosechado son las bibliotecas inmunes, especialmente en la obtención de AcRbs frente a pequeñas moléculas y, en particular, frente a plaguicidas o sustancias de interés agroalimentario. En este trabajo se han desarrollado bibliotecas inmunes en sus dos variantes, tanto a partir de hibridomas como a partir de linfocitos B.

A continuación, se describe cada una de las etapas requeridas para la obtención de una biblioteca inmune.

5.1.1. Obtención de mRNA.

Para poder obtener una biblioteca de anticuerpos recombinantes es necesario poder clonar los genes correspondientes. Para ello, el primer paso consiste en la extracción y purificación del RNA mensajero (mRNA) a partir de las células inmunitarias. Para la extracción del mRNA, se suele emplear una matriz de oligocelulosa dT, que hibrida con la cola poli-A característica de esta clase de RNA, y, a continuación, se eluye con un tampón salino adecuado.

Como ya se ha comentado, pueden emplearse dos tipos de células productoras de anticuerpos, como fuente de material genético: hibridomas y linfocitos B. Los hibridomas generan un único anticuerpo (anticuerpo monoclonal); por tanto, la manipulación del DNA, y el diseño de las condiciones de PCR posteriores es más sencillo que en el caso de linfocitos. Sin embargo, existe la posibilidad de obtención de anticuerpos no funcionales a partir de hibridomas, ya que puede interferir el material genético de las células de mieloma empleadas para la fusión (Kramer y Hock, 2003). A pesar de ello, el empleo de hibridomas como fuente de material genético se está convirtiendo, en los últimos años, en una práctica consolidada para la producción de anticuerpos recombinantes frente a moléculas de bajo peso molecular (Kramer y Hock, 2003; Brichta *et al.*, 2005). Aunque el uso de este tipo de células no solucione el problema del tiempo y coste derivado de la etapa de fusión y selección de hibridomas, presenta la ventaja, anteriormente mencionada, de que los genes de los anticuerpos obtenidos pueden ser manipulados posteriormente para modificar las propiedades de los mismos. Por otro lado, el empleo de linfocitos como fuente de material genético presenta la ventaja de que si se dispone de una biblioteca adecuada, el coste económico, el tiempo de producción y el empleo de animales de laboratorio pueden verse considerablemente reducidos. Sin embargo, la puesta a punto del método es complicada y en la bibliografía todavía hay descritos muy pocos casos de anticuerpos recombinantes frente a haptenos, obtenidos a partir de linfocitos inmunizados (Kramer y Hock, 2003).

5.1.2. Síntesis de la primera cadena de cDNA.

Una vez obtenido el mRNA, éste sirve como molde para la obtención de la primera cadena de cDNA mediante una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de transcripción inversa (RT-PCR). Existen tres tipos de cebadores empleados habitualmente con este fin. En primer lugar, pueden emplearse oligo (dT), como cebadores universales que hibridan con la cola poli-A presente en el mRNA de mamíferos. Por otro lado, pueden generarse oligonucleótidos sintéticos que hibriden con zonas específicas del RNA. Finalmente, existe la posibilidad de emplear cebadores hexaméricos aleatorios, capaces de iniciar la síntesis de cDNA en varios puntos a lo largo del molde de RNA. El tipo de cebadores escogidos depende del tamaño del mRNA, de su estructura secundaria y del propósito del experimento (Sambrook y Russel, 2001).

5.1.3. Amplificación de las cadenas variables V_H y V_L .

En primer lugar, la amplificación de los genes de las cadenas V_H y V_L se realiza mediante PCR a partir de la primera cadena de cDNA, empleando una serie de cebadores diseñados para hibridar con regiones conservadas de los genes de dichas cadenas. Según la especie animal de la que provenga el material genético, se han descrito diferentes colecciones de cebadores que, conforme avanzan las investigaciones en este campo, son cada vez más universales. En el caso concreto de la síntesis de scFv a partir del material genético de ratones (especie escogida en este trabajo), Krebber *et al.* (1997) diseñaron un conjunto de cebadores que mejoraban notablemente los resultados de amplificación obtenidos con los cebadores descritos hasta la fecha. Estos cebadores abarcan las secuencias de todos los genes de V_H , $V_{L\kappa}$ y $V_{L\lambda}$ de ratón, incluidos en la base de datos de Kabat *et al.* (1991), combinados con los cebadores descritos por Kettleborough *et al.* (1993), Ørum *et al.* (1993) y Zhou *et al.* (1994). Además, también incluyen determinadas secuencias diana que pueden ser utilizadas para la posterior detección y purificación del fragmento de AcRb.

5.1.4. Formación de fragmentos scFv mediante ensamblaje de las cadenas variables V_H y V_L .

Los fragmentos scFv se pueden obtener mediante una SOE-PCR a partir de tres fragmentos (Clackson *et al.*, 1991; Ørum *et al.*, 1993) o a partir de dos (Ge *et al.*, 1995; Vaghaun *et al.*, 1996), siendo este último sistema muy eficiente y más sencillo (Krebber *et al.*, 1997). Los cebadores empleados en la etapa anterior de amplificación de las cadenas V_H y V_L hibridan con los extremos de ambas cadenas y añaden, además, secuencias solapantes que codifican el espaciador flexible, permitiendo así el ensamblaje del fragmento scFv directamente a partir de las dos cadenas amplificadas (Krebber *et al.*, 1997). Así pues, el ensamblaje se lleva a cabo a través de una única reacción de PCR, que consta de una etapa de solapamiento seguida de una etapa de amplificación mediante el empleo de nuevos cebadores. Estos cebadores, que hibridan con la región 3' de una de las cadenas y con la región 5' de la otra, añaden, además, sitios de corte de enzimas de restricción en cada extremo que permiten su posterior clonación en el vector adecuado. Aunque se han usado multitud de enzimas de restricción, e incluso combinaciones de varias, una de las enzimas que presenta mayores ventajas frente al resto es la SfiI, ya que tras cortar el DNA genera extremos cohesivos que permiten la ligación direccional del fragmento.

Finalmente, para llevar a cabo la PCR de amplificación y ensamblaje es necesario tener en cuenta otros factores tales como el tipo de polimerasa y las condiciones de la reacción. Una de las polimerasas más frecuentes es la Taq polimerasa; sin embargo, para minimizar errores de copia puede ser conveniente el empleo de polimerasas de alta fidelidad o con capacidad de comprobación de la lectura (*Proofreading polymerase*). Por otro lado, para establecer las condiciones óptimas de cada PCR hay que tener en cuenta las 3 etapas fundamentales (desnaturalización, anillamiento y extensión) de las que consta esta reacción, y que cada una de ellas requiere una temperatura, un número de ciclos y una duración determinada según el tipo de DNA que se quiera amplificar (Sambrook y Russel, 2001).

5.1.5. Clonación del fragmento recombinante y transformación.

El fragmento scFv, una vez construido, se digiere con la enzima de restricción apropiada y se inserta en un vector plasmídico previamente digerido con la misma enzima. En los últimos años, se han desarrollado una gran variedad de vectores plasmídicos. Por regla general, estos plásmidos contienen genes que regulan su replicación, genes que codifican un marcador fenotípico, usualmente de resistencia a antibióticos, y un casete de inserción del gen del fragmento de anticuerpo, conteniendo varios centros de restricción-inserción y secuencias de regulación de la transcripción y la traducción (Krebber *et al.*, 1997 y Viti *et al.*, 2000). En el siguiente apartado (Figura 1.7) se muestra con más detalle el mapa genético de uno de estos vectores.

A continuación, los plásmidos que han incorporado los genes de los anticuerpos recombinantes se emplean para transformar la cepa huésped de *E. coli* adecuada, dando lugar a bibliotecas de repertorios genéticos de fragmentos de anticuerpos. Según la procedencia del material genético se han construido bibliotecas de distinto nivel de diversidad (Gavilondo y Larrick, 2000).

5.2. Selección de anticuerpos recombinantes mediante su expresión en la superficie de fagos (*phage display*).

Dada la gran diversidad que pueden mostrar las bibliotecas de anticuerpos generadas, ha sido necesario el desarrollo de técnicas que permitan la selección de anticuerpos con unas características determinadas entre una población de millones de clones.

Estos sistemas se basan en la presentación del anticuerpo en la superficie de partículas orgánicas que contienen los genes del anticuerpo correspondiente, de forma que se establezca una relación entre la información genética (genotipo) y la función biológica (fenotipo), que en este caso es el reconocimiento del antígeno por parte del anticuerpo. En los últimos años, se han desarrollado estos sistemas empleando diferentes plataformas de expresión tales como células (levaduras, bacterias, células de mamíferos, etc.), proteínas, mRNA y fagos (Hogenboom, 2005). De todos ellos, el sistema que mayor desarrollo y aplicación ha tenido es, sin lugar a dudas, el de presentación en fagos (*phage display*). La tecnología de presentación de anticuerpos en la superficie de fagos se basa en la generación de partículas fágicas que, conteniendo los genes de un anticuerpo, expresan, en su superficie, proteínas de fusión de un fragmento de dicho anticuerpo con una proteína de la cubierta del fago. Con esta finalidad se han empleado varios tipos de fagos como el fago lambda o el T7, aunque los más empleados son los pertenecientes a la familia de los fagos filamentosos Ff, entre los que destaca el M13. Para poder comprender mejor el fundamento de la técnica, a continuación se describen algunos aspectos básicos de este tipo de fagos.

5.2.1. El fago M13.

Como ya se ha comentado, el fago M13 forma parte de la familia de los fagos filamentosos (*inovirus*) que poseen DNA circular monocatenario (ssDNA). Tanto M13 como f1 y fd infectan específicamente a células *E. coli* portadoras del plásmido conjugativo responsable de la formación del pilus F. Este tipo de fagos, conocidos como fagos tipo Ff, se ensamblan a nivel de la membrana de la célula y las partículas virales salen al exterior sin provocar la lisis y, por tanto, la muerte de la bacteria hospedadora, aunque sí disminuyen su velocidad de crecimiento.

5.2.1.1. El genoma del fago.

El genoma de los fagos filamentosos está constituido por una molécula de DNA monocatenario de 6400 nucleótidos, que contiene toda la información necesaria para la síntesis de sus 11 proteínas. A lo largo del genoma, los genes están agrupados según la función de las proteínas que codifican. Así, los productos de los genes II, V y X son necesarios para la replicación, los genes VII, IX, VIII, III y VI codifican las proteínas de la cubierta, y un tercer grupo (genes I, IX y IV) codifica las proteínas involucradas en el ensamblaje del fago. Existe también una zona que no codifica ninguna proteína, denominada región intergénica (IG), que contiene los sitios de origen de la síntesis de las cadenas (+) y (-) del DNA viral y la señal de empaquetamiento (PS) (Webster, 2001) (Figura 1.3).

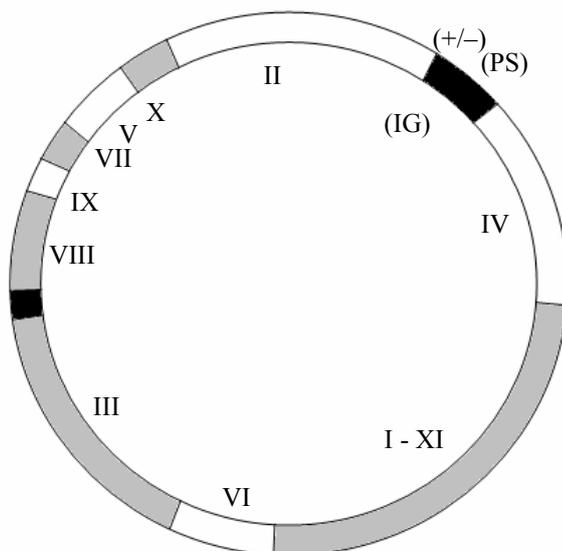


Figura 1.3. Mapa de genes representativo de un fago filamentosos. Las zonas en negro representan las regiones intergénicas que no codifican ninguna proteína. El origen de replicación de las cadenas se ha indicado como (+/-) y la señal de empaquetamiento como PS.

5.2.1.2. Estructura del fago filamentoso.

La partícula del fago presenta una estructura cilíndrica flexible de unos 900 nm de largo por 6.5 nm de diámetro y su peso es de, aproximadamente, 16.3 MDa. La mayor parte de su cubierta está formada por 2700 copias de una proteína de 50 aminoácidos y estructura secundaria de α -hélice (pVIII).

En uno de sus extremos, el fago presenta 5 copias de la proteína pVII y otras 5 de pIX (Figura 1.4). Estas proteínas interactúan con la señal de empaquetamiento situada en una región intergénica del genoma del fago y son las primeras en emerger de la bacteria durante el proceso de ensamblaje. Aunque no se conoce con exactitud la disposición de estas proteínas, se piensa que las 5 copias de pIX están expuestas al exterior ocultando a las copias de pVII.

El proceso de ensamblaje termina con la incorporación, en el otro extremo de la partícula, de 5 copias de las proteínas pIII y pVI. La proteína pIII posee tres dominios, N1, N2 y CT, separados por regiones flexibles ricas en glicina. El dominio N1 es necesario para la translocación del DNA viral al interior del citoplasma y la inserción de las proteínas de la cubierta en la membrana de la célula, mientras que el dominio N2 es el responsable de la unión con el pilus F. Ambos dominios interactúan mediante puentes disulfuro adoptando una estructura de herradura que se modifica durante el proceso de infección. Por su parte, el dominio CT es necesario para mantener la estabilidad de la partícula de fago ya que interactúa con otras proteínas de membrana.

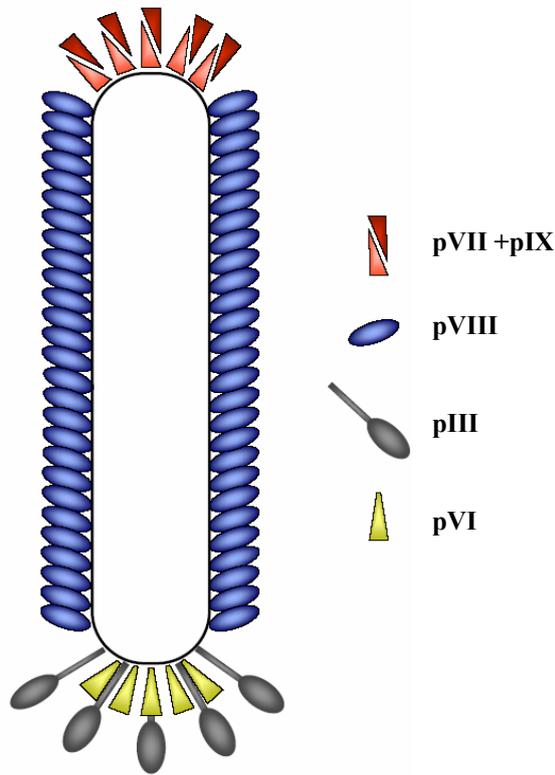


Figura 1.4 Representación esquemática de la estructura de un fago filamentos, que muestra la distribución de las proteínas de la cubierta.

5.2.1.3. Ciclo infeccioso del fago filamentos.

Los fagos filamentos Ff infectan exclusivamente bacterias que presentan en su superficie el denominado *pilus* sexual codificado por el factor F. Este *pilus* es una estructura tubular formada por proteínas (pilina) que participa en la transferencia del plásmido F de una bacteria portadora a una que carece de él.

El proceso de infección se inicia cuando el dominio N2 de la proteína pIII del fago interactúa con el *pilus* de la bacteria. Esta interacción provoca que el *pilus* se retraiga, atrayendo a la proteína pIII hacia el citoplasma de la célula. De este modo, el dominio N1 interactúa con algunas proteínas de membrana de la bacteria iniciando una reacción en cadena que elimina las proteínas de la cubierta

viral y permite al DNA entrar en la célula. Una vez en el citoplasma, la polimerasa bacteriana transforma el DNA monocatenario en su forma replicativa de doble cadena llamada rfDNA, que sirve como molde tanto para la transcripción de proteínas como para la formación del ssDNA de la progenie. Cuando se alcanza una determinada concentración de la proteína pV, los dímeros de esta proteína se unen a la hebra (+) del DNA formando un complejo que se dirige a la membrana de la célula, donde pV es sustituida por las proteínas de la cubierta al mismo tiempo que la nueva partícula viral es expulsada al exterior, manteniendo la integridad de la membrana de la célula hospedadora (Figura 1.5).

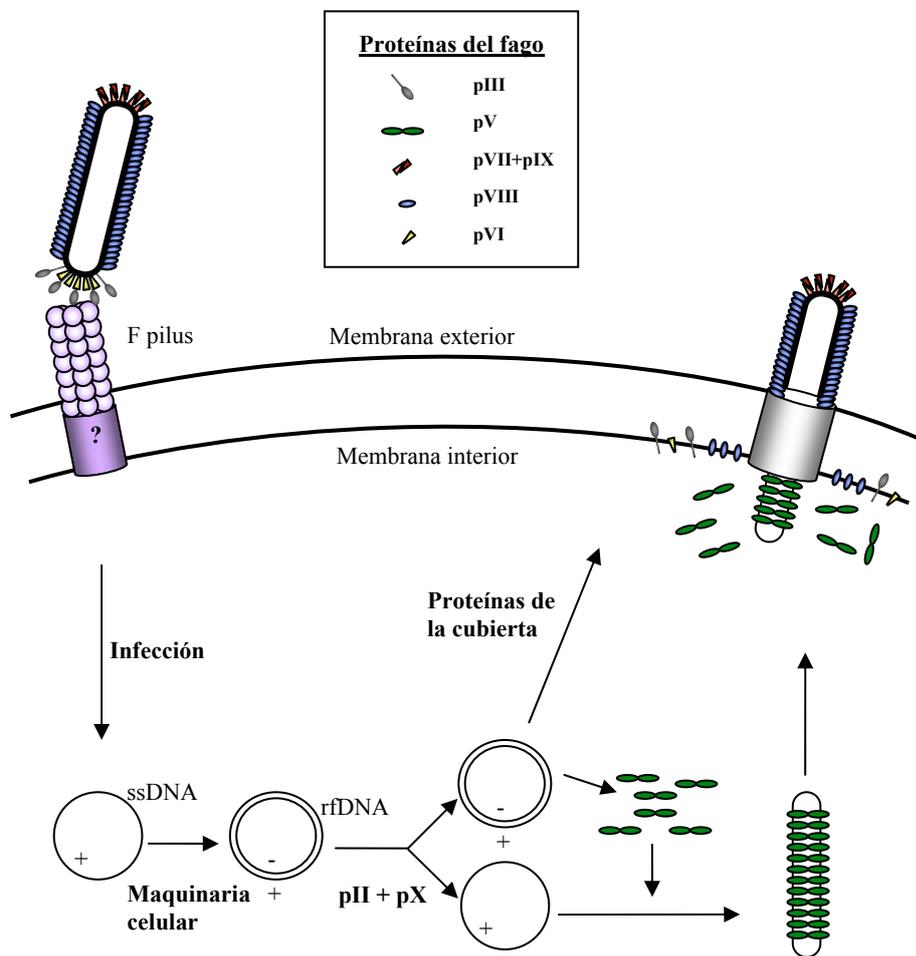


Figura 1.5. Representación esquemática del ciclo infeccioso de los fagos Ff filamentosos.

5.2.2. *Expresión de proteínas foráneas en la superficie de fagos filamentosos.*

En 1985, Smith demostró que algunos fragmentos de la endonucleasa *EcoR1* podían fusionarse al extremo amino terminal de la proteína pIII del fago filamentoso para formar una proteína quimérica capaz de empaquetarse con la partícula fágica. Los fagos quiméricos presentaban infectividad defectiva, pero eran capaces de propagarse; además, se podían purificar, por afinidad, de una mezcla donde la mayoría de fagos no expresaban *EcoR1* (Webster, 2001). Estos estudios estimularon las investigaciones posteriores en este campo y favorecieron el establecimiento de la tecnología de presentación de péptidos y proteínas en la superficie de fagos (*phage display*).

Como ya se ha comentado, el principio fundamental de la tecnología de presentación en superficie de fagos reside en la unión fenotipo-genotipo. La secuencia de DNA, que codifica el péptido o proteína que se quiere mostrar en la superficie del fago, se inserta entre el péptido señal y la región amino-terminal de la proteína de la cubierta. Estos genes híbridos se traducen en proteínas de fusión que se dirigen al periplasma y, durante el proceso de ensamblaje, se incorporan en la cubierta del fago emergente, mientras que el material genético se empaqueta en la misma partícula fágica en forma de DNA monocatenario. Por tanto la unión fenotipo-genotipo se produce antes de que el fago sea expulsado al exterior de la célula y los fagos producidos por una misma bacteria son clones idénticos. Las proteínas de cubierta más empleadas para la expresión de péptidos foráneos son pIII y pVIII.

5.2.2.1. Tipos de vectores.

En la tecnología de presentación de fagos se utilizan, principalmente, dos tipos de vectores. Los más sencillos son aquellos que derivan directamente del genoma del fago filamentoso (M13, f1 o fd) y que codifican todas las proteínas necesarias para su replicación y ensamblaje. En este tipo de vectores, el péptido de interés se puede clonar directamente unido a la proteína de la cubierta (Cwirla *et al.*, 1996; Scott y Smith, 1990; Kay *et al.*, 1993; Petrnko *et al.*, 1996) o se puede insertar como un casete con una copia adicional de la proteína original (McLafferty *et al.*, 1993; Haaparanta y Huse, 1995). En el primer caso, los fagos emergentes presentan sólo las proteínas de fusión, mientras que en el segundo caso presentan tanto las proteínas de fusión como las de tipo salvaje.

Habitualmente, la proteína de la cubierta empleada para la fusión en este tipo de vectores es la pIII, ya que la fusión a pVIII presenta importantes restricciones en el tamaño del fragmento que se quiere clonar. Por otro lado, estos vectores se emplean casi exclusivamente para clonar bibliotecas de péptidos, ya que la expresión de otro tipo de moléculas como scFv o Fab puede afectar tanto al ensamblaje como a la infectividad de los nuevos fagos. Además, cuanto mayor es la proteína de fusión resultante, más susceptible es de plegarse incorrectamente y de convertirse, por tanto, en diana de las proteasas bacterianas.

El segundo tipo de vectores empleados en la tecnología de *phage display* es el de los denominados fagémidos. Un fagémido es un híbrido fago-plásmido que posee, además del origen de replicación propio del plásmido, el origen de replicación derivado de los fagos filamentosos situado en la región intergénica. Como ya se ha comentado en el apartado anterior, esta región intergénica, además de su función en la replicación del DNA, contiene la señal que permite el empaquetamiento del DNA monocatenario en la cubierta del virus. El vector híbrido posee también genes de resistencia a antibióticos y los sitios de restricción donde se inserta el péptido o la proteína de interés.

La formación de partículas fágicas sólo se consigue si el resto de proteínas del fago están presentes en la célula. Para ello, las células se infectan con un fago adyuvante que proporciona todas las proteínas y enzimas necesarias para la replicación del fagémido, la producción de DNA monocatenario y el empaquetamiento. La maquinaria de replicación y ensamblaje, actúa tanto sobre el genoma del fagémido como sobre el del propio fago adyuvante, por lo que se pueden producir dos tipos de partículas, según el genoma que sea empaquetado (Figura 1.6). Los fagos que contienen el genoma del fago adyuvante no son de interés por lo que, habitualmente, los fagos adyuvantes empleados en la superinfección poseen un origen de replicación defectivo. Un ejemplo de este tipo de fagos adyuvantes es el M13K07 (GE Healthcare). Cuando este fago se cultiva solo, el origen de replicación alterado funciona lo suficientemente bien como para producir un título alto. En cambio, en presencia del fagémido, el origen de replicación de M13K07 es bastante menos eficiente que el del híbrido, lo que favorece la replicación y, por tanto, el empaquetamiento de partículas que contienen el genoma del fagémido (Vispo, 2001).

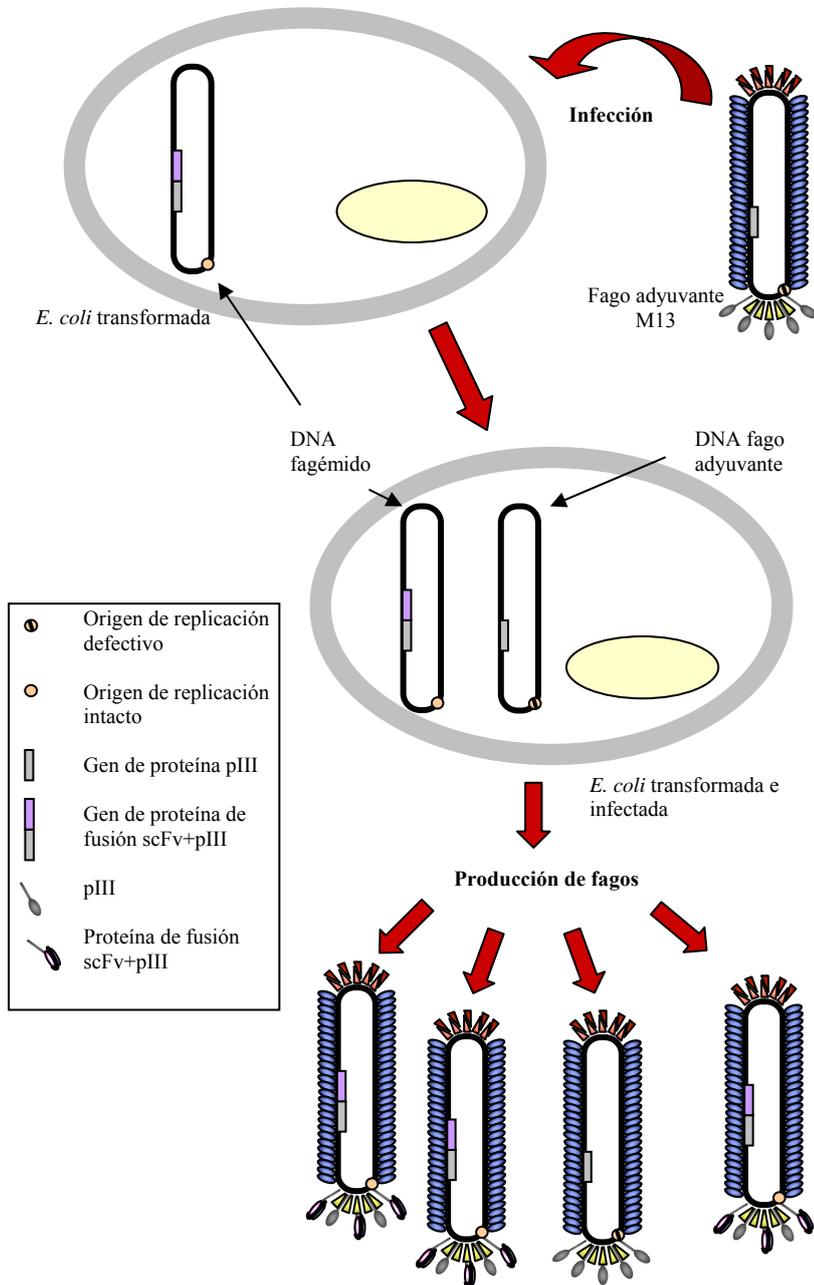


Figura 1.6. Producción de fagos recombinantes que expresan en su superficie proteínas foráneas.

Un ejemplo de fagémido que cumple las características anteriormente descritas es el pAK100. En la Figura 1.7 se muestra la distribución de los genes más relevantes del DNA de dicho fagémido. *Tet* y *cam* son genes que confieren resistencia a los antibióticos tetraciclina y cloramfenicol, respectivamente. En las regiones que flanquean al gen de resistencia a tetraciclina se encuentran los sitios de corte de la enzima de restricción *Sfi*I y es, por tanto, la zona donde se inserta el fragmento de anticuerpo recombinante. Los plásmidos que hayan incorporado el fragmento perderán la resistencia a tetraciclina pero mantendrán la resistencia a cloramfenicol, lo que permitirá seleccionar las bacterias transformadas. *Col E1* es el origen de replicación del plásmido mientras que *fl ori* es el origen que activa la maquinaria de replicación de los fagos filamentosos. La expresión del fragmento recombinante está controlada por el promotor Lac (*Lac pro*) que a su vez está regulado por el inhibidor *Lac I*, que junto con el terminador fuerte t_{HP} , inhibe la expresión del fragmento recombinante en presencia de glucosa en el medio. La secuencia líder *pelB* precede al sitio de inserción del anticuerpo y, tras la expresión, dirige la proteína hacia el espacio periplásmico permitiendo que pueda ensamblarse en la cubierta del fago. Tras el sitio de inserción del anticuerpo se encuentra la secuencia diana *myc*, que puede emplearse posteriormente para la detección y/o purificación del fragmento, seguida de un codón ámbar de parada y del gen que codifica la proteína truncada (en este caso pIII) de la cubierta del fago. Finalmente, tras el casete de expresión se encuentra el terminador T_{Ipp} (Krebber *et al.*, 1997).

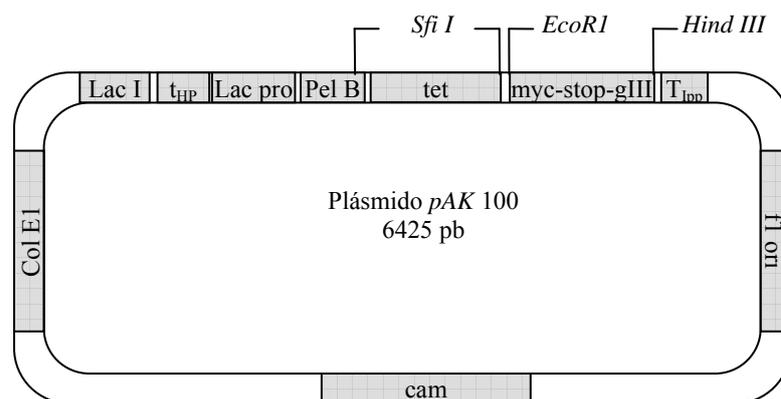


Figura 1.7. Representación del mapa de genes del plásmido pAK 100.

5.2.3. Enriquecimiento de bibliotecas: *biopanning*.

Una vez se ha conseguido una población de fagos que expresan en su superficie los anticuerpos recombinantes provenientes de la biblioteca, se aplica un proceso cíclico conocido como *panning* o *biopanning* que permite enriquecer una biblioteca dada con aquellos anticuerpos que reconocen al antígeno. El proceso de *panning* consta de tres etapas fundamentales. En primer lugar, una alícuota de la biblioteca de fagos recombinantes se incuba con el antígeno inmovilizado, capturando los fagos que expresan AcRbs que interactúan con el antígeno. A continuación, los fagos que no han interactuado con el antígeno se eliminan mediante lavados. Finalmente, los fagos unidos a la molécula diana se eluyen y se expanden mediante la infección de bacterias. Las bacterias infectadas generan una nueva población de fagos que puede someterse a un nuevo ciclo, y así sucesivamente hasta alcanzar el grado de enriquecimiento requerido. En la Figura 1.8 se representa un esquema del proceso de *panning*.

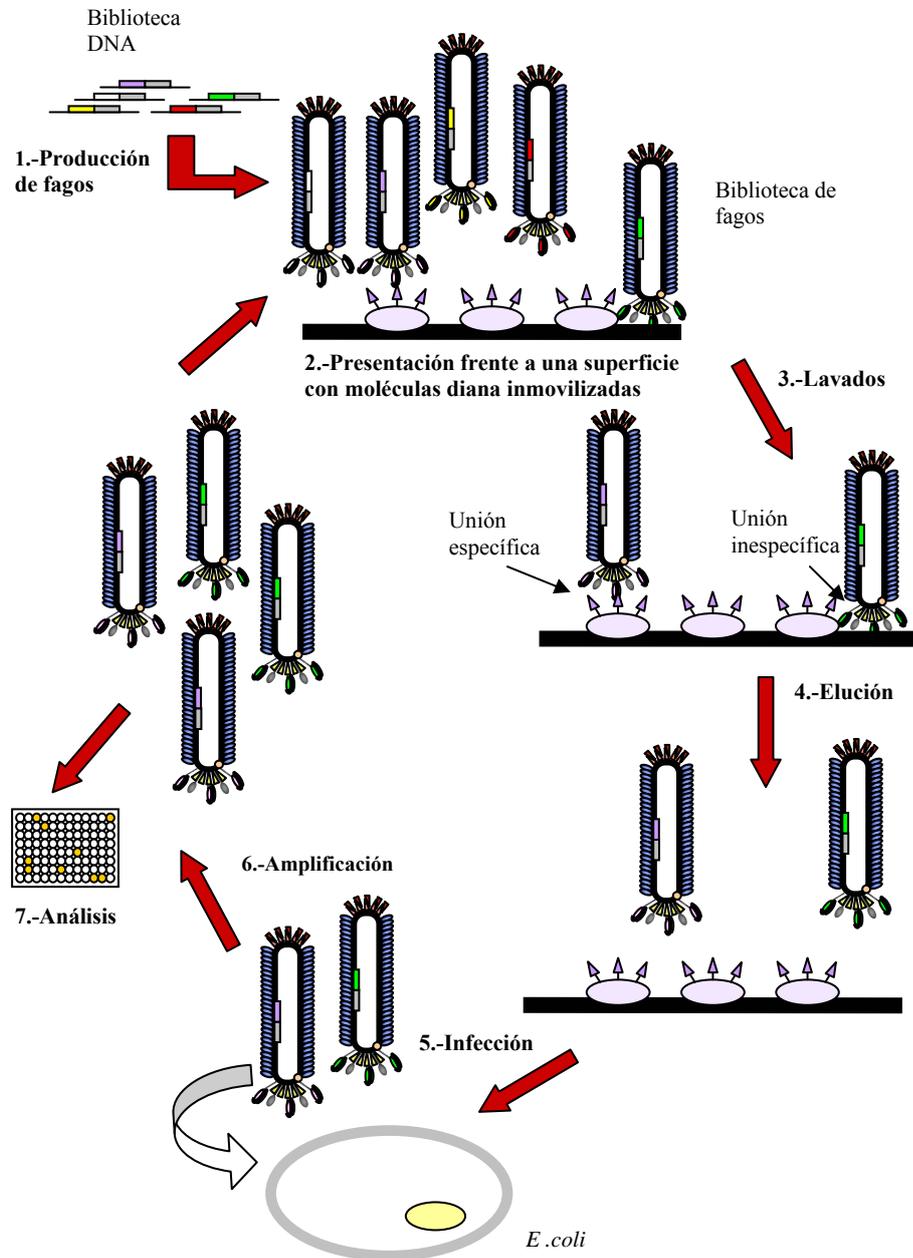


Figura 1.8. Esquema general del proceso de enriquecimiento de bibliotecas de fagos recombinantes: *biopanning*.

Existen varios tipos de *panning* en función del soporte del antígeno. Los soportes más utilizados son los tubos de plástico o los pocillos de placa ELISA, pero también se ha descrito el empleo de otros soportes como partículas magnéticas, placas Petri o columnas de lecho activado con el antígeno (Brichta *et al.*, 2005).

Por otro lado, la etapa de elución de los fagos puede llevarse a cabo de diferentes maneras. Habitualmente, se realiza de manera inespecífica, bien empleando tampones ácidos HCl-glicina, soluciones básicas de trietilamina, agentes caotrópicos, agentes reductores que provoquen la ruptura de los puentes disulfuros entre el soporte y la molécula diana o incluso mediante ruptura enzimática con proteasas (Hoogenboom *et al.*, 1998). Sin embargo, cuando se trata de AcRbs que reconocen a moléculas orgánicas de bajo peso molecular, este tipo de elución suele proporcionar fagos que presentan una afinidad elevada hacia el hapteno conjugado, pero no hacia el analito. En 1997, Krebber *et al.*, demostraron que se obtenían anticuerpos de mayor afinidad si la elución de partículas fago-anticuerpo se realizaba específicamente utilizando una concentración determinada del analito en cuestión. Unos años más tarde, Charlton *et al.* (2001) aplicaron ambos tipos de elución a la obtención de anticuerpos recombinantes frente a atrazina. En este caso, además, para cada ciclo adicional disminuyeron progresivamente tanto la concentración del conjugado de captura como la del plaguicida en la elución específica. De este modo obtuvieron anticuerpos recombinantes de elevada afinidad. En concreto, observaron que los anticuerpos obtenidos mediante elución específica mostraban una afinidad hacia el analito al menos 1000 veces superior a cualquiera de los anticuerpos obtenidos mediante elución inespecífica con una solución de trietilamina. Por tanto, aunque para determinadas aplicaciones es suficiente la utilización de la elución inespecífica en los ciclos de *panning*, para otras, en las que se requieran anticuerpos de gran afinidad, puede ser conveniente llevar a cabo una elución específica, especialmente si se trata de analitos de bajo peso molecular. Además, el diseño de unas condiciones cada vez más restrictivas puede proporcionar fagos que expresen AcRb de mayor afinidad.

5.2.4. Análisis de fagos recombinantes.

Después del proceso de enriquecimiento, los AcRbs se pueden analizar mediante el empleo de diferentes métodos. Así, aunque algunos autores emplean tecnologías como el *western blot* para determinar aquellos clones que han incorporado el fragmento scFv de interés (Sholthoff *et al.*, 1997), los ELISAs con el conjugado inmovilizado son los métodos más extendidos ya que permiten analizar de manera rápida un gran número de clones en función de la afinidad del anticuerpo recombinante hacia el hapteno conjugado y hacia el analito. Existen dos tipos fundamentales de inmunoensayos para el cribado y selección de AcRbs: ELISA de fagos y ELISA de fracción soluble scFv-pIII. Habitualmente se realizan ensayos con el hapteno conjugado inmovilizado y se requiere un anticuerpo secundario capaz de reconocer, bien alguna proteína de la cubierta del fago, bien alguna secuencia diana del fragmento scFv-pIII. Algunos autores han publicado la obtención de anticuerpos recombinantes frente a moléculas pequeñas mediante la aplicación del ELISA de fagos como método de cribado (Li *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 1997; Charlton *et al.*, 2001; Krebber *et al.*, 1996). Otros autores, en cambio, han descrito problemas relacionados con el empleo de este sistema para la detección de AcRbs frente a este tipo de moléculas (Kramer y Hoch, 1996; Garret *et al.*, 1997; Tout *et al.*, 2001). Así, se ha observado que, en ocasiones, los fagos recombinantes presentan dificultades para reconocer al analito en disolución en un ELISA competitivo. Esto se debe, principalmente, a dos factores: en primer lugar, debido a las interacciones inespecíficas que puede presentar el fago hacia el soporte del ELISA y, en segundo lugar, debido a la valencia del fago, ya que si presenta en su superficie más de una molécula de AcRb, se requiere mayor concentración de analito para desplazar la unión fago-hapteno conjugado. Por tanto, el fago recombinante no tiene por qué presentar las mismas características analíticas que el AcRb, lo que puede interferir a la hora de seleccionar anticuerpos en función de su afinidad. Por este motivo, algunos autores han optado por la expresión del fragmento soluble y su posterior determinación mediante ELISA como método de cribado y selección de AcRbs (Kramer y Hoch, 1996; Garret *et al.*, 1997; Alcocer *et al.*, 2000; Nishi *et al.*, 2005).

5.3. Expresión de anticuerpos recombinantes.

Se ha descrito la producción de anticuerpos recombinantes en varios tipos de células. En concreto, en el caso del fragmento de anticuerpo más comúnmente empleado, el scFv, se ha publicado su obtención en células eucarióticas (levaduras, plantas, mamíferos o insectos), aunque el sistema más habitual de producción de este tipo de fragmentos es la expresión en bacterias, especialmente en *E. coli*. Las bacterias ofrecen ciertas ventajas sobre otros tipos celulares, como son los altos niveles de expresión de proteínas y el bajo coste de los medios de cultivo empleados. Además, los procesos celulares de *E. coli* se conocen ampliamente, lo que facilita la manipulación genética y la caracterización de la expresión proteica, encaminadas a aumentar tanto la cantidad como la calidad de la proteína de interés. Por otro lado, la carencia de glicosilación de los sistemas bacterianos no interfiere negativamente en la expresión de scFv ya que este tipo de molécula no contiene el fragmento constante glicosilado de la cadena pesada y, por tanto, no requiere glicosilación para aumentar su actividad o su solubilidad (Leong y Chen, 2008).

La expresión bacteriana de la proteína scFv puede producirse a través de tres vías: mediante la expresión soluble citoplasmática, por formación de cuerpos de inclusión y mediante la secreción periplásmica, siendo esta última la más habitual. La expresión periplásmica favorece el correcto plegamiento de la proteína, debido a que el entorno oxidante del periplasma es adecuado para la formación de puentes disulfuro. Este método, además, puede ser ventajoso para la producción de scFv a gran escala debido a que la recuperación del producto periplásmico puede llevarse a cabo sencillamente mediante choque osmótico (Leong y Chen, 2008).

Aunque se ha demostrado que niveles de expresión muy elevados pueden dar como resultado la formación de agregados en el periplasma (Whitlow y Filpula, 1991; Kipriyanov *et al.*, 1994), también se ha descrito que controlando las condiciones de cultivo se puede disminuir, o incluso inhibir, la agregación de scFv (Kipriyanov *et al.*, 1997).

Finalmente, se ha comprobado que los fragmentos scFv se pueden secretar al medio de cultivo (Ward *et al.*, 1989). La cantidad de proteína secretada al medio depende de la cepa bacteriana, de las condiciones de incubación, de la concentración del inductor de la expresión y de la propia naturaleza de la

secuencia de la proteína (Knappik y Plückthun, 1995). Estas condiciones se pueden modificar para regular la proporción de proteína secretada, ya que la secreción del fragmento scFv al medio de cultivo puede aportar ciertas ventajas como son la rápida detección de la proteína y la purificación directa de la misma a partir del medio de cultivo.

6. APLICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS RECOMBINANTES AL ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS.

La tecnología de producción de anticuerpos recombinantes se ha desarrollado ampliamente y ha tenido especial aplicación en el campo clínico debido a que, en la mayoría de los casos, las moléculas frente a las cuales se producían los anticuerpos eran de gran tamaño, normalmente proteínas. Sin embargo, a la hora de implementar estas técnicas para la obtención de anticuerpos recombinantes frente a pequeñas moléculas orgánicas, como es el caso de los plaguicidas, han surgido bastantes dificultades (Daly *et al.*, 2001; Spinks *et al.*, 2000).

Los primeros estudios sobre la aplicación de la ingeniería genética para la obtención de fragmentos de anticuerpo destinados al análisis medioambiental se realizaron a principios de los 90 por el grupo de investigadores del Dr. B. Hammock. Así, en 1993, Ward *et al.* publicaron el primer trabajo sobre la clonación de genes de anticuerpos frente a plaguicidas, en concreto atrazina. En un principio, la mayoría de los esfuerzos se centraron en la obtención de genes de anticuerpos derivados de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales. Durante los años siguientes, se publicaron numerosos trabajos sobre la obtención de esta clase de anticuerpos, bien como fragmento scFv o bien como Fab, frente a plaguicidas u otras sustancias de interés medioambiental y agroalimentario (Kramer y Hock, 2003). En muchos de estos estudios, las propiedades analíticas de los anticuerpos recombinantes son semejantes o incluso peores que las del anticuerpo monoclonal de partida. Esto puede llevar a pensar que el empleo de técnicas de ingeniería genética para la obtención de anticuerpos recombinantes procedentes de hibridomas implica una pérdida de tiempo y recursos, ya que por un lado no evita la etapa limitante de fusión y selección de hibridomas y por otro, en la mayoría de los casos, no aporta mejoras importantes de las propiedades analíticas con respecto al anticuerpo monoclonal. Sin embargo, como ya se ha mencionado a lo largo de este trabajo, una vez obtenido el anticuerpo en cuestión, el fácil acceso al material genético supone una gran ventaja. De este modo, a partir de un anticuerpo recombinante existente se pueden generar bibliotecas de anticuerpos con diferentes propiedades, empleando distintas técnicas de mutagénesis tales como mutagénesis aleatoria, mutagénesis dirigida o mezcla de cadenas (Sheedy *et al.*, 2007).

Los siguientes esfuerzos para obtener anticuerpos recombinantes de alta afinidad para compuestos de bajo peso molecular estuvieron encaminados a

evitar el paso de la producción de hibridomas, es decir, utilizar directamente linfocitos procedentes de animales inmunizados (pollos, ratones, conejos, ovejas...) como material de partida. Sin embargo, pese a las prometedoras ventajas de esta tecnología, la obtención de anticuerpos recombinantes a partir de linfocitos de animales inmunizados se ha aplicado en escasas ocasiones al análisis medioambiental. Uno de los primeros intentos fue publicado por Karu *et al.* (1994) quienes emplearon una biblioteca aleatoria para la obtención de anticuerpos recombinantes frente a diuron. Sin embargo los anticuerpos obtenidos no eran adecuados para su uso analítico ya que mostraban muy poca afinidad hacia el analito libre. Muchos de los trabajos publicados desde entonces se han centrado en el estudio de la etapa de enriquecimiento y selección de anticuerpos, ya que es un paso crucial en la obtención de anticuerpos de alta afinidad. Algunos de los resultados obtenidos son alentadores. Así, Tout *et al.* (2001) lograron aislar anticuerpos recombinantes de afinidad moderada frente a picloram forzando las condiciones de lavado durante los ciclos de enriquecimiento y Charlton *et al.* (2001) obtuvieron anticuerpos de alta afinidad frente a atrazina empleando elución específica en el proceso de *panning* y disminuyendo paulatinamente tanto la concentración de conjugado como la de analito.

En la Tabla 1.1 se recoge gran parte de los artículos publicados sobre la obtención de anticuerpos recombinantes frente a plaguicidas u otras moléculas de interés medioambiental y agroalimentario. En ella se indica el material genético de partida (hibridomas o linfocitos), la especie de procedencia y el tipo de fragmento producido.

En general, los artículos publicados hasta la fecha que presentan resultados de determinación del analito de estudio en muestras reales son escasos. Así, aunque algunos autores como Yuan *et al.* (1997), Yau *et al.* (1998) y Yang *et al.* (2006) realizan curvas estándar en matrices reales, sólo los trabajos de Gerret *et al.* (1997), Nishi *et al.* (2005) y Li *et al.* (2006) proporcionan datos de recuperación del analito en muestras fortificadas.

Tabla 1.1. Resumen de los artículos publicados sobre obtención de anticuerpos recombinantes para detección de plaguicidas o pequeñas moléculas de interés medioambiental y/o agroalimentario.

Molécula diana	Tipo de fragmento	Material genético	Determinación en muestras	Referencia
Paraquat	scFv	Hibridomas	No	Graham <i>et al.</i> , 1995
s-triazinas	scFv	Linfocitos de ratón	No	Kramer y Hock, 1996
Diuron	Fab	Hibridomas	No	Scholthof <i>et al.</i> , 1997
Ciclohexanodiona	scFv	Hibridomas	No	Webb <i>et al.</i> , 1997
Paration	scFv	Hibridomas	Sí	Garret <i>et al.</i> , 1997
Zearalenona	scFv	Hibridomas	No	Yuan <i>et al.</i> , 1997
Picloram	Fab	Hibridomas	No	Yau <i>et al.</i> , 1998
Dioxina	Fab	Hibridomas	No	Lee <i>et al.</i> , 1998
Atrazina	scFv	Hibridomas	No	Strachan <i>et al.</i> , 1998
Atrazina y Paraquat	scFv	Hibridomas	No	Longstaff <i>et al.</i> , 1998
Mecoprop	scFv	Hibridomas	No	Strachan <i>et al.</i> , 1999
Atrazina	scFv	Hibridomas	No	Grant <i>et al.</i> , 1999
2,4-D	Fab	Hibridoma	No	Gerdes <i>et al.</i> , 1999
Clorpirifos	scFv	Hibridomas	No	Alcocer <i>et al.</i> , 2000
Atrazina y Mecoprop	scFv	Linfocitos de conejo	No	Li <i>et al.</i> , 2000
PCBs	Fab	Hibridomas	No	Chiu <i>et al.</i> , 2000
Atrazina	scFv	Linfocitos de oveja	No	Charlton <i>et al.</i> , 2001
Picloram	scFv	Linfocitos de ratón	No	Tout <i>et al.</i> , 2001
Derivados de s-atrazina	scFv	Linfocitos de conejos	No	Kramer, 2002
Sulfonamidas	scFv	Hibridomas	No	Korpimaki <i>et al.</i> , 2002
Deoxynivalenol	scFv	Hibridomas	No	Choi <i>et al.</i> , 2004
Triazina	scFv	Hibridomas	Sí	Nishi <i>et al.</i> , 2005
Sulfametazina	scFv	Hibridomas	No	Yang <i>et al.</i> , 2006
Metamidofos	scFv	Linfocitos de ratón	Sí	Li <i>et al.</i> , 2006

7. FUNGICIDAS AZÓLICOS.

7.1. Generalidades.

Los fungicidas azólicos constituyen una amplia familia de fungicidas usados para prevenir o curar infecciones causadas por hongos en frutos, vegetales y plantas ornamentales, y son, por tanto, una importante herramienta en la lucha contra plagas de hongos en actividades agrícolas.

Químicamente, estos compuestos están constituidos por diferentes anillos aromáticos, y su característica común es la presencia de uno o más anillos heterocíclicos de cinco átomos (azoles), de los cuales dos o tres son átomos de nitrógeno (imidazoles y triazoles, respectivamente) (Fortún, 1998) (Figura 1.9).

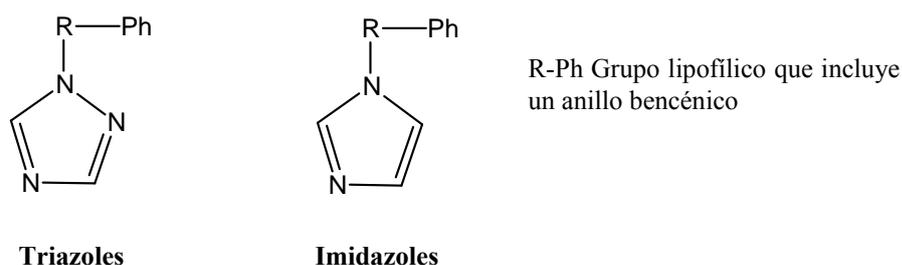


Figura 1.9. Estructura general de los fungicidas azólicos.

El mecanismo molecular de acción de ambos tipos de fungicidas azólicos es común y consiste en la inhibición de la biosíntesis del ergosterol. Más concretamente, los fungicidas azólicos actúan inhibiendo la acción de la enzima C-14 demetilasa, que es responsable de la 14- α -demetilación del lanosterol, precursor del ergosterol (Figura 1.10). El ergosterol es uno de los esteroides principales de los hongos, ya que es un componente indispensable para mantener la estructura de la membrana, y su disminución o su ausencia afectan en diferente medida a la permeabilidad de la membrana. De este modo, la aplicación de dosis bajas de azoles provoca un retraso en el crecimiento de los hongos, mientras que a dosis elevadas, actúan como fungicidas propiamente dichos destruyendo por completo la membrana de los hongos.

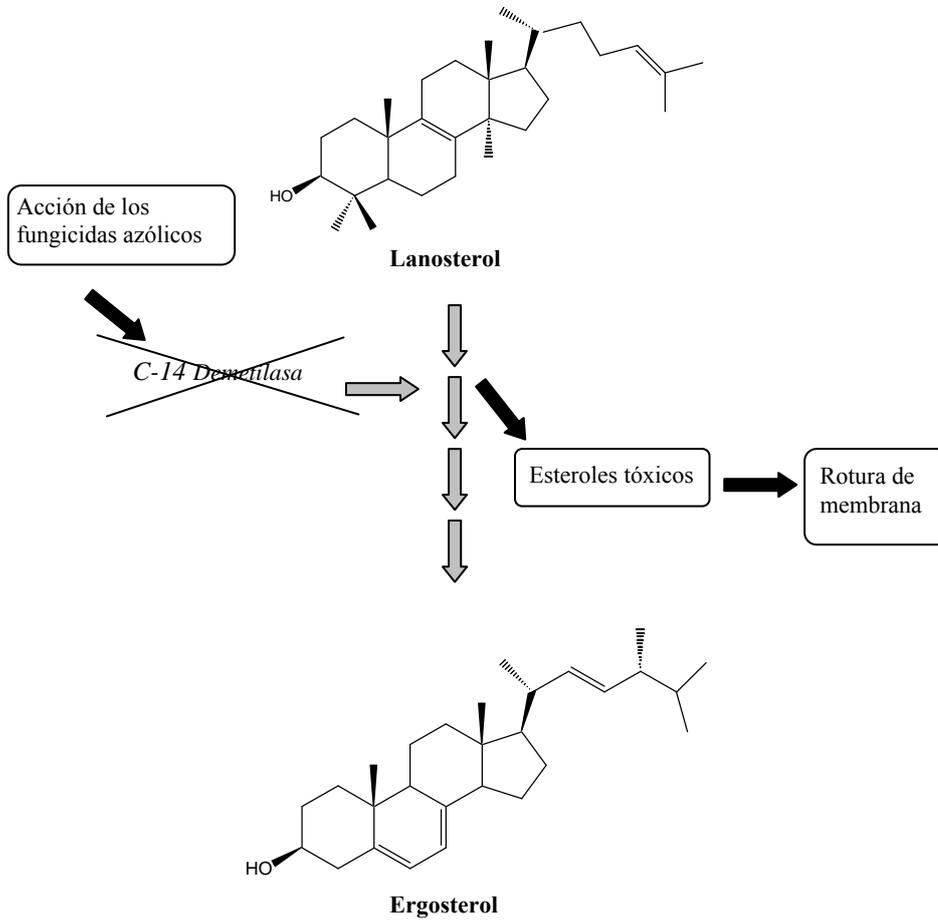


Figura 1.10. Esquema general del mecanismo de acción de los fungicidas azólicos.

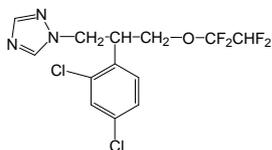
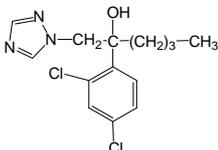
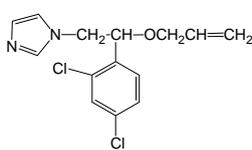
7.2. Tetraconazol, hexaconazol e imazalil.

En la Tabla 1.2 (A y B) se muestran las estructuras y las principales características físico-químicas de los tres fungicidas azólicos en los que se centra este estudio; tetraconazol, hexaconazol e imazalil (Tomlin, 1997).

El **tetraconazol** se comercializó por primera vez en 1988 por Agrimont S.p.A (actualmente Isagro S.p.A). Se trata de un fungicida sistémico de amplio espectro, con propiedades protectoras, curativas y erradicantes (Tomlin, 1997). Resulta efectivo para el control de diversas enfermedades de origen fúngico como el oídio, la roya o la cercosporosis (*Erysiphe communis*, *Uromyces spp*, *Cercospora betae*), entre otros, y se ha empleado en plantaciones de alcachofa, cucurbitáceas, fresa, frutales de pepita, melocotonero, nectarino, ornamentales herbáceas, ornamentales leñosas, remolacha azucarera, tomate, trigo y vid (De Liñán, 2000). Según la legislación europea, el tetraconazol se encuentra en la lista de sustancias permitidas según el Anexo I de la Directiva 91/414/CEE. Los LMRs comunitarios en productos de origen vegetal, establecidos según el Reglamento (CE) 149/2008, oscilan entre 0.02 (límite inferior de la determinación analítica) y 0.5 mg/kg, según el tipo de cultivo (EU Pesticide Database).

Según estudios medioambientales, el tetraconazol tiende a acumularse en suelo y puede llegar a alcanzar aguas superficiales. Se trata de una sustancia moderadamente tóxica para peces de agua dulce y salada, y para invertebrados de agua dulce, pero es altamente tóxico para invertebrados de agua salada. Su aplicación en las dosis recomendadas no tiene efectos tóxicos para plantas acuáticas o terrestres. Se considera que el tetraconazol, aplicado a dosis orales agudas, es ligeramente tóxico para mamíferos y moderadamente tóxico para aves (United States Environmental Protection Agency, EPA, 2005a). Por último, la EPA ha clasificado al tetraconazol como “probablemente carcinogénico en humanos” (EPA, Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential, 2002).

Tabla 1.2.A Características físico-químicas del tetraconazol, hexaconazol e imazalil.

Propiedad	Plaguicida		
	Tetraconazol	Hexaconazol	Imazalil
Nombre químico (IUPAC)	(RS)-2-(2,4-diclorofenil)-3-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il)propil 1,1,2,2-tetrafluoroetil éter	(RS)-2-(2,4-diclorofenil)-1-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il)hexan-2-ol	(±)-1-(β-aliloxi-2,4-diclorofenil)imidazole
Estructura			
Fórmula molecular	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ F ₄ N ₃ O	C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O	C ₁₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O
Peso molecular (Da)	372.1	314.2	297.2
Estado físico⁽¹⁾	Líquido viscoso incoloro	Sólido blanco cristalino	Masa cristalina amarillenta/marrón
Punto de fusión (°C)	6 ⁽²⁾	110-112	52.7
Punto de ebullición (°C)	Descomposición a 240 °C sin hervir	-	>340
Presión de vapor (mPa)	0.180	0.018	0.158

⁽¹⁾ Estado físico en condiciones normales: 25° C, 1 atm de presión.

⁽²⁾ En el caso de tetraconazol se trata de la temperatura a la que se vuelve completamente fluido.

Tabla 1.2.B Características físico-químicas del tetraconazol, hexaconazol e imazalil.

Plaguicida			
Propiedad	Tetraconazol	Hexaconazol	Imazalil
Coefficiente de partición octanol/agua (log P)	3.6	3.9	3.8
Solubilidad	-En agua (pH 7) 156 g/L -Fácilmente soluble en 1,2-dicloroetano, acetona y metanol	-En agua 0.017 g/L. -En diclorometano, metanol, acetona y etil acetato entre 120 y 336 g/L. -En tolueno 59 g/L. -En hexano 0.8 g/L.	-En agua (pH 7.6) 0.18 g/L. -En acetona, etanol, diclorometano, metanol, isopropanol, benceno, tolueno y xileno >500 g/L. -En hexano 19 g/L. -Soluble en heptano y éter de petróleo.
Estabilidad	-Estable en dilución acuosa con pH de 5 a 9. -Estable en agua frente a la luz solar.	-Estable durante largos periodos de tiempo (hasta 6 años) a temperatura ambiente. -Estable frente a hidrólisis y fotólisis en agua.	-Muy estable frente a hidrólisis en ácidos diluido y en álcalis a temperatura ambiente y ausencia de luz. -Estable hasta 285 °C. -Estable con luz solar en condiciones normales de almacenamiento.

El **hexaconazol** fue comercializado por primera vez por ICI Agrochemicals (actualmente Zeneca Agrochemicals). Es un fungicida sistémico de acción protectora y curativa que se ha usado para el control de hongos Ascomycetos y Basidiomycetos. En particular, se ha empleado frente a *Podosphaera leucotrina* y *Venturia inaequalis* en manzanas, *Guignardia bidwellii* y *Unicula necator* en vid, *Hamileia vastarix* en café y *Cercospora spp.* en cacahuetes. También se ha empleado para tratar plátanos, cucurbitáceas y otros cultivos (Tomlin, 1997). Aunque cuando se comenzó este estudio se trataba de una sustancia permitida en España, con la entrada en vigor de la nueva normativa europea, el hexaconazol ha quedado excluido del Anexo I de la Directiva 91/414/CEE por falta de documentación. Los LMRs comunitarios establecidos para productos agrícolas se encuentran entre 0.02 (límite inferior de la determinación analítica) y 0.1 mg/kg, según el tipo de cultivo (EU Pesticide Database).

El hexaconazol es moderadamente persistente en suelos aeróbicos y anaeróbicos. Presenta baja movilidad en los sistemas terrestres y su potencial de lixiviación es muy limitado, por tanto, es poco probable encontrar presencia de este plaguicida en aguas subterráneas. Es moderadamente tóxico para peces y otros organismos acuáticos invertebrados. Además, la EPA ha clasificado al hexaconazol como “posiblemente carcinogénico en humanos” (EPA, Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential, 2002).

El **imazalil**, también conocido como enilconazol o chloramizol, es el primer fungicida tipo imidazol empleado en agricultura. Se sintetizó en 1983 por *Janssen Pharmaceutica*, y en 1984 se registró por primera vez para su uso en el tratamiento semillas.

Se trata de un fungicida sistémico, con acción protectora y curativa, que controla un amplio espectro de enfermedades producidas por hongos en frutas, vegetales, semillas y plantas ornamentales. Es muy habitual su uso en el tratamiento postcosecha en cítricos y también se emplea para tratar equipamiento y zonas de almacenamiento de huevos en granjas avícolas. En concreto, se emplea para el tratamiento del oidio en cucurbitáceas y plantas ornamentales, así como de enfermedades del almacenamiento de cítricos, manzana, plátanos, semillas y patatas, producidas por *Penicillium*, *Gloeoporum*, *Phoma spp.*, etc. También se aplica en semillas de cereales para el control de enfermedades ocasionadas principalmente por *Fusarium* y *Helminthosporium spp.* (Tomlin, 1997).

Según la EPA, actualmente, en Estados Unidos, se emplean alrededor de 2700 Kg de imazalil al año y existen 15 productos registrados que lo contienen como sustancia activa. En Europa, su uso y comercialización está permitido según el Anexo I de la Directiva 91/414/CEE.

Según los datos de la Tabla 1.2 (A y B) el imazalil es moderadamente soluble en agua, estable a la hidrólisis y se degrada rápidamente con la luz; presenta poca movilidad en suelo y no es volátil; además, en condiciones aeróbicas se degrada lentamente en el suelo. Teniendo en cuenta estas características, si se respetaran las condiciones de aplicación, no deberían encontrarse concentraciones significativas de imazalil en el medio ambiente. Además, si se emplea a las dosis recomendadas no supone riesgo de toxicidad aguda o crónica para mamíferos y aves, aunque puede ser moderadamente tóxico en ratas, peces e invertebrados si son expuestos a dosis elevadas (EPA, 2005b). Finalmente, la EPA ha clasificado al imazalil como “probablemente carcinogénico en humanos” (EPA, Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential, 2002).

Los LMRs comunitarios establecidos para el imazalil en productos vegetales se encuentran entre 0.02 (límite inferior de la determinación analítica) y 5 mg/kg, dependiendo del tipo de cultivo (EU Pesticide Database).

8. DETERMINACIÓN DE FUNGICIDAS AZÓLICOS.

8.1. Determinación de fungicidas azólicos mediante técnicas cromatográficas.

Para la determinación de los fungicidas azólicos (triazoles e imidazoles) en muestras agrícolas se ha empleado tanto la cromatografía de gases, GC, como la cromatografía líquida, LC, acopladas a distintos tipos de detectores. En la Tabla 1.3 se recoge gran parte de los artículos publicados hasta la fecha sobre la determinación cromatográfica de los fungicidas en los que se centra este trabajo: tetraconazol, hexaconazol e/o imazalil.

Actualmente, la cromatografía es, indudablemente, el método más extendido para la determinación de plaguicidas en muestras agrícolas debido, fundamentalmente, a la capacidad de detección multiresiduo con bajos límites de detección. No obstante, tal y como se ha comentado anteriormente, la metodología cromatográfica presenta ciertas limitaciones, principalmente en cuanto a la capacidad de muestreo y a sus aplicaciones *in situ*, debido a que requiere equipos complejos y de alto coste y tratamientos laboriosos de las muestras, previos al análisis. Como consecuencia la investigación y desarrollo de métodos alternativos o complementarios es un campo científico de creciente interés agroalimentario.

Tabla 1.3. Detección de tetraconazol, hexaconazol e/o imazalil mediante técnicas cromatográficas.

Autores	Analito(s)	Técnica
Lafuente y Tadeo, 1985	Imazalil y prochloraz	HPLC-UV y GLC-ECD
Tonogai <i>et al.</i> , 1992	6 pesticidas post-cosecha incluido el imazalil	GC-MS y HPLC-detector de fluorescencia (FD)
Yamazaki y Ninomiya, 1996	Imazalil	GC/NPD
Garrido <i>et al.</i> , 1997	Carbendazim e imazalil	HPLC-UV y GC-NPD
Ito <i>et al.</i> , 1998	Tiabendazol e imazalil	HPLC-UV
López y Riba, 1999	Etoxiquin, imazalil e iprodiona	GLC-NPD
Bicci <i>et al.</i> , 2001	6 fungicidas tipo triazol incluidos tetraconazol y hexaconazol	LC-UV
Fernández <i>et al.</i> , 2001	5 fungicidas post-cosecha incluido imazalil	LC-API (ionización a presión atmosférica)-MS
Watanabe <i>et al.</i> , 2001	Imazalil	HPLC-UV
Matsumoto, 2001	Imazalil y su metabolito	GC- ECD
Kimura <i>et al.</i> , 2003	Imazalil y su metabolito	GC-FTD (detector termoiónico de llama) y GC-MS
Sannino <i>et al.</i> , 2004	24 pesticidas incluido tetraconazol	LC- ESI (Ionización en electrospray (ESI)-MS-MS
Yushioka <i>et al.</i> , 2004	4 fungicidas post-cosecha incluido tetraconazol	LC-MS
Zamora <i>et al.</i> , 2004	6 fungicidas incluido imazalil	LC-ESI-MS-MS
Nozal <i>et al.</i> , 2005	8 fungicidas azólicos incluido tetraconazol	HPLC-MS
Schermerhorn <i>et al.</i> , 2005	22 compuestos triazólicos incluidos tetraconazol y hexaconazol	LC-MS-MS
Trösken <i>et al.</i> , 2005	13 fungicidas azólicos incluidos hexaconazol e imazalil	HPLC-MS-MS

8.2. Determinación de fungicidas azólicos mediante ELISA.

En los últimos años, la aplicación de los inmunoensayos tipo ELISA a la determinación de plaguicidas en muestras agroalimentarias se está convirtiendo en una práctica cada vez más habitual debido a las ventajas comentadas en el apartado 2.2. En el caso concreto de la determinación de fungicidas azólicos (triazoles e imidazoles), se han descrito inmunoensayos basados, fundamentalmente, en anticuerpos policlonales. Forlani *et al.* (1992) obtuvieron anticuerpos policlonales frente a tetraconazol y penconazol, y posteriormente, este mismo grupo desarrolló un ELISA para la determinación de tetraconazol en frutas en el rango de 25 a 10000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ con buenos resultados de recuperación (Cairolí *et al.*, 1996). Por otro lado, Székács y Hammock (1995) desarrollaron un ELISA basado en anticuerpos policlonales que reconocían principalmente a myclobutanil, con un LOD de 200 $\mu\text{g}/\text{l}$. Chen *et al.* (1996) obtuvieron anticuerpos policlonales frente a hexaconazol (LOD de 0.1 $\mu\text{g}/\text{l}$) que mostraban una elevada reactividad cruzada (>50%) frente a otros fungicidas azólicos (penconazol y propiconazol). Finalmente, Danks *et al.* (2001) desarrollaron un inmunoensayo con anticuerpos policlonales de elevada especificidad para la determinación de tebuconazol en cereales con un rango de trabajo de 0.02 a 20 mg/Kg .

En lo que respecta a los inmunoensayos basados en anticuerpos monoclonales, Watanabe *et al.* (2000) publicaron el desarrollo de un ELISA de alta sensibilidad (LOD de 0.1 $\mu\text{g}/\text{l}$) frente a imazalil y aplicaron el ensayo a la determinación del plaguicida en frutas obteniendo recuperaciones aceptables (>85%). Una parte del trabajo realizado en esta tesis ha contribuido a la publicación de dos artículos sobre la determinación de fungicidas azólicos en zumos de fruta mediante inmunoensayos basados en anticuerpos monoclonales. Por un lado, Moreno *et al.* (2007) desarrollaron un ELISA basado en anticuerpos monoclonales frente a imazalil con un LOD de 0.6 $\mu\text{g}/\text{l}$ y, por otro lado, Manclús *et al.* (2008) describieron un inmunoensayo específico para hexaconazol con un LOD de 0.3 $\mu\text{g}/\text{l}$ y un inmunoensayo específico de triazoles (tetraconazol, penconazol, cyproconazol y myclobutanil) con un LOD entre 0.1 y 0.7 $\mu\text{g}/\text{l}$.

9. OBJETIVOS.

A lo largo de esta introducción se ha puesto de manifiesto la importancia del uso de plaguicidas en la agricultura, así como los riesgos derivados de su empleo. Por ello, es de suma importancia disponer de métodos eficaces para el análisis de residuos de plaguicidas en muestras agroalimentarias y medioambientales. Las técnicas habitualmente empleadas con esta finalidad son las técnicas cromatográficas tales como HPLC o GC; sin embargo, estas técnicas presentan ciertas limitaciones relacionadas fundamentalmente con su complejidad. Como consecuencia, en los últimos años se han desarrollado otros métodos de análisis más rápidos y sencillos, que complementan a los métodos cromatográficos, entre los que destacan, sin lugar a dudas, los inmunoensayos.

Una etapa crítica en el desarrollo de un inmunoensayo es la obtención de anticuerpos con unas características analíticas determinadas. La tecnología de hibridomas supuso un gran avance en la metodología inmunoanalítica al permitir la obtención de anticuerpos monoclonales con unas propiedades determinadas y en cantidades ilimitadas. Del mismo modo, la aplicación de técnicas de biología molecular puede aportar ventajas adicionales para obtener anticuerpos recombinantes frente a un antígeno dado, ya que el repertorio inicial puede ser muy diverso y, además, las propiedades de los anticuerpos se pueden modificar de forma relativamente controlada.

La tecnología del DNA recombinante ha alcanzado un alto nivel de desarrollo para el caso de moléculas de elevado peso molecular. En cambio, la obtención de AcRbs frente a moléculas orgánicas de bajo peso molecular está bastante menos extendida. En este sentido, hay que tener en cuenta que los anticuerpos se inducen y seleccionan utilizando haptenos que imitan al analito, el cual se detecta necesariamente mediante ensayos competitivos.

En este trabajo se pretende aplicar y optimizar la tecnología del DNA recombinante y la presentación de polipéptidos en la superficie de fagos (*phage display*) para generar y seleccionar anticuerpos recombinantes frente a moléculas de bajo peso molecular. Para llevar a cabo este estudio, se utilizarán como modelo plaguicidas pertenecientes a la familia de los fungicidas azólicos.

Así pues, el objetivo general de esta tesis es la **obtención de anticuerpos recombinantes frente a fungicidas de la familia de los conazoles, para su**

posterior aplicación en la determinación de dichos plaguicidas en muestras agroalimentarias. Este objetivo general implica una serie de objetivos particulares que se describen detalladamente a continuación.

➤ Obtención de anticuerpos recombinantes derivados del material genético de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales frente a los fungicidas de estudio.

➤ Obtención de anticuerpos recombinantes a partir de bibliotecas derivadas del repertorio genético de animales de experimentación inmunizados con derivados hapténicos de estos fungicidas.

Estos objetivos van estrechamente ligados a otros dos objetivos particulares:

– Estudio y optimización de una estrategia de enriquecimiento y selección (*panning*) de anticuerpos de alta afinidad para compuestos de bajo peso molecular, basada en la tecnología de presentación de fragmentos de anticuerpos en la superficie de fagos (*phage display*).

– Desarrollo de un procedimiento adecuado para el análisis de los clones productores de los anticuerpos recombinantes capaces de reconocer a los plaguicidas de interés.

➤ Evaluación de las características de los anticuerpos recombinantes tanto en su forma de proteína libre (scFv) como en su forma de proteína de fusión (scFv-pIII).

➤ Desarrollo y optimización de los ELISAs basados en los distintos tipos de anticuerpos, tanto recombinantes como monoclonales.

➤ Comparación de las propiedades analíticas de los ELISAs basados en anticuerpos recombinantes y en anticuerpos monoclonales.

➤ Evaluación preliminar de la aplicabilidad de los inmunoensayos de anticuerpos monoclonales y recombinantes al análisis de fungicidas en muestras de zumos de frutas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS E INSTRUMENTOS

Todos los plaguicidas utilizados fueron de grado estándar analítico (pureza 99.9%). El tetraconazol y el 2-(2,4-Dichlorophenyl)-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)propanol (DTP) se obtuvieron de Isagro Recerca (Galliera, Italia), el imazalil de Riedel-de Haën (Sleeze, Alemania) y el hexaconazol de Syngenta (Bracknell, UK). Los estándares de penconazol, cyproconazol, myclobutanil y triadimefon, ovoalbúmina (OVA), seroalbúmina bovina (BSA), Tween 20, el adyuvante completo e incompleto de Freund, *o*-fenildiamina (OPD), los antibióticos (cloramfenicol, kanamicina, tetraciclina y ácido nalidíxico), el isopropil- β -tiogalactopiranosido (IPTG), el bromuro de etidio y el tampón de bloqueo (TB) 10x se adquirieron de Sigma-Aldrich Química (Madrid, España).

Las inmunoglobulinas de conejo anti-ratón marcadas con peroxidasa se obtuvieron de Dako (Glostrup, Dinamarca). El anticuerpo monoclonal de ratón anti-myc se produjo a partir del hibridoma anti-myc 9E10 procedente de la American Tissue Type Culture Collection (Rockville, MD).

Las endonucleasas de restricción *Sfi*I y *Hind*III con sus respectivos tampones de reacción, se obtuvieron de Roche Diagnostics (Alemania) y la ligasa T4 de Fermentas (Quimigranel, Madrid). EL kit de Taq DNA polimerasa 2.5x y el agua con grado de biología molecular procedían de Eppendorf (Hamburgo, Alemania). Los kits de reacción en cadena de la polimerasa *PCR master mix* y *Extensor High-fidelity PCR DNA amplification master mix*, se obtuvieron de Abgene (Epsom, UK). Los cebadores empleados en las distintas reacciones de PCR se adquirieron de Integrated DNA Technologies (IDT) (Coraville, IA). Las células *E. coli* *XLI-Blue* electrocompetentes procedían de Stratagene (Cedar Creek, Texas) y las células *E.coli* *HB2151* de Maxim Biotech (South San Francisco, CA). El fago adyuvante M13K07 y el anticuerpo monoclonal anti-M13 marcado con peroxidasa se obtuvieron de GE Healthcare (Barcelona, España). El Dr. Andreas Plückthun (Instituto de Bioquímica, Universidad de Zurich, Suiza) nos cedió el vector híbrido fago-plásmido (fagémido) pAK100.

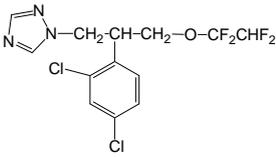
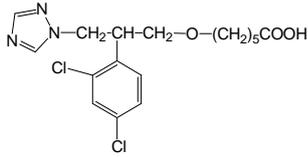
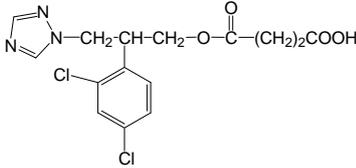
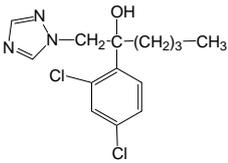
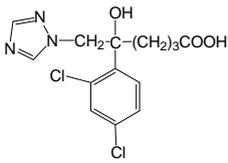
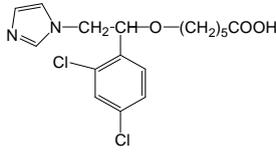
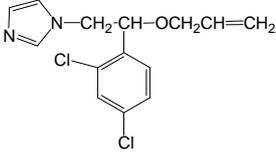
Los tampones de electroforesis preparativa (TAE 50x, Tris 2 M, EDTA-Na₂-2H₂O 0.05 M, ácido acético glacial 1 M) y analítica (TBE 10x, Tris 0.89 M, EDTA-Na₂-2H₂O 0.20 M, Ácido bórico 0.89 M), el etanol y el isopropanol con grado de biología molecular se obtuvieron de Applichem (Darmstad, Alemania). El medio 2xYT (triptona 1.6% p/v, extracto de levadura 1% p/v y NaCl 0.5%

p/v), el medio SOB (triptona 2% p/v, extracto de levadura 0.5% p/v, NaCl 0.05% p/v, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM) la agarosa D-1 de baja densidad, para la preparación de los geles de electroforesis analítica y la agarosa LM, para la preparación de geles de electroforesis preparativa se obtuvieron de los Laboratorios Conda (Madrid). El medio de cultivo (Dulbecco's Modified Eagle's medium, DMEM), el suero bovino fetal (SBF) y el suplemento del medio de cultivo para la fusión y clonación de hibridomas (HFCS) se adquirieron de Gibco (Paisley, Escocia), y el suplemento HT (hipoxantina, timindina) de Sigma-Aldrich Química.

El hapteno HH de hexaconazol se obtuvo de Syngenta. La síntesis de haptenos de imazalil (IMH), tetraconazol y penconazol (DTPH y DTPO) se llevó a cabo, previamente, en el laboratorio (Moreno *et al.*, 2007; Manclús *et al.*, 2008). La estructura de estos fungicidas y de sus respectivos haptenos se representa en la Tabla 2.1.

Las partículas magnéticas tosyactivadas Dynabeads® empleadas en el proceso de *panning* y el agitador MXIC1 procedían de Dynal Biotech ASA (Oslo, Noruega). Las placas de ELISA de poliestireno fueron de Costar (Cambridge, USA) y las placas de cultivo autoclavables de 96 pocillos (2.2 ml/pocillo) de Eppendorf. Para lavar las placas de ELISA se utilizó un lavador automático de 96 canales, 96 PW de SLT Labinstruments GMBH (Salzburgo, Austria) y la absorbancia de los pocillos se determinó mediante el lector de placas Emax de Molecular Devices (Sunnyvalley, CA). La concentración de mRNA se determinó empleando un espectrofotómetro UV-160A de Shimadzu (Kioto, Japón). El electroporador 2510, empleado para transformar las células electrocompetentes, y el termociclador Mastercycler®, para llevar a cabo las reacciones de PCR, se adquirieron de Eppendorf. La centrífuga Labofuge 400 y el rotor para placas de 96 pocillos (#8177) procedían de Heraeus (Hanau, Alemania). La unidad de electroforesis Hoefer HE33 se adquirió de GE Healthcare y el sistema de documentación de geles, photodocumentation system DP-001.FDC de Vilber Lourmat (Marne-la-Vallée, France). Para eliminar las trazas de etanol de las muestras, se empleó el equipo Concentrator 5301 de Eppendorf.

Tabla 2.1. Estructura de los fungicidas tetraconazol, hexaconazol e imazalil y de sus respectivos haptenos.

Fungicidas		Haptenos	
Nombre	Estructura	Nombre	Estructura
Tetraconazol		DTPH	
		DTPO	
Hexaconazol		HH	
		IMH	
Imazalil			

2. PREPARACIÓN DE CONJUGADOS Y OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Tanto la preparación de conjugados a OVA y BSA como la producción de anticuerpos monoclonales específicos de imazalil, tetraconazol y hexaconazol, se llevaron a cabo previamente en el laboratorio (Moreno *et al.*, 2007; Manclús *et al.*, 2008). A continuación, se describen brevemente los aspectos fundamentales de dichos procedimientos:

Para la obtención de inmunógenos, los haptenos IMH, DTPH y HH se conjugaron covalentemente a BSA empleando el método del éster activo (Langone y Van Vunakis, 1982). La estimación del número de moléculas de hapteno acopladas por molécula de BSA se realizó por espectrofotometría UV asumiendo que los coeficientes de extinción de las especies participantes no cambian apreciablemente como consecuencia de la conjugación. De este modo, la relación molar hapteno/BSA se estimó como 10, 20 y 19 para IMH, HH y DTPH, respectivamente.

Para la obtención de los conjugados de ensayo, los haptenos IMH, HH, DTPH y DTPO, se unieron covalentemente a OVA mediante el método del anhídrido mixto (Rajkowski *et al.*, 1977). La relación molar hapteno/proteína determinada por espectrofotometría UV fue 5, 9, 6 y 7, respectivamente.

La obtención de los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales frente a los fungicidas de interés se llevó a cabo siguiendo el proceso de fusión descrito previamente (Manclús *et al.*, 2004). Entre 8 y 10 días después de la fusión, los sobrenadantes se analizaron mediante la realización de ELISAs no competitivos y competitivos simultáneamente. De este modo, se detectaron los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales capaces de reconocer tanto al hapteno conjugado a OVA como al analito en disolución. Los hibridomas cuyos sobrenadantes proporcionaron una señal elevada ($A_{490} > 1$) en condiciones no competitivas (reconocimiento del hapteno conjugado) y una disminución de señal de, al menos, un 50% en condiciones competitivas (reconocimiento del analito) se seleccionaron y, posteriormente, se clonaron siguiendo el proceso de dilución límite.

A continuación, los anticuerpos monoclonales se purificaron directamente del sobrenadante de cultivo. En primer lugar, los sobrenadantes se precipitaron mediante la adición del mismo volumen de una disolución de sulfato amónico

saturado. Tras centrifugar la suspensión durante 30 min a 1500 xg y a 4 °C, los precipitados se resuspendieron en PBS (tampón fosfato salino, fosfato sódico 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4) y tras filtrarlos se purificaron por cromatografía de afinidad empleando columnas de proteína G-sepharosa (GE Healthcare Bio-sciences). Finalmente, los anticuerpos monoclonales obtenidos se almacenaron a 4 °C tras precipitarlos nuevamente con una disolución de sulfato amónico saturado.

Por otro lado, el hibridoma anti-myc 9E10 se descongeló en un baño a 37 °C y se lavó con medio DMEM. Las células se centrifugaron a 280 xg durante 5 min, se resuspendieron en 10 ml de medio DMEM conteniendo HT al 1% (50 µM hipoxantina, 8 µM timidina), HFCS (*Hybridoma Fusion and Cloning Supplement*) al 1% y SBF al 10%, y se cultivaron hasta alcanzar un volumen de cultivo de 275 ml. El sobrenadante de cultivo se precipitó con el mismo volumen de una disolución de sulfato amónico saturado, y se centrifugó durante 15 min a 3700 xg y a 4 °C. A continuación, el precipitado se resuspendió en 20 ml de tampón fosfato sódico 20 mM y, tras filtrarlo, se purificó por cromatografía de afinidad empleando columnas de proteína G-sepharosa (GE Healthcare Bio-sciences). Finalmente, los anticuerpos monoclonales obtenidos se almacenaron a 4 °C tras precipitarlos nuevamente con sulfato amónico saturado.

3. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES.

En el proceso de obtención de anticuerpos recombinantes frente a moléculas pequeñas se emplean dos tipos de células productoras de anticuerpos, como fuente de material genético para la generación de bibliotecas: hibridomas y linfocitos. El empleo de hibridomas se ha convertido, en los últimos años, en una práctica consolidada para la producción de anticuerpos recombinantes frente a moléculas de bajo peso molecular. Sin embargo, la obtención de anticuerpos recombinantes aplicables a la detección de haptenos, obtenidos directamente a partir de linfocitos, todavía se halla escasamente documentada en la bibliografía (Kramer y Hock, 2003; Brichta *et al.*, 2005). En este trabajo se abordó la obtención de bibliotecas de anticuerpos recombinantes frente a moléculas de pequeño tamaño, empleando las dos fuentes de material genético citadas anteriormente. El esquema general de obtención de bibliotecas de anticuerpos recombinantes se representa en la Figura 2.1.

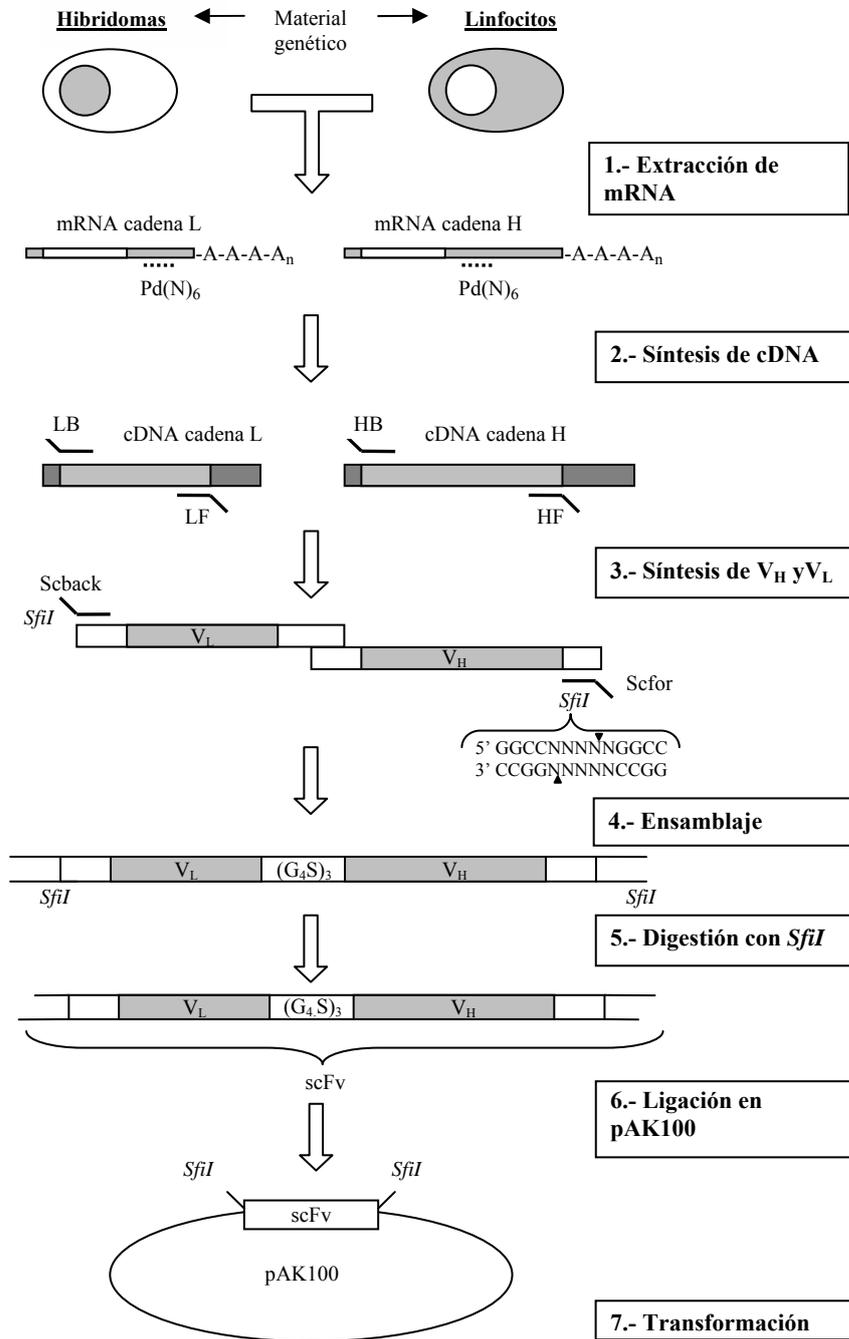


Figura 2.1. Representación de las etapas de obtención de bibliotecas de anticuerpos recombinantes.

3.1. Construcción de bibliotecas de AcRbs a partir de hibridomas.

3.1.1. Extracción de mRNA y síntesis de cDNA.

Los hibridomas seleccionados, almacenados en N₂ líquido, se descongelaron en un baño a temperatura a 37 °C y se lavaron con medio DMEM. Tras centrifugar las células a 280 xg durante 5 min, se resuspendieron en 10 ml de medio DMEM conteniendo HT al 1% (hipoxantina 50 µM, timidina 8 µM), HFCS al 1% y SBF al 10%, y se cultivaron durante 3 días. Finalmente, tras contar las células, se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en un volumen apropiado de medio DMEM.

El mRNA se extrajo empleando el kit comercial de purificación *QuickPrep Micro mRNA* (GE Healthcare) a partir de entre 4·10⁶ y 1·10⁷ células. A continuación, el mRNA extraído se purificó mediante precipitación con etanol.

3.1.1.1. Precipitación de mRNA con etanol.

Los reactivos necesarios para la precipitación, excepto el etanol absoluto, están incluidos en el kit de purificación.

- A cada 500 µl de muestra se añadieron 50 µl de acetato potásico, 10 µl de glicógeno y 1 ml de etanol absoluto frío con grado de pureza de biología molecular.
- La mezcla se mantuvo a -20 °C durante 30 min y, a continuación, se centrifugó a velocidad máxima durante 5 min y a 4 °C.
- Se eliminó todo el etanol, combinando la aspiración con la pipeta y la evaporación a 45 °C.
- Finalmente, el precipitado se resuspendió en 50 µl agua con grado de pureza de biología molecular.

El mRNA en agua es bastante inestable, por lo que conviene emplearlo inmediatamente. Si se quiere conservar, se debe mantener precipitado en etanol tras la etapa de centrifugación, almacenándolo a -80 °C.

Una vez purificado, el mRNA se cuantificó por espectrofotometría, mediante la determinación de la absorbancia a 260 nm (Sambrook y Russell, 2001). Se

utilizaron 100 ng de mRNA como molde para sintetizar la primera cadena de cDNA usando un kit comercial de síntesis (GE Healthcare) y cebadores hexaméricos aleatorios.

3.1.2. Síntesis de la cadena ligera y la cadena pesada.

El cDNA sintetizado se empleó como molde para la amplificación de la región variable de la cadena pesada (V_H) y de la cadena ligera κ ($V_{L\kappa}$) usando el conjunto de cebadores HB, HF, LB κ y LF κ , descritos por Krebber *et al.* (1997) y el kit de Taq DNA polimerasa (Eppendorf). La reacción de PCR consistió en las siguientes etapas: 5 ciclos de 60 s a 92 °C, 60 s a 50 °C y 60 s a 72 °C; seguidos de 20 ciclos de 60 s a 92 °C, 60 s a 62 °C y 60 s a 72 °C. Los productos de PCR se concentraron utilizando columnas de filtración Microcon YM30 (Millipore, Bedford, MA). Los fragmentos obtenidos se purificaron mediante electroforesis preparativa y extracción empleando el kit MinElute Gel Extraction (Qiagen), y se cuantificaron por electroforesis analítica, utilizando marcadores de peso molecular conocido (Fermentas, Glen Burnie, MD) (Sambrook y Russell, 2001).

3.1.3. Construcción del fragmento de anticuerpo recombinante scFv.

Se ensamblaron cantidades equimoleculares de V_H y V_L (entre 5 y 10 ng), mediante PCR, para formar el fragmento denominado scFv (*Single Chain Fragment Variable*). Este fragmento contiene ambas cadenas, separadas por un espaciador polipeptídico flexible de 15 aminoácidos (Gly₄Ser)₃. Además, mediante el empleo de los cebadores *scback* y *scfor* se añadieron en los extremos del fragmento scFv sitios de corte de la enzima de restricción *SfiI* que permiten la ligación direccional del fragmento en el vector apropiado (Krebber *et al.*, 1997).

En primer lugar, la mezcla de cadenas se sometió a una etapa de desnaturalización a 92 °C durante 180 s. A continuación se añadió la mezcla de Taq polimerasa (Eppendorf) y se inició el programa de PCR con 2 ciclos de 60 s a 92 °C, 30 s a 63 °C, 50 s a 58 °C y 60 s a 72 °C. En este punto, se añadieron los cebadores *scback* y *scfor* a 1 μ M, y se continuó el programa con 5 ciclos de 60 s a 92 °C, 30 s a 63 °C, 50 s a 58 °C y 60 s a 72 °C, seguidos de 23 ciclos de 60 s a 92 °C, 30 s a 63 °C y 60 s a 72 °C. Finalmente, el fragmento scFv se purificó mediante electroforesis preparativa y extracción con el kit MinElute Gel Extraction.

3.1.4. Clonación del fragmento scFv en el vector pAK100.

Tanto el fragmento scFv como el plásmido pAK100 se digirieron con la enzima de restricción *SfiI*, durante 3 h a 50 °C. El fragmento scFv digerido se purificó con el kit MinElute Reaction CleanUp (Eppendorf). El fragmento de 4.2 kb (vector) procedente de la digestión del plásmido se purificó mediante electroforesis preparativa y extracción con el kit MinElute Gel Extraction. Tanto el fragmento scFv como el vector pAK100 se cuantificaron mediante electroforesis analítica. La reacción de ligación se llevó a cabo con la enzima T4 DNA ligasa, según las instrucciones del fabricante y con una relación molar 3:2 (vector: inserto). El producto de ligación se purificó y se concentró mediante precipitación con etanol.

3.1.4.1. Precipitación de DNA con etanol.

- A cada 50 µl de muestra se añadieron 1.2 µl de NaCl 5M, 1 µl de glicógeno y 100 µl de etanol absoluto con grado de pureza de biología molecular.
- La mezcla se mantuvo a -20 °C durante, al menos, 30 min y, a continuación, se centrifugó a velocidad máxima durante 15 min y a 4 °C.
- Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 500 µl de etanol frío (grado de biología molecular) al 70%.
- Se centrifugó a velocidad máxima durante 5 min a 4 °C.
- El sobrenadante se eliminó con cuidado, combinando la aspiración con pipeta y la evaporación a 45 °C en el concentrador.
- Finalmente, el precipitado se resuspendió empleando entre 4 y 10 µl agua con grado de pureza de biología molecular.

La mezcla de ligación se empleó para transformar células *E. coli XLI-Blue* electrocompetentes preparadas como se describe a continuación:

3.1.4.2. Preparación de células electrocompetentes.

- Se inocularon 10 ml de medio SOB conteniendo 15 µg/ml de tetraciclina con varias colonias de *E.coli XLI-Blue*, y se incubaron toda la noche a 37 °C en un agitador orbital a 200 rpm.
- Se añadió 1 ml del cultivo nocturno a 200 ml de medio fresco SOB conteniendo 15 µg/ml tetraciclina y se incubó a 37 °C.
- Cuando se alcanzó una DO₅₅₀ de 0.6, el cultivo se enfrió en baño de hielo durante 10 min y se centrifugó 15 min a 3700 xg y a 4°C.
- El sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó 2 veces con 200 ml de agua MilliQ estéril.
- Tras el segundo lavado, el precipitado celular se resuspendió en 40 ml de agua MilliQ estéril con 10% de glicerol y se centrifugó durante 10 min.
- Se midió el volumen del precipitado obtenido y se resuspendió en el mismo volumen de agua MilliQ estéril con glicerol al 10%.
- Las células se congelaron por inmersión en N₂ líquido y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

La transformación de las células electrocompetentes se llevó a cabo siguiendo el protocolo de electroporación descrito en el manual de las células electrocompetentes proporcionadas por Stratagene:

3.1.4.3. Transformación de células electrocompetentes.

- El material empleado (puntas de pipeta, cubetas y porta-cubetas del electroporador) se enfrió previamente a -20°C.
- Las células electrocompetentes se descongelaron en baño de hielo y se distribuyeron en alícuotas de 40 µl.
- Se añadió 1 µl de la mezcla de ligación a cada alícuota y se incubó en baño de hielo durante 1 min.

- Las células se añadieron a la cubeta que, una vez acoplada al portacubetas, se introdujo en el electroporador.
- Se aplicó un pulso eléctrico de 1700 V y, rápidamente, se añadieron 960 μ l de medio SOC (medio SOB con 4 mg/ml de glucosa) previamente atemperado a 37°C.
- Las células se incubaron en agitación a 37 °C durante 1 h a 120 rpm y, a continuación, se prepararon las diluciones adecuadas para la siembra, en medio SOC.

Las células transformadas se sembraron en placas de medio 2xYTGC-agar (2xYT con 1% de glucosa, 25 μ g/ml cloramfenicol y 1.5% de agar). Entre 50 y 100 colonias se analizaron siguiendo los protocolos descritos en los apartados 3.3 y 3.4. El resto de colonias se recogió en 2 ml de medio 2xYT con la ayuda de un asa de siembra, se añadió glicerol hasta un 10% y se almacenó a -70°C. Las células recogidas se titularon mediante dilución seriada en medio 2xYT y siembra en placa de medio 2xYTGC-agar.

3.2. Construcción de bibliotecas de AcRbs a partir de linfocitos.

3.2.1. Extracción de mRNA y síntesis de cDNA.

Se inmunizaron ratones hembra BALB/c de entre 8 y 10 semanas, mediante inyecciones intraperitoneales del conjugado hapténico. La primera inmunización consistió en 250 μ l de una emulsión obtenida mediante la mezcla 1:1 (v:v) de adyuvante completo de Freund y 100 μ g de inmunógeno en PBS. Los animales recibieron dos inyecciones posteriores a intervalos de tres semanas usando adyuvante incompleto de Freund para realizar la emulsión. Después de un periodo de, al menos, 3 semanas se realizó una inyección adicional de 100 μ g de inmunógeno en 250 μ l de PBS. Cuatro días después, se extrajo el bazo y se homogeneizó en medio DMEM. Tras filtrar las células y centrifugarlas durante 5 min a 328 xg, se resuspendieron en 50 ml de medio DMEM y se contaron.

Se emplearon entre 10^7 y $6 \cdot 10^7$ células para extraer el mRNA mediante la utilización de dos kits comerciales de manera consecutiva. En primer lugar, se extrajo el RNA total mediante el kit RNeasy de Qiagen (Barcelona, España). En segundo lugar, se utilizó el kit Oligotex (Qiagen) para obtener la fracción de mRNA. A continuación, el mRNA extraído se purificó mediante precipitación

con etanol (ver apartado 3.1.1.1), se resuspendió en agua con grado de biología molecular y se cuantificó por espectrofotometría (A_{260}). Se emplearon 100 ng de mRNA como molde para sintetizar la primera cadena de cDNA usando un kit comercial de síntesis y cebadores hexaméricos aleatorios.

3.2.2. Síntesis de la cadena ligera y la cadena pesada.

Para sintetizar las cadenas ligera y pesada a partir del cDNA procedente de linfocitos, se aplicaron las mismas condiciones de PCR descritas en el apartado 3.1.2, pero empleando el kit de polimerasa de alta fidelidad de copia (Abgene).

3.2.3. Construcción y clonación del fragmento scFv.

Las condiciones de PCR establecidas para la construcción del fragmento scFv a partir de hibridomas no funcionaron satisfactoriamente con el material genético procedente de linfocitos. Para optimizar el ensamblaje, se ensayaron distintas condiciones de PCR (temperaturas, tiempos de incubación y número de ciclos), así como 3 mezclas de reacción de PCR comerciales (*polimerase PCR master mix*, *Extensor Hi-fidelity PCR DNA amplification master mix* y *Taq DNA polimerase 2.5x*). En todos los casos se añadieron cantidades equimoleculares de V_H y V_L (entre 10 y 20 ng) y se sometieron a una etapa de desnaturalización previa a alta temperatura (92-94 °C). A continuación se añadió la mezcla de reacción conteniendo la polimerasa y se inició el correspondiente programa. Los cebadores empleados fueron *sback* y *scfor* a 1 μ M (Krebber *et al.*, 1997). Las condiciones ensayadas fueron las siguientes:

PCR 1.

La etapa de desnaturalización consistió en 2 min a 94 °C. A continuación se añadió la mezcla de polimerasa y se inició el programa de PCR con 7 ciclos de 60 s a 94 °C, 30 s a 63 °C, 50 s a 58 °C y 2 min s a 72 °C. En este punto se añadieron los cebadores y se continuó con 30 ciclos de 60 s a 94 °C, 30 s a 63 °C y 120 s a 72 °C seguidos de una etapa final de 5 min a 72 °C.

PCR 2.

La etapa de desnaturalización consistió en 2 min a 92 °C. A continuación se añadió la mezcla de polimerasa y se inició el programa de PCR con 2 ciclos de 10 s a 92 °C, 30 s a 56 °C y 60 s a 68 °C. En este punto se añadieron los cebadores y se continuó con 30 ciclos de 10 s a 94 °C, 30 s a 56 °C y 60 s a 68 °C.

PCR 3.

La etapa de desnaturalización consistió en 3 min a 92 °C. A continuación, se añadió la mezcla de polimerasa y se inició el programa de PCR con 7 ciclos de 60 s a 92 °C, 30 s a 63 °C, 50 s a 58 °C y 60 s a 72 °C. Tras la adición de los cebadores se continuó el programa con 23 ciclos de 60 s a 92 °C, 30 s a 63 °C y 60 s a 72 °C seguidos de una etapa final de 5 min a 72 °C.

Finalmente el fragmento scFv se purificó mediante electroforesis preparativa y extracción con el kit MinElute Gel Extraction.

Las condiciones de digestión y ligación del fragmento scFv procedente de linfocitos fueron las mismas que las aplicadas al fragmento scFv procedente de hibridomas. Igualmente, se siguió el mismo protocolo de transformación con la salvedad de que en este caso se emplearon células electrocompetentes preparadas comercialmente (*E. coli XLI-Blue* Electroporation competent Cells, Stratagene).

3.3. Detección de clones positivos mediante ELISA de fagos.

3.3.1. Recuperación de fagos.

Cada colonia individual se inoculó en uno de los pocillos de una placa de cultivo de 96 pocillos que contenía 150 µl de medio 2xYTGC y se incubó a 37 °C en agitación orbital hasta alcanzar una DO_{550} de 0.5. Entonces, se añadieron 50 µl por pocillo de medio 2xYTGC conteniendo IPTG 2 mM y $2.5 \cdot 10^8$ cfu (unidades formadoras de colonias) del fago adyuvante M13K07. Las placas se incubaron a 30 °C con agitación durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron a 1500 xg durante 5 min y se recogieron los sobrenadantes para ensayarlos mediante ELISA de fagos.

3.3.2. ELISA de fagos.

Las placas de ELISA se tapizaron con el conjugado OVA-hapteno en tampón de tapizado (tampón carbonato 50 mM, pH 9.6) incubando toda la noche a temperatura ambiente. Cada pocillo se bloqueó con 100 μ l de tampón de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se vaciaron y se añadieron 100 μ l de los sobrenadantes recogidos en la etapa anterior, diluidos $\frac{1}{2}$ en tampón de bloqueo 2x y preincubados durante, al menos, 30 min. Tras 1 h de incubación, las placas se lavaron 5 veces con tampón de bloqueo, se añadieron 100 μ l/pocillo de anticuerpo anti-M13 marcado con peroxidasa (dilución 1/5000 en tampón de bloqueo) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, tras lavar nuevamente las placas, la actividad enzimática se reveló como se indica en el apartado de 4.2. *Condiciones generales de inmunoensayos.*

3.4. Detección de clones positivos mediante ELISA de fracción soluble.

El protocolo se llevó a cabo en placas de cultivo de 96 pocillos con capacidad de hasta 2.2 ml por pocillo. Cada colonia a analizar se inoculó en un pocillo con 400 μ l de medio 2xYTGC y se incubó toda la noche a 30 °C y 250 rpm. Se añadieron 40 μ l de cada cultivo nocturno a 400 μ l de medio fresco y se continuó la incubación hasta que alcanzó una DO_{550} de 0.4. A continuación, se centrifugó a 1000 xg durante 5 min y el precipitado se resuspendió en 400 μ l de medio fresco con IPTG 1mM. Tras incubar el cultivo durante toda la noche se añadieron 100 μ l/pocillo de agua conteniendo Tween 20 al 0.5% y se continuó la incubación durante 3 h a 200 rpm. Finalmente, se centrifugó la placa a 1000 xg durante 10 min, se recogieron los sobrenadantes, se diluyeron $\frac{1}{2}$ en PBS y se ensayaron mediante ELISA, tanto competitivo como no competitivo, de anticuerpos recombinantes (ver descripción en apartado 4.2.2). Las colonias se seleccionaron en función tanto de su capacidad de reconocer al hapteno conjugado (ensayo no competitivo) como de su capacidad de unirse al analito en disolución (ensayo competitivo).

3.5. Enriquecimiento de bibliotecas (*panning*).

3.5.1. Producción de fagos recombinantes.

Se inocularon 5 ml de medio 2xYTGC con 10^8 células procedentes de la biblioteca y se incubaron a 37 °C y 250 rpm. Cuando se alcanzó una D.O₅₅₀ de 0.5, las células se infectaron con 10^{10} cfu del fago adyuvante M13K07 y se incubaron durante 15 min a 37 °C sin agitación. Se añadieron 5 ml de medio 2xYTGC conteniendo IPTG 0.5 mM. Tras 2 h de incubación a 26 °C y 250 rpm, se añadió kanamicina hasta una concentración final de 30 µg/ml y se continuó incubando toda la noche. Se centrifugaron alícuotas de 1.1 ml a 1000 xg y 4 °C durante 15 min, recogiendo 1 ml del sobrenadante. Se añadieron 250 µl de PEG/NaCl (20% Polietilenglicol 8000 en NaCl 2.5 M) a cada ml de sobrenadante y, tras agitar suavemente por inversión, los tubos se incubaron en baño de hielo durante 30 min. Las muestras se centrifugaron a 10000 xg y a 4 °C durante 15 min y el precipitado se resuspendió en 1 ml de medio 2xYT. Finalmente, los sobrenadantes se filtraron a través de membranas de nitrocelulosa de millipore (MA, USA) de 3 y 0.45 µm, consecutivamente. Para almacenar los fagos durante largos periodos de tiempo, se añadió glicerol hasta un 30% y se almacenaron a -70 °C.

3.5.2. Enriquecimiento de bibliotecas utilizando placas de ELISA como soporte sólido.

Un pocillo de una placa ELISA se tapizó con 100 µl del conjugado OVA-hapteno a 10 µg/ml en tampón de tapizado estéril y se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente. El pocillo se lavó 3 veces con 300 µl de tampón de bloqueo y se bloqueó con 200 µl del mismo tampón durante 1 h a temperatura ambiente. El pocillo se vació y se añadieron 10^9 fagos diluidos en 100 µl de tampón de bloqueo preincubados durante, al menos, 30 min a temperatura ambiente. Tras incubar la placa durante 1 h, el pocillo se lavó 5 veces con 300 µl de tampón de bloqueo, aspirando y dispensando con la pipeta 5 veces en cada lavado.

Para eluir los fagos unidos al conjugado, se añadieron 100 µl de analito a 100 nM en tampón de bloqueo y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con agitación suave. A continuación, los fagos eluidos se emplearon para infectar 100 µl de células *E. coli XLI-Blue* en fase de crecimiento exponencial (DO₅₅₀ entre 0.4 y 0.8). Tras incubar durante 30 min a 37 °C, las células infectadas se

sembraron a varias diluciones en placas de medio 2xYTGC-agar. Las colonias aisladas se analizaron mediante ELISA (ver apartado 3.4).

3.5.3. *Enriquecimiento de bibliotecas utilizando partículas magnéticas como soporte sólido.*

Todo el proceso se realizó en tubos de polipropileno de 2 ml y las agitaciones se llevaron a cabo en el agitador de tubos dynal®.

3.5.3.1. Inmovilización covalente de los conjugados a las partículas magnéticas.

Los conjugados se sometieron a diálisis (3 x 2 l) con tampón B (borato 0.1 M, pH 9.5) y el volumen resultante se completó con tampón B hasta conseguir una concentración de conjugado de 0.5 mg/ml. Los conjugados dializados se esterilizaron por filtración a través de membranas de nitrocelulosa de 0.22 µm (Millipore).

Por otra parte, se lavaron 17 µl (0.5 mg) de partículas magnéticas (dynabeads) por cada ronda de *panning*, añadiendo un exceso de tampón B y eliminándolo con ayuda de un soporte magnético. Las partículas magnéticas se resuspendieron con la dilución de conjugado en tampón B (40 µg de OVA-hapteno por cada mg de dynabeads y $1-2 \cdot 10^9$ dynabeads/ml). La mezcla dynabeads-conjugado se incubó durante 24 h a 37 °C con agitación. Transcurrido este tiempo, se retiró el sobrenadante con ayuda del soporte magnético y se midió la concentración de conjugado no retenida mediante espectrofotometría (A_{280}). Las dynabeads se sometieron a dos lavados de 5 min a 4 °C con tampón C (PBS pH 7.4 con OVA 0.1%), 1 lavado de 4 h a 37 °C con tampón D (Tris 0.2 M pH 8.5) y un lavado de 5 min a 4 °C con tampón C, todos ellos con agitación. Finalmente las partículas magnéticas se resuspendieron en tampón C y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

3.5.3.2. Selección de fagos por elución específica.

Para cada ronda de *panning* se emplearon 100 µl de dynabeads-conjugado. El tampón C se retiró con ayuda del soporte magnético y las partículas se lavaron 3 veces con 300 µl de tampón de bloqueo con agitación manual por inversión. A continuación, las partículas magnéticas se incubaron con 300 µl de tampón de bloqueo, durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación. Se añadieron 10^{10} fagos diluidos en 100 µl de tampón de bloqueo, previamente incubados durante,

al menos, 30 min a temperatura ambiente y se continuó incubando durante 1 h más en el agitador. Los fagos no unidos se retiraron con ayuda del soporte magnético y las dynabeads se lavaron 5 veces con 300 μ l de tampón de bloqueo, agitando por inversión repetidas veces en cada lavado.

Para eluir los fagos unidos al conjugado, se añadieron 100 μ l de analito 1 μ M en tampón de bloqueo y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y con agitación suave. A continuación, los fagos eluidos se emplearon para infectar 100 μ l de células *E. coli XLI-Blue* en fase de crecimiento exponencial (DO_{550} entre 0.4 y 0.8). Tras incubar durante 30 min a 37 °C, las células infectadas se sembraron a diferentes diluciones en placas de 2xYTGC-agar.

Entre 50 y 100 colonias se analizaron siguiendo los protocolos descritos en el apartado 3.4. Las colonias restantes se recogieron en 2 ml de medio 2xYT con la ayuda de un asa de siembra, se añadió glicerol hasta un 10% y se almacenó a -70°C para su uso en posteriores rondas de *panning*.

3.6. Producción de fragmentos de AcRb solubles.

3.6.1. Producción de fragmentos solubles como proteínas de fusión scFv-pIII.

Para producir fragmentos solubles, se siguió el protocolo descrito por Kipriyanov *et al.* (1997) con ligeras modificaciones.

La cepa *E. coli XLI-Blue*, empleada en la transformación por electroporación, es una cepa supresora, capaz de ignorar el codón ámbar presente en el vector híbrido y situado en el extremo 3' del fragmento scFv. De este modo, la pauta de lectura continúa, expresando dicho fragmento unido a la proteína pIII del fago M13 (Pan *et al.*, 2006).

En primer lugar, se inocularon 10 ml de medio 2xYTGC con la colonia seleccionada y se incubó toda la noche en agitación a 37 °C y 250 rpm. Al día siguiente, se inocularon 100 ml de medio fresco con 2 ml de cultivo nocturno y se incubaron hasta alcanzar una DO_{550} de 0.8. A continuación, el cultivo se centrifugó a 1500 xg durante 10 min. El precipitado se resuspendió en 100 ml de medio 2xYT con sacarosa 0.4 M, 25 μ g/ml de cloramfenicol e IPTG 0.1 mM y se incubó toda la noche entre 24 y 30 °C. Al día siguiente, el cultivo se centrifugó a 5000 xg durante 10 min a 4 °C.

Por un lado, el sobrenadante (sobrenadante de cultivo) se volvió a centrifugar a 30000 xg, durante 20 min a 4 °C para eliminar cualquier resto celular.

Por otro lado, el precipitado se resuspendió en 5 ml de tampón de extracción periplásmico frío (Tris/HCL 50 mM con sacarosa 20% y EDTA 1mM) y se incubó durante 1 h con agitación ocasional. Finalmente, se centrifugó durante 30 min a 30000 xg y a 4 °C y se recogió el sobrenadante (sobrenadante periplásmico).

Tanto el sobrenadante periplásmico como el sobrenadante de cultivo se analizaron mediante ELISA de anticuerpos recombinantes. El sobrenadante con el título más alto se concentró mediante un equipo de ultrafiltración de Amicon (Beverly, CA) y se almacenó a -30 °C.

3.6.2. Producción de fragmentos solubles como proteína libre scFv.

Para producir el fragmento soluble como proteína libre scFv, se extrajo el fagémido de la colonia seleccionada y se usó para transformar células *E. coli HB2151*. Esta cepa es no supresora y, por tanto, reconoce el codón ámbar situado en el extremo 3' del fragmento scFv, deteniendo la traducción en ese punto y expresando el fragmento como proteína libre (Azzazy y Highsmith, 2002).

Para extraer el fagémido de la colonia seleccionada, se empleó el kit comercial Perfectprep® plasmid mini (Eppendorf). El fagémido aislado se cuantificó por electroforesis y se usó para transformar células *E. coli HB2151* competentes, preparadas como se indica a continuación (Sambrook y Russel, 2001).

3.6.2.1. Preparación de células competentes mediante CaCl₂

- Se inocularon 10 ml de medio SOB conteniendo 25 µg/ml de ácido nalidíxico, con varias colonias de *E. coli HB2151* y se incubaron toda la noche a 37 °C y 200 rpm.
- Se inocularon 50 ml de medio fresco con 100 µl del cultivo nocturno y se incubó a 37 °C con agitación, hasta que se alcanzó una DO₅₅₀ de 0.4.
- Las células se centrifugaron a 3000 xg y a 4 °C durante 10 min y el precipitado se resuspendió en 30 ml de una mezcla fría de MgCl₂-CaCl₂ (80 mM-20 mM).

- Se centrifugó de nuevo, en las mismas condiciones, y el precipitado se resuspendió en 2 ml de CaCl₂ 0.1 M frío.
- Se prepararon alícuotas de 200 µl y se almacenaron a -70 °C.

3.6.2.2. Transformación de células competentes.

- Se emplearon 10 µl de fagémido a 5 ng/µl para transformar cada alícuota de 200 µl de células *E.coli HB2151* competentes
- La mezcla se incubó durante 30 min a 4 °C.
- A continuación, las células se introdujeron durante 90 s en un baño a 42 °C e, inmediatamente, se enfriaron durante 2 min en baño de hielo.
- Las células se añadieron a tubos que contenían 800 µl de medio SOC y se incubaron durante 45 min a 37 °C y 50 rpm.

Las células transformadas se sembraron en placas de 2xYTGC-agar conteniendo 25 µg/ml de ácido nalidíxico. Se ensayaron algunas colonias tal y como se describe en el apartado 3.4. *Detección de clones positivos mediante ELISA de fracción soluble*. Se seleccionó una de las colonias positivas y se siguió el protocolo descrito en el apartado anterior para producir el fragmento scFv soluble.

3.7. Determinación de la secuencia de los fragmentos scFv.

La secuenciación se llevó a cabo por el *Servicio de secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia*. Para ello, se emplearon dideoxinucleótidos marcados con compuestos fluorescentes (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1). La reacción de secuenciación se realizó en un termociclador ABI GeneAmp PCR System 9700. La resolución y análisis de los productos marcados, se realizó en un secuenciador capilar ABI 3100. Los cebadores empleados en el proceso fueron el *M13 reverse*, cuya secuencia es 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3' y un cebador diseñado en el laboratorio, *pAK100 forward*, de secuencia 5'-CTT ATT AGC GTT TGC CAT-3'. Ambos cebadores hibridan con secuencias del fagémido que flanquean el sitio de inserción del fragmento recombinante. Finalmente, la secuencia de bases nitrogenadas se tradujo a secuencia de aminoácidos empleando el software *Chromas 2.31* (www.technelysiun.com.au).

4. INMUNOENSAYOS (ELISA).

4.1. Preparación de las disoluciones estándar.

Se prepararon diluciones seriadas de los estándares de cada uno de los analitos de interés, tetraconazol, hexaconazol e imazalil, a partir de disoluciones concentradas, almacenadas a -20°C .

Los estándares de tetraconazol se prepararon a partir de un stock en DMF de 1 mM ($372.10\ \mu\text{g/ml}$). Para el desarrollo de los inmunoensayos con anticuerpos recombinantes se prepararon 8 diluciones en DMF, factor 3, desde 372.10 hasta $0.17\ \mu\text{g/ml}$. Cada uno de estos 8 estándares se diluyó diariamente 1/500 en PBS antes de los inmunoensayos. Como la etapa inicial del ELISA implica una dilución $\frac{1}{2}$, la concentración final de tetraconazol para cada uno de los puntos de la curva fue 372.10, 124.03, 41.34, 13.78, 4.59, 1.53, 0.51 y $0.17\ \text{ng/ml}$. Para el desarrollo de los inmunoensayos con el anticuerpo monoclonal, se prepararon 8 diluciones en DMF, factor 3, desde 100.00 hasta $1.28 \cdot 10^{-3}\ \mu\text{g/ml}$. Teniendo en cuenta las diluciones antes mencionadas, la concentración final de tetraconazol para cada uno de los puntos de la curva fue 100.00, 20.00, 4.00, 0.80, 0.16, 0.03, $6.40 \cdot 10^{-3}$ y $1.28 \cdot 10^{-3}\ \text{ng/ml}$.

Los estándares de hexaconazol se prepararon a partir de un stock de 1 mM ($314.20\ \mu\text{g/ml}$). Para el desarrollo de los inmunoensayos con anticuerpos recombinantes se prepararon 8 diluciones en DMF, factor 4, desde 314.20 $\mu\text{g/ml}$ hasta $2.00 \cdot 10^{-3}\ \mu\text{g/ml}$. Se aplicaron las mismas diluciones establecidas para los inmunoensayos frente a tetraconazol, por lo que la concentración final de hexaconazol para cada uno de los puntos de la curva fue 314.20, 78.55, 19.64, 4.91, 1.23, 0.31, 0.08 y $2.00 \cdot 10^{-3}\ \text{ng/ml}$. Para el desarrollo de los inmunoensayos con el anticuerpo monoclonal, se prepararon 8 diluciones en DMF, factor 4, desde 78.55 hasta $4.00 \cdot 10^{-3}\ \mu\text{g/ml}$. Teniendo en cuenta las diluciones correspondientes, la concentración de hexaconazol en ensayo para cada uno de los puntos de la curva fue 78.55, 19.64, 4.91, 1.23, 0.31, 0.08, 0.02 y $4.00 \cdot 10^{-3}\ \text{ng/ml}$.

Finalmente, para el desarrollo de los inmunoensayos frente a imazalil, las curvas se prepararon a partir de un stock de 10 mM. En los ELISAs con anticuerpos recombinantes se realizaron 8 diluciones en DMF, factor 3, desde 594.30 hasta $0.27\ \mu\text{g/ml}$. Teniendo en cuenta las diluciones aplicadas, la

concentración de imazalil en ensayo para cada punto de la curva fue 594.30, 198.11, 66.04, 22.01, 7.34, 2.45, 0.82 y 0.27 ng/ml. En los ELISAs del anticuerpo monoclonal, se prepararon 8 diluciones en DMF, factor 5, desde 59.43 hasta $7.61 \cdot 10^{-3}$ µg/ml. Teniendo en cuenta las diluciones aplicadas, la concentración de imazalil en ensayo para cada punto de la curva fue 59.43, 11.89, 2.38, 0.48, 0.10, 0.02, $3.80 \cdot 10^{-3}$ y $7.61 \cdot 10^{-3}$ ng/ml.

4.2. Condiciones generales de los inmunoensayos.

Todos los inmunoensayos de este trabajo se realizaron en formato de conjugado inmovilizado, con detección indirecta del anticuerpo monoclonal o recombinante mediante inmunorreactivos auxiliares. Todas las incubaciones tuvieron lugar a temperatura ambiente. Después de cada etapa, las placas se lavaron 5 veces con una disolución de lavado (NaCl 0.15 M con 0.05% (v/v) de Tween 20). Las placas se tapizaron con 100 µl/pocillo del conjugado OVA-hapteno en tampón carbonato y se incubaron durante toda la noche. En la última etapa de cada ensayo, la actividad de la peroxidasa unida a los pocillos de la placa ELISA se reveló mediante la adición de 100 µl por pocillo de una disolución de OPD a 2 mg/ml en tampón de revelado (citrato sódico 20 mM, fosfato sódico 62 mM, pH 5.4, H₂O₂ 0.012% v/v). La reacción enzimática se paró a los 10 min mediante la adición a cada pocillo de 100 µl de ácido sulfúrico 2.5 M, determinándose la absorbancia a 490 nm con el lector de placas ELISA y utilizando como referencia la absorbancia a 650 nm. Las etapas de cada tipo de inmunoensayo se representan en la Figura 2.2.

4.2.1. ELISA con anticuerpos monoclonales.

En el ELISA no competitivo, se añadieron, a las placas tapizadas, 100 µl de una concentración predeterminada de anticuerpo en PBS con 0.0025% de Tween 20. Tras 1 h de incubación, las placas se lavaron y a continuación se incubaron 1 h con una dilución 1/2000 (100 µl) del anticuerpo secundario (inmunoglobulinas de conejo anti-ratón marcadas con peroxidasa) en PBS-T. El ensayo se reveló como se ha indicado anteriormente. Los ensayos competitivos se desarrollaron de la misma manera, a excepción de la primera etapa, en la que se añadieron 50 µl de la dilución de anticuerpo y 50 µl de las diluciones estándar o de las muestras en PBS.

4.2.2. *ELISA con anticuerpos recombinantes.*

En el ELISA no competitivo, se añadieron, a las placas tapizadas, 100 μ l de una disolución del sobrenadante y se incubaron durante 1 h. Tras los lavados, se añadieron 100 μ l de 1 μ g/ml del anticuerpo monoclonal que reconoce a la secuencia diana *myc*, en tampón PBST. Tras incubar 1 h, las placas se lavaron nuevamente y se añadió una dilución 1/2000 (100 μ l) en PBST del anticuerpo secundario (inmunoglobulinas de conejo anti-ratón marcadas con peroxidasa). Las placas se incubaron 1 h y el ensayo se reveló como se ha indicado anteriormente. Los ensayos competitivos se desarrollaron de la misma manera, a excepción de la primera etapa, en la que se añadieron 50 μ l de la dilución del sobrenadante y 50 μ l de las diluciones estándar o de las muestras en PBS.

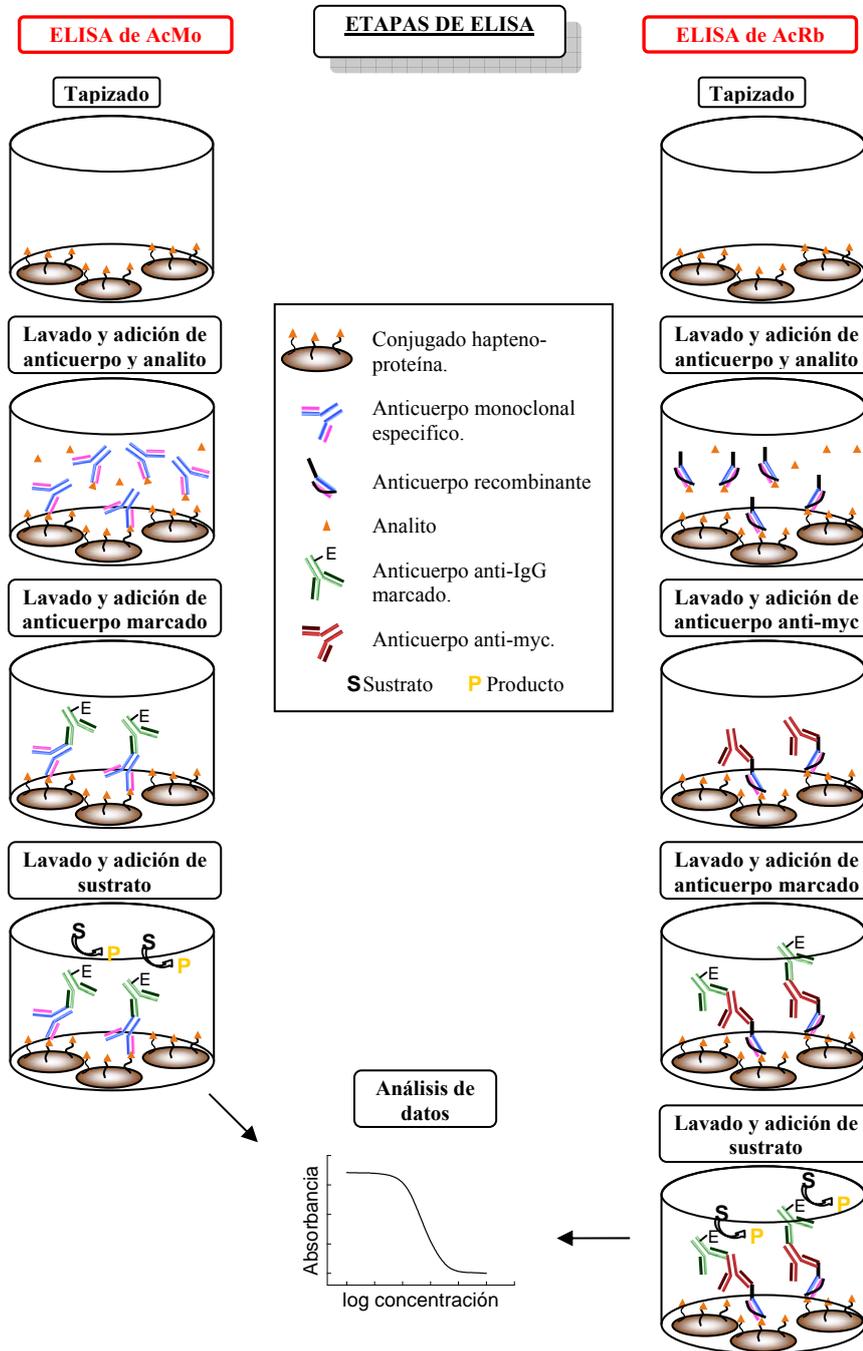


Figura 2.2. Representación de las etapas de los ELISAs de anticuerpos monoclonales y de anticuerpos recombinantes.

4.2.3. Determinación de las condiciones óptimas de los inmunoensayos.

Los parámetros escogidos para optimizar los inmunoensayos fueron tanto la capacidad de reconocimiento del anticuerpo hacia el conjugado (A_{\max}) como su afinidad por el analito (I_{50}), prestando especial atención a este último. Tanto los ELISAs de anticuerpos monoclonales como los de anticuerpos recombinantes se optimizaron escogiendo las parejas de reactivos más adecuadas para cada ensayo. En el caso de los inmunoensayos de anticuerpos monoclonales, además, se estudiaron otros parámetros que pueden afectar a la sensibilidad del ensayo: concentración de Tween 20, fuerza iónica, pH y presencia de disolventes orgánicos. En general, los inmunoensayos se desarrollaron según se describe en los apartados anteriores (4.2.1. *ELISA con anticuerpos monoclonales* y 4.2.2. *ELISA con anticuerpos recombinantes*). Las condiciones modificadas para cada estudio se describen a continuación:

Estudio de las concentraciones de los inmunorreactivos.

Las concentraciones óptimas de reactivos para el desarrollo de los inmunoensayo se determinaron mediante ELISAs no competitivos bidimensionales, en los que se variaba tanto la concentración de cada conjugado como la concentración (anticuerpos monoclonales) o dilución (anticuerpos recombinantes) de cada anticuerpo. Los conjugados ensayados fueron OVA-HH, OVA-IMH, OVA-DTPH y OVA-DTPO. De cada combinación conjugado/anticuerpo, se escogieron las concentraciones que producían un absorbancia entre 1 y 1.5 y, a continuación, con dichas parejas, se desarrollaron ELISAs competitivos para escoger aquellas que proporcionaban menor I_{50} .

Influencia de la concentración de Tween 20.

Para estudiar la influencia de la concentración del detergente presente en el ensayo, los estándares se prepararon en PBS, mientras que los anticuerpos monoclonales se diluyeron en PBS que contenía diferentes concentraciones de Tween 20 (entre 0 y 0.05%).

Influencia de la fuerza iónica.

Para evaluar el efecto de la concentración salina sobre los parámetros de la curva estándar, los estándares se prepararon en agua mientras que los anticuerpos se diluyeron en tampones PBS con diferente fuerza iónica y manteniendo el pH (7.4). Los tampones se prepararon diluyendo PBS 16x, que contenía 0.0025% de Tween 20, con agua que contenía el mismo porcentaje de detergente.

Influencia del pH.

Para determinar la influencia del pH sobre los inmunoensayos, los estándares de cada analito se prepararon en agua, mientras que los anticuerpos se diluyeron en tampones PBS 2x, con 0.0025% de Tween y diferente pH (4.5-9.5). El pH de cada uno de los tampones se ajustó mediante la adición de HCl concentrado o NaOH concentrado.

Tolerancia a distintos disolventes orgánicos.

Se estudió el efecto de diferentes concentraciones de varios disolventes miscibles con agua: acetona, metanol, isopropanol, acetonitrilo y etanol. Los estándares se prepararon en tampón PBS, mientras que los anticuerpos se diluyeron en PBS, pH 7.4 con 0.0025% de Tween 20 y diferentes proporciones de cada disolvente (0-15%).

5. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS INMUNOENSAYOS.

5.1. Parámetros de las curvas competitivas estándar.

Cada punto de la curva estándar se ensayó por triplicado. Las curvas de inhibición se obtuvieron ajustando los valores medios de absorbancia para cada concentración de analito a la siguiente ecuación sigmoide de cuatro parámetros (Raab, 1983):

$$Y = (A-D) / [1 + (x/C)^B] + D$$

donde Y es la absorbancia a 490 nm, x la concentración de analito, A es el valor de la asíntota máxima, correspondiente a la absorbancia en ausencia de analito (A_{max}), B es la pendiente de la curva en el punto de inflexión, C es el valor de x en el punto de inflexión, correspondiente a la concentración de analito que reduce al 50% la señal máxima (I_{50}) y D es el valor de la asíntota mínima, correspondiente a la absorbancia obtenida en presencia de cantidades elevadas de analito (Figura 2.3). La I_{50} constituye una estimación de la afinidad del anticuerpo hacia el analito y, frecuentemente, se asocia también a la sensibilidad del método; cuanto menor sea la I_{50} de un ensayo, mayor es su sensibilidad. Tanto el límite de detección del inmunoensayo (LOD, concentración de analito que reduce la señal al 90% del valor de la asíntota máxima) como el rango de trabajo, definido como el rango de concentraciones de analito que proporcionan valores de absorbancia entre 20% y el 80% (LOQ, límite de cuantificación) de la absorbancia máxima, también se calcularon a partir de la curva patrón ajustada.

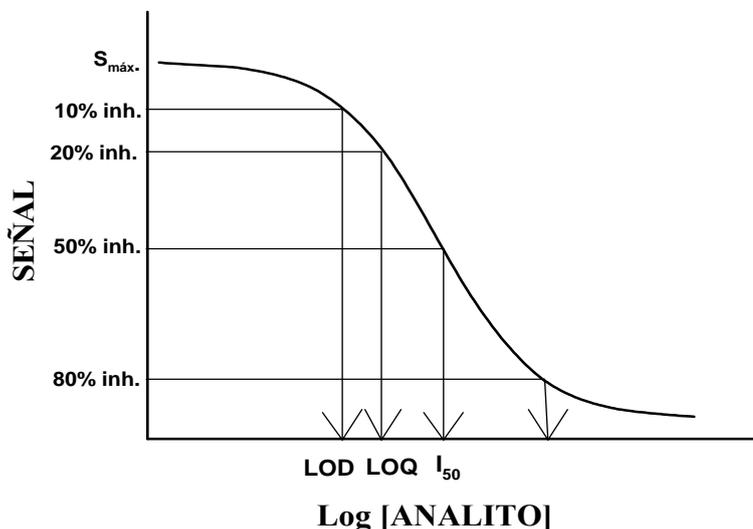


Figura 2.3. Curva estándar típica de los inmunoensayos competitivos donde se representan los parámetros I_{50} , límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).

5.2. Estimación de la reactividad cruzada.

La especificidad de cada inmunoensayo se evaluó estimando la capacidad de los anticuerpos (tanto monoclonales como recombinantes) de reconocer compuestos relacionados estructuralmente con el analito principal. Para ello, se llevaron a cabo ensayos competitivos empleando dichos compuestos para la preparación de las curvas estándar. Para abarcar un rango amplio de concentraciones, las curvas de los distintos analitos (incluyendo el analito principal) se prepararon a partir de stocks concentrados a 100 mM y se realizaron 8 diluciones en DMF, factor 10. De este modo, las concentraciones de cada reactivo en ensayo cubrían desde 100 μM hasta 10^{-2} nM. Los analitos ensayados fueron tetraconazol, penconazol, imazalil, hexaconazol, DTP, cyproconazol, myclobutanil y triadimefon. Las curvas de inhibición se obtuvieron como se indica en el apartado anterior y, a partir de la ecuación descrita, se determinó la I_{50} para cada uno de los analitos. La reactividad cruzada (RC) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$RC = (I_{50} \text{ analito principal} / I_{50} \text{ compuesto relacionado}) \times 100$$

6. ANÁLISIS DE ZUMOS.

Los zumos de manzana y naranja se obtuvieron de supermercados locales y se fortificaron con distintas concentraciones de tetraconazol, imazalil o hexaconazol, empleando stocks en DMF almacenados a -20 °C. Para los inmunoensayos de detección de imazalil y tetraconazol, se fortificó a concentraciones de 1000, 2000 y 5000 ng/ml. Para los inmunoensayos de detección de hexaconazol, se fortificó a concentraciones de 200, 400, 800 y 1000 ng/ml. Una vez fortificados, los zumos se distribuyeron en alícuotas y se congelaron a -20 °C hasta su análisis. Cada una de las alícuotas se analizó mediante ELISA tras una dilución adecuada en PBS como único tratamiento previo a su adición a la placa de ensayo. Las diluciones aplicadas a cada una de las muestras se indican detalladamente en el apartado 7. *Aplicación de los inmunoensayos al análisis de muestras fortificadas*, de la sección *Resultados y Discusión*.

Para el desarrollo de los inmunoensayos, las placas se tapizaron con el conjugado OVA-hapteno a la concentración adecuada, en tampón de tapizado, y se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente las placas se lavaron y se añadieron 50 µl/pocillo de los estándares de cada analito en PBS o de las muestras de zumos fortificadas y adecuadamente diluidas en PBS. A continuación, se añadió a todos los pocillos 50 µl de una solución del correspondiente anticuerpo (monoclonal o recombinante) en PBS con 0.0025% Tween y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. El resto del ensayo se desarrolló como se ha descrito en el apartado 4.2. *Condiciones generales de los inmunoensayos*. Tanto las curvas estándar como las muestras fortificadas se dispensaron en los pocillos por triplicado. La media de los valores de absorbancia obtenidos de las 3 réplicas de cada muestra se interpoló en la curva preparada en la misma placa. Cada ensayo se repitió por cuadruplicado, se calculó la media de las concentraciones obtenidas y, a partir de éstas, se determinó el porcentaje de recuperación y los coeficientes de variación.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES A PARTIR DE HIBRIDOMAS.

1.1. Construcción de bibliotecas.

Los hibridomas empleados para la obtención del material genético se obtuvieron previamente siguiendo el protocolo habitual de la tecnología de hibridomas (Moreno *et al.*, 2007; Manclús *et al.*, 2008). Así, se seleccionaron los hibridomas DTPH 4.1, HH 1.4 e IMH 5.1 productores de anticuerpos monoclonales frente a tetraconazol, hexaconazol e imazalil, respectivamente. Mediante el empleo de un kit comercial (Bio-Rad), se determinó que los anticuerpos monoclonales producidos por cada hibridoma pertenecen al isotipo IgG₁κ.

En primer lugar, se aisló el mRNA de cada uno de estos hibridomas y se utilizó para la síntesis de la primera cadena de cDNA. A continuación, el cDNA se usó como molde para la obtención de la cadena ligera *kappa* ($V_{L\kappa}$) y de la cadena pesada (V_H) de cada anticuerpo. Durante la síntesis mediante PCR (*Polimerase Chain Reaction*) de las cadenas del anticuerpo producido por el hibridoma DTPH 4.1, se ensayaron 3 temperaturas de anillamiento (45 °C, 50 °C y 55 °C) y se determinó, mediante electroforesis, a cual de estas temperaturas se producía una mayor cantidad de cada cadena. El resultado de la electroforesis se muestra en la Figura 3.1. Como se puede observar, no se perciben diferencias significativas entre las cantidades obtenidas a cada temperatura, por lo que se decidió establecer 50 °C como temperatura de anillamiento para posteriores amplificaciones, mediante PCR, de las cadenas V_H y V_L .

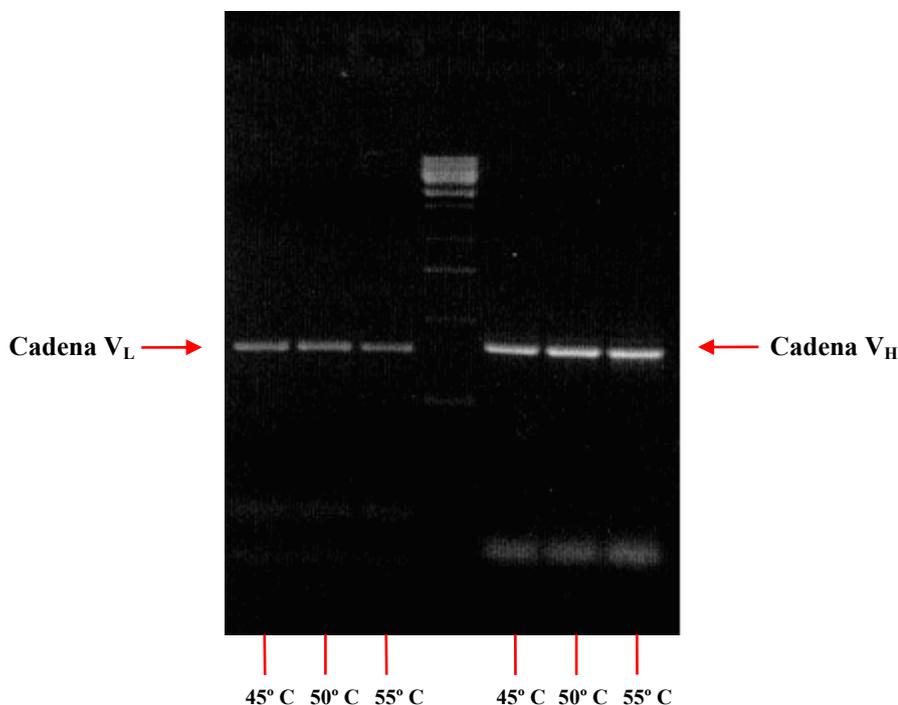


Figura 3.1. Electroforesis en gel de agarosa de las cadenas V_L y V_H sintetizadas, a partir del material genético del hibridoma DTPH 4.1, empleando 3 temperaturas de anillamiento en la PCR.

Los productos predominantes de las PCR de síntesis de las cadenas ligera y pesada, obtenidos a partir del material genético de cada uno de los 3 hibridomas, se observaron en geles de electroforesis como bandas definidas del tamaño esperado (entre 300 y 350 pb). A continuación, las cadenas V_H y V_L se purificaron y se ensamblaron en un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) mediante la técnica de PCR denominada SOE-PCR (*Splicing by Overlapping Extension-PCR*). Los fragmentos scFv así ensamblados incluyen las cadenas V_H y V_L unidas por una cadena peptídica flexible (Gly₄Ser)₃ (Krebber *et al.*, 1997). Como resultado de esta técnica, en todos los casos se obtuvo un fragmento mayoritario bien definido, de alrededor de 750 pb, tal y como se puede observar en la Figura 3.2.

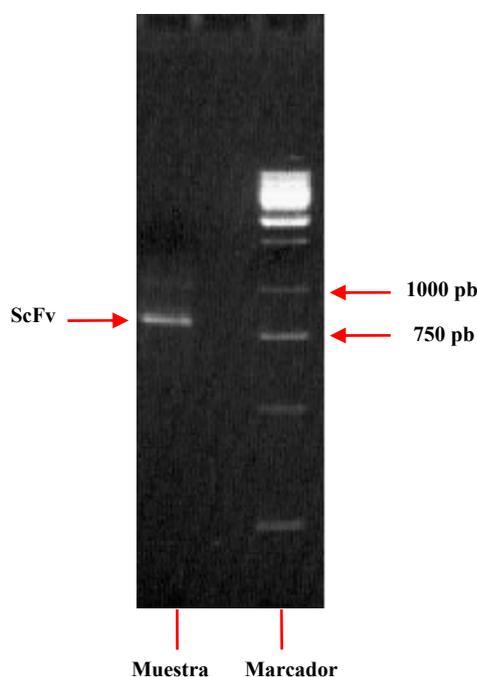


Figura 3.2. Electroforesis en gel de agarosa del fragmento scFv sintetizado por SOE-PCR a partir del material genético del hibridoma DTPH 4.1.

A continuación, el fragmento scFv se purificó mediante electroforesis y se sometió a digestión con la enzima de restricción *SfiI*. Esta enzima actúa en un sitio de restricción formado por 8 bases nitrogenadas con 5 nucleótidos, aleatorios y no reconocidos intercalados en la zona central (5'-GGCCNNNNNGGCC-3'). Una de las principales ventajas del empleo de *SfiI* es que genera extremos cohesivos y diferentes entre sí, de manera que se evita la autoligación de los fragmentos. Además, la generación de este tipo de extremos favorece la ligación direccional, es decir, si cada uno de los extremos del inserto es complementario a uno de los extremos generados en el vector de expresión, el inserto sólo puede introducirse en una dirección determinada. Finalmente, el uso de esta enzima proporciona otras ventajas adicionales. Por un lado, este sitio de restricción es muy poco común en la secuencia de los anticuerpos, de modo que es poco probable que se produzcan digestiones internas. Por otro lado, *SfiI* tiene la particularidad de cortar siempre dos sitios de reconocimiento simultáneamente

por lo que no se generan productos intermedios con un solo corte (Krebber *et al.*, 1997).

Seguidamente, el fragmento se clonó en el vector híbrido fago-plásmido (fagémido) pAK100 digerido con la misma enzima. El uso de este vector permite la expresión del fragmento scFv unido a la proteína pIII de la superficie del fago filamentoso M13. Posteriormente, el plásmido recombinante se empleó para transformar, mediante electroporación, células *E.coli* *XL1-Blue* electrocompetentes. Cada transformación se realizó con la cantidad de plásmido equivalente a 5 ng de inserto. Finalmente, a partir del material genético de los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales frente a tetraconazol, hexaconazol e imazalil se obtuvieron bibliotecas de 5×10^4 , 1×10^4 y 4×10^3 colonias, respectivamente.

1.2. Estudio del método de cribado y selección de clones positivos.

Empleando la biblioteca de tetraconazol como modelo, se estudiaron dos métodos de cribado y selección de clones positivos: ELISA de fagos y ELISA de fracción soluble scFv-pIII (ver apartados 3.3 y 3.4 de *Materiales y Métodos*). Así, se analizaron 48 colonias con cada uno de estos métodos realizando ensayos tanto no competitivos como competitivos, empleando tetraconazol 100 nM (37.2 ng/ml) como competidor. Los resultados obtenidos con cada uno de los métodos fueron similares. En ambos casos, se detectaron alrededor de un 75% de colonias positivas (colonias que producían, bien fragmentos scFv-pIII, bien fagos recombinantes, capaces de reconocer al hapteno conjugado), de las cuales un 90% resultaron competitivas (colonias que producían fragmentos scFv-pIII o fagos recombinantes, capaces de reconocer al analito libre). Se ha descrito en la bibliografía que el análisis de las interacciones fago-molécula de bajo peso molecular puede ser problemático debido, principalmente, a la complejidad de la molécula fágica y a su tendencia a unirse inespecíficamente a los soportes analíticos (Kramer y Hock, 1996). Por otro lado, Tout *et al.* (2001) describieron fagos recombinantes que presentaban menor competición frente al herbicida picloram que los fragmentos solubles generados y lo atribuyeron, por un lado, a la diferencia entre las valencias del fago recombinante (pentavalente) frente al fragmento soluble (monovalente) y, por otro lado, a la forma de plegamiento de los sitios de unión al antígeno. Por lo tanto, teniendo en cuenta los problemas potenciales descritos y que no se observaron diferencias significativas entre los dos métodos de cribado y selección, se escogió el método de expresión y

detección de scFv-pIII soluble como método de análisis de las bibliotecas de AcRb frente a analitos de bajo peso molecular.

De entre todas las colonias positivas y competitivas obtenidas en el cribado inicial de la biblioteca de **tetraconazol**, se seleccionaron las tres que presentaron mayor absorbancia en ausencia de analito. Se realizaron ensayos competitivos con los sobrenadantes de cultivo frente a varias concentraciones de tetraconazol. Como era previsible, al partir de un hibridoma monoclonal, todos los AcRb presentaron propiedades de reconocimiento similares. Por ello, se escogió una única colonia, denominándola AcRb DTPH H-4.1, para producir el AcRb correspondiente.

A continuación, se aplicó el método de expresión de la proteína híbrida scFv-pIII para analizar 96 colonias, seleccionadas aleatoriamente, procedentes de la biblioteca de **hexaconazol** y de la biblioteca de **imazalil**. Sin embargo, en estos casos ninguno de los sobrenadantes de las colonias estudiadas dio positivo en el reconocimiento del respectivo hapteno conjugado.

Los hibridomas son producto de la fusión celular entre linfocitos B y mielomas, de modo que poseen el material genético de ambos tipos de células (Kramer y Hock, 2003). Los genes que codifican las inmunoglobulinas procedentes de los mielomas puede amplificarse durante la PCR y, como consecuencia, algunas de las cadenas variables generadas (V_H o V_L) pueden ensamblarse con las cadenas variables procedentes de las células B, dando lugar a fragmentos no funcionales incapaces de reconocer al antígeno. Por otro lado, también pueden producirse errores de copia durante la PCR que generen productos modificados. Por estos motivos, a pesar de que los hibridomas suponen una fuente de material genético bastante homogéneo para la obtención de anticuerpos recombinantes, algunos autores han descrito la necesidad de aplicar sucesivas rondas de *panning* a este tipo de bibliotecas para obtener anticuerpos con determinadas propiedades. (Yuan *et al.*, 1997; Webb *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2006). Así pues, la ausencia de colonias positivas entre las analizadas directamente de las bibliotecas de hexaconazol e imazalil podría ser atribuible a alguno (o ambos) de los motivos expuestos. Por tanto, para aumentar las probabilidades de obtener anticuerpos recombinantes capaces de reconocer al analito en cuestión, se recurrió al enriquecimiento de bibliotecas mediante *panning*.

1.3. Enriquecimiento de las bibliotecas mediante *panning*.

Para cada una de las bibliotecas se aplicó una ronda de enriquecimiento consistente en 4 etapas fundamentales: producción de fagos, incubación de los fagos con el conjugado OVA-hapteno adsorbido en pocillos de placa ELISA, eliminación mediante lavados de los fagos inespecíficos y elución específica, con el analito correspondiente, de los fagos unidos. Los fagos eluidos se emplearon para infectar células *E. coli XLI-Blue*.

Los resultados obtenidos tras la aplicación de este sistema de enriquecimiento a las bibliotecas de anticuerpos recombinantes de hexaconazol e imazalil se muestran en la Tabla 3.1. En el caso de la biblioteca de hexaconazol, se obtuvieron 60 colonias procedentes de la primera ronda de *panning*. Se analizó el sobrenadante de todas ellas mediante ELISA de fracción soluble scFv-pIII, y se obtuvieron 4 colonias positivas cuyos sobrenadantes presentaron reconocimiento del conjugado OVA-HH. En este caso, la absorbancia obtenida en el ensayo fue baja ($A_{490} < 1$), por lo que hubo que aumentar la concentración de conjugado a 2 $\mu\text{g/ml}$ para desarrollar los ensayos competitivos adecuadamente. Los sobrenadantes de cultivo de las cuatro colonias se ensayaron frente a 100 ng/ml de hexaconazol. En los ensayos de dos de las colonias se observó inhibición total de la señal en presencia del analito, mientras que en los otros dos sólo se observó una inhibición parcial. Los dos AcRb que mostraron inhibición absoluta presentaron propiedades de reconocimiento similares, por lo que se escogió una de las colonias productoras que se denominó AcRb HH H-1.4.

Por otro lado, en el caso del imazalil, se recuperaron 600 colonias tras la primera ronda de *panning*. Se ensayó el sobrenadante de 96 colonias y, de ellas, 9 resultaron positivas. De nuevo, la señal obtenida en el ensayo fue baja ($A_{490} < 1$), por lo que hubo que aumentar la concentración de tapizado a 4 $\mu\text{g/ml}$ para poder desarrollar correctamente los ensayos competitivos. Los sobrenadantes de las 9 colonias positivas se ensayaron frente 100 ng/ml de imazalil, observándose en todos los casos una inhibición completa de la señal. Finalmente, dado que todos los AcRbs presentaron propiedades de reconocimiento similares, se escogió una de las colonias y se denominó AcRb IMH H-5.1.

Tabla 3.1. Resultados obtenidos tras la primera ronda de *panning* aplicada a las bibliotecas de AcRb frente a hexaconazol e imazalil procedentes de hibridomas.

Biblioteca	Colonias eluidas	Colonias ensayadas	Colonias positivas ⁽¹⁾	Colonias competitivas ⁽²⁾	Colonias seleccionadas	Nombre
Hexaconazol	60	60	4	2	1	AcRb HH H-1.4
Imazalil	600	96	9	9	1	AcRb IMH H-5.1

⁽¹⁾ Colonias cuyos sobrenadantes presentaron reconocimiento del hapteno conjugado.

⁽²⁾ Colonias cuyos sobrenadantes presentaron inhibición completa de la señal en presencia del analito a 100 ng/ml.

2. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES A PARTIR DE LINFOCITOS DE RATONES INMUNIZADOS.

2.1. Construcción de bibliotecas.

En primer lugar, se aisló el mRNA de los linfocitos procedentes de ratones inmunizados con cada uno de los conjugados de los fungicidas de interés (BSA-DTPH, BSA-HH y BSA-IMH). El mRNA así obtenido se utilizó para la síntesis de la primera cadena de cDNA que, a su vez, se usó como molde para la obtención de los fragmentos variables V_H y V_L . La etapa de síntesis de las cadenas variables transcurrió, aparentemente, sin problemas ya que, al igual que en el caso de hibridomas, los productos predominantes de la PCR presentaron el tamaño esperado (entre 300 y 350 pb). Sin embargo, en la electroforesis, tras la SOE-PCR de ensamblaje y amplificación para la formación del fragmento scFv, no se observó una banda definida sino una mancha difusa y poco intensa, tal como se puede observar en la Figura 3.3.

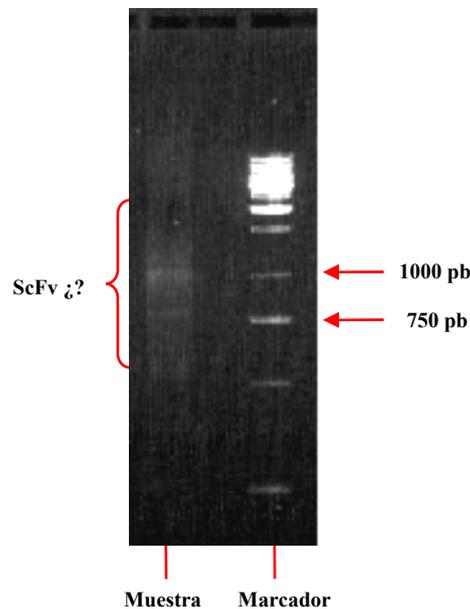


Figura 3.3. Electroforesis en gel de agarosa del fragmento scFv sintetizado mediante SOE-PCR a partir de material genético de linfocitos de ratones inmunizados frente a tetraconazol.

Con la finalidad de establecer un protocolo que permitiera obtener un fragmento scFv bien definido, se realizaron una serie de experiencias empleando como modelo el material genético de linfocitos de ratones inmunizados frente a tetraconazol.

En primer lugar, se estudió si la falta de definición del fragmento scFv estaba relacionada, en particular, con la amplificación y el posterior ensamblaje de una de las dos cadenas, V_H o V_L . Para ello, se llevaron a cabo 4 reacciones de SOE-PCR combinando las cadenas V_H y V_L procedentes del material genético de hibridomas y de linfocitos. El resultado de la electroforesis de los productos obtenidos en cada PCR se muestra en la Figura 3.4, donde se indica con detalle cada una de las combinaciones realizadas.

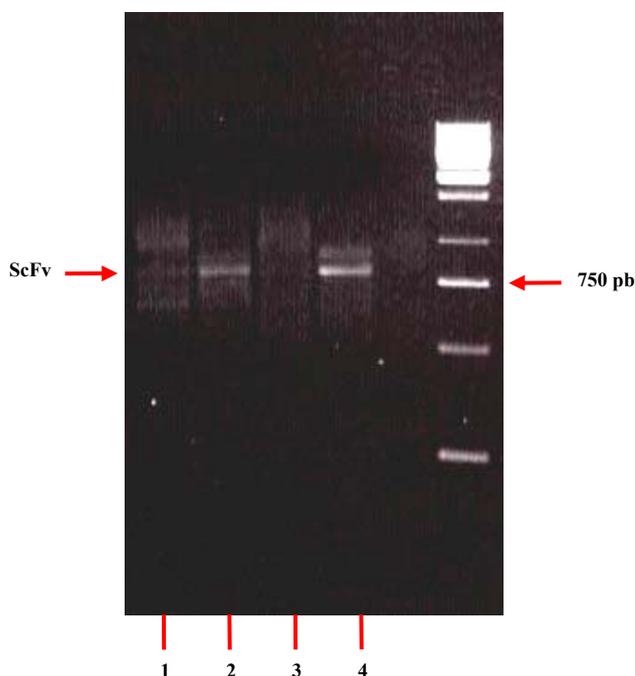


Figura 3.4. Electroforesis en gel de agarosa del fragmento scFv sintetizado mediante SOE-PCR a partir de diferentes combinaciones del material genético de hibridomas y linfocitos.

1- Fragmento scFv obtenido a partir del ensamblaje de la cadena V_H procedente del material genético de hibridomas productores del AcMo de tetraconazol y la cadena V_L procedente del material genético de linfocitos inmunizados frente a tetraconazol (V_H hibridomas + V_L linfocitos).

2- Fragmento scFv obtenido a partir del ensamblaje de la cadena V_H procedente del material genético de linfocitos inmunizados frente a tetraconazol y la cadena V_L procedente del material genético de hibridomas productores del AcMo de tetraconazol (V_H linfocitos + V_L hibridomas).

3- Fragmento scFv obtenido a partir del ensamblaje de las cadenas V_H y V_L procedentes del material genético de linfocitos inmunizados frente a tetraconazol (control negativo) (V_H linfocitos + V_L linfocitos).

4- Fragmento scFv obtenido a partir del ensamblaje de las cadenas V_H y V_L procedentes del material genético de hibridomas productores del AcMo de tetraconazol (control positivo) (V_H hibridomas + V_L hibridomas).

Como se puede apreciar, los fragmentos scFv obtenidos empleando la cadena V_L procedente de material genético de hibridomas se observaron como bandas bien definidas, independientemente del origen de la cadena V_H . Por el contrario, al ensamblar la cadena V_L procedente de linfocitos con la cadena V_H , procedente tanto de linfocitos como de hibridomas, se observó una mancha difusa y poco intensa. De estos resultados, se puede deducir que las dificultades encontradas para obtener un fragmento scFv bien definido a partir del material genético de linfocitos inmunizados frente a tetraconazol están relacionadas con la síntesis y ensamblaje de la cadena V_L .

A continuación, se amplificaron por separado las cadenas $V_{L\kappa}$ y $V_{L\lambda}$, a partir del material genético de linfocitos inmunizados frente a tetraconazol, siguiendo las condiciones descritas en el apartado 3.1.2 de la sección *Materiales y Métodos*, pero añadiendo únicamente los cebadores correspondientes a cada tipo de cadena. Seguidamente, se llevaron a cabo dos reacciones de SOE-PCR para ensamblar la cadena V_H procedente del material genético de linfocitos, con cada una de las cadenas ligeras sintetizadas por separado ($V_{L\kappa}$ y $V_{L\lambda}$). Los resultados de la electroforesis se muestran en la Figura 3.5.

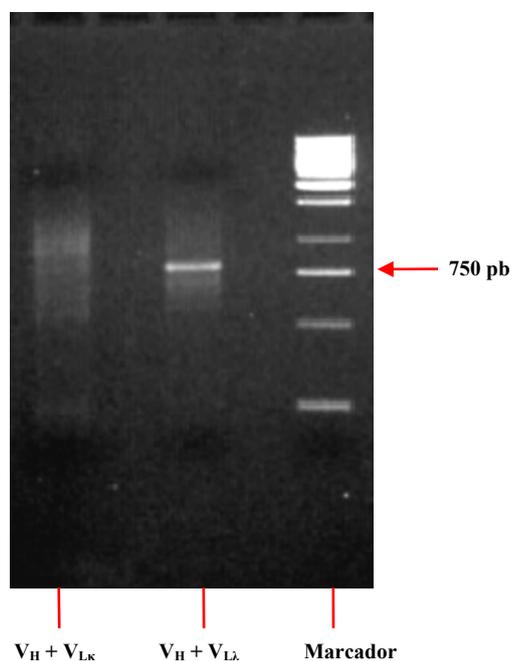


Figura 3.5. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos scFv formados por las cadenas $V_H+V_{Lκ}$ y $V_H+V_{Lλ}$ procedentes de material genético de linfocitos de ratones inmunizados frente a tetraconazol.

Como se puede observar, al combinar la cadena pesada con la cadena ligera λ , el fragmento scFv aparece bastante más definido que al combinarla con la cadena ligera κ . En ratones, las cadenas ligeras se expresan en una relación 20:1 ($\kappa:\lambda$) (Burton, 2001) y, además, la mayoría de los anticuerpos monoclonales frente a moléculas pequeñas descritos en la bibliografía pertenecen al isotipo IgG $_{\kappa}$. Por tanto, no disponer de una biblioteca adecuada de fragmentos con este tipo de cadena ligera podría repercutir seriamente en la obtención de anticuerpos recombinantes frente a los plaguicidas en estudio. Por ello, en esta etapa, los esfuerzos se centraron en la optimización tanto de la síntesis de $V_{Lκ}$ como del fragmento scFv a partir de dicha cadena.

En primer lugar, para optimizar la síntesis de la cadena ligera κ se probaron dos mezclas nuevas de polimerasas procedentes de la casa comercial Abgene (*PCR master mix* y *Extensor Hi-fidelity PCR DNA amplification master mix*),

manteniendo el programa inicial de PCR. La cantidad de cadena ligera obtenida con cada una de las polimerasas se estimó de manera cualitativa mediante electroforesis. De esta manera, la mayor cantidad se obtuvo mediante el empleo de la polimerasa de alta fidelidad de copia (*Extensor Hi-fidelity PCR DNA amplification master mix*).

Por otro lado, para optimizar la síntesis del fragmento scFv se ensayaron, además de las dos polimerasas, tres programas distintos de PCR, descritos con detalle en la sección 3.2.3 de *Materiales y Métodos*. Los resultados de las tres reacciones de PCR, realizadas con la polimerasa de alta fidelidad de copia, se muestran en la Figura 3.6. Como se puede observar, en ninguno de los casos aparecieron bandas tan bien definidas como la del fragmento scFv obtenido a partir del material genético de hibridomas. Este fenómeno podría ser debido a la heterología de las cadenas ligeras de la población de linfocitos. En vista de los resultados, se escogió la PCR 3 ya que proporcionó una banda de aproximadamente 750 pb, correspondiente al fragmento scFv, mejor definida. Por otro lado, también se aprecia que, además de la banda de interés, aparece una banda no identificada de entre 1000 y 1500 pb. Aunque hubiera sido deseable no obtener dicha banda, su presencia no supuso un problema, ya que sólo se extrajo y purificó la banda correspondiente al fragmento de 750 pb.

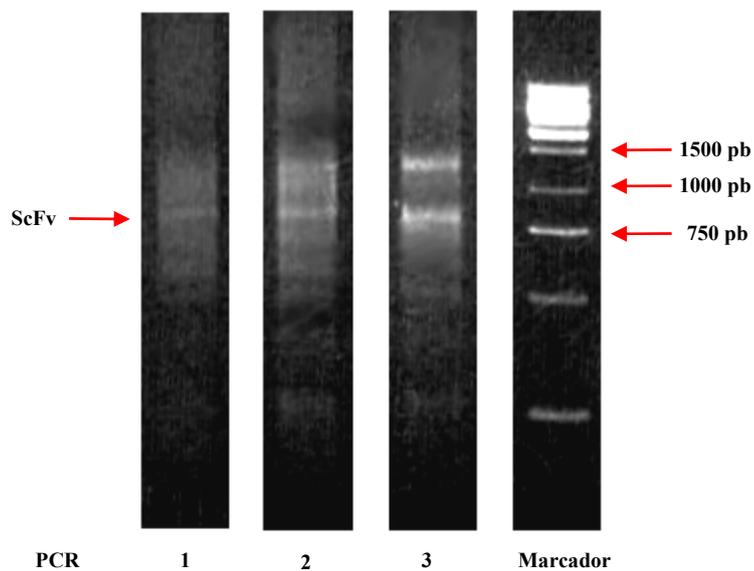


Figura 3.6. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos scFv sintetizados mediante diferentes condiciones de PCR. Los números al pie de cada pocillo corresponden a la nomenclatura de PCR asignada en el apartado 3.2.3 de *Materiales y Métodos*.

El fragmento scFv, una vez purificado y digerido con la enzima *SfiI*, se insertó en el fagémido pAK100 y se empleó para transformar, mediante electroporación, células *E. coli XL1-Blue* electrocompetentes. Los resultados de cada una de las transformaciones se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Resultados de las transformaciones llevadas a cabo para cada una de las bibliotecas generadas a partir de linfocitos de ratones inmunizados.

Analito	Cantidad de inserto (ng)	Nº de transformaciones	Tamaño de la biblioteca (nº de colonias)
Tetraconazol	20	4	$3 \cdot 10^4$
Hexaconazol	290	10	$5 \cdot 10^5$
Imazalil	300	5	$3 \cdot 10^6$

Como se puede observar, la biblioteca generada para tetraconazol fue de menor tamaño que las generadas para los otros dos analitos. Esto se debe a que a lo largo del proceso de optimización de condiciones para este analito, se trabajó con pequeñas cantidades de reactivos para facilitar la manipulación y el estudio simultáneo de varias reacciones. Algunos autores han descrito con anterioridad la obtención de anticuerpos recombinantes de alta afinidad partiendo de bibliotecas de tamaño semejante (10^4 clones), obtenidas de linfocitos de ratones hiperinmunizados (Tout *et al.*, 2001). Esto podría indicar que si la biblioteca de partida es de suficiente calidad, a pesar del tamaño de la misma, es posible obtener anticuerpos recombinantes con unas propiedades determinadas. Así pues, se continuó trabajando con la biblioteca de $3 \cdot 10^4$ colonias generada para tetraconazol, a partir de la cual, como se verá más adelante, se obtuvieron anticuerpos recombinantes frente a dicho analito.

Una vez finalizado el trabajo con la biblioteca de AcRbs frente a tetraconazol, se generaron las bibliotecas de AcRbs frente a los otros dos analitos (hexaconazol e imazalil). Para comprobar si las probabilidades de obtener un anticuerpo con unas propiedades determinadas aumentaban al aumentar el tamaño de la biblioteca, se consideró oportuno aumentar la cantidad de material empleado en cada una de las etapas. Así pues, en la etapa de ligación se empleó una mayor cantidad de fragmento scFv y se realizaron más transformaciones obteniendo, como consecuencia, bibliotecas de mayor tamaño.

2.2. Enriquecimiento de las bibliotecas mediante el proceso de *panning*.

Se analizaron 96 colonias de cada una de las bibliotecas, mediante el método de expresión de proteína híbrida scFv-pIII. Tal y como es habitual para las bibliotecas procedentes de linfocitos de animales inmunizados, no se obtuvieron clones positivos en ninguno de los casos. Por tanto, fue necesario aplicar enriquecimiento por *panning* a cada una de las bibliotecas.

2.2.1. Enriquecimiento de la biblioteca de tetraconazol: *panning* en pocillos de placa ELISA.

En primer lugar, se procedió al enriquecimiento de la biblioteca de **tetraconazol** utilizando pocillos de placa ELISA como soporte sólido para la captura y elución de fagos recombinantes. Tras la primera ronda, se obtuvieron 41 colonias. Todas las colonias recuperadas se ensayaron siguiendo el protocolo de expresión de proteína híbrida scFv-pIII. De este modo, se detectaron 7 colonias que producían anticuerpos capaces de reconocer al conjugado de tapizado del tetraconazol, dando señales elevadas ($A \approx 3$). Para poder realizar los ensayos competitivos, los sobrenadantes se diluyeron 1/4 en PBS (1/8 en ensayo). Los resultados del análisis de estas 7 colonias se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Resultado del ELISA competitivo y no competitivo de los sobrenadantes de las colonias positivas obtenidas tras aplicar la primera ronda de *panning* a la biblioteca de anticuerpos recombinantes procedentes de linfocitos de ratones inmunizados frente a tetraconazol.

Nomenclatura	A_{490} Ensayo no competitivo	A_{490} Ensayo competitivo ⁽¹⁾	% de inhibición
1.1	0.701	0.048	93
1.2	1.033	0.239	77
1.3	1.027	0.196	81
1.4	0.650	0.384	42
1.5	0.544	0.186	66
1.6	0.258	0.140	46
1.7	2.036	1.265	38

⁽¹⁾ El ensayo competitivo se realizó empleando tetraconazol 100 nM (37 ng/ml) como competidor.

Como se puede observar, los sobrenadantes de las colonias 1.1, 1.2 y 1.3 presentaron una inhibición de la señal en presencia de tetraconazol 100 nM (37.2 ng/ml) mayor que el resto de colonias ensayadas. Para estudiar un poco más en profundidad estas 3 colonias positivas y competitivas se repitió el protocolo de obtención de fracción soluble y los sobrenadantes se ensayaron frente a 6 concentraciones diferentes de analito. En la Figura 3.7 se muestran las curvas competitivas obtenidas con los sobrenadantes de las colonias 1.1 y 1.2. La curva del sobrenadante de la colonia 1.3 no se ha representado en la figura porque tras la nueva producción dio señales más bajas. Los valores de I_{50} obtenidos a partir de estas curvas son sólo orientativos ya que se abarcó un intervalo amplio de concentraciones.

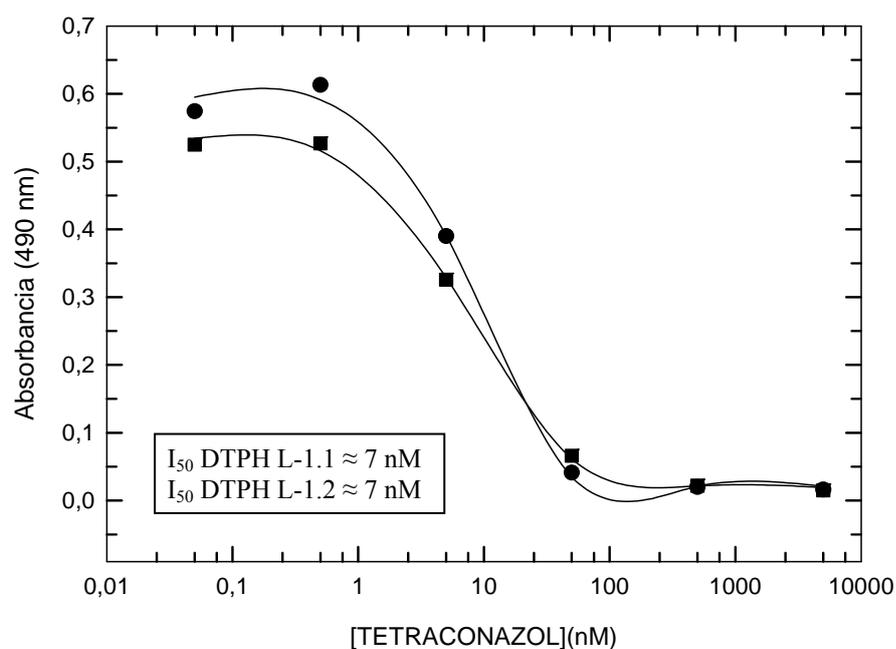


Figura 3.7. Curvas competitivas obtenidas con los sobrenadantes de las colonias seleccionadas tras la primera ronda de *panning* aplicada a la biblioteca de AcRbs de tetraconazol. (●) AcRb DTPH L-1.1, (■) AcRb DTPH L-1.2.

Aparentemente, a juzgar por los valores aproximados de las I_{50} , los anticuerpos recombinantes producidos por ambas colonias presentan una afinidad semejante hacia el tetraconazol. Se decidió continuar el trabajo con ambos anticuerpos, denominados finalmente como AcRb DTPH L-1.1 y AcRb DTPH L-1.2, para estudiar sus posibles diferencias, por lo que las colonias productoras se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para estudios posteriores.

2.2.2. Estudio de diferentes condiciones de *panning*.

Las condiciones del *panning* en pocillos de placa ELISA, puestas a punto con la biblioteca de tetraconazol, se aplicaron a la biblioteca de hexaconazol. En este caso, tras la elución selectiva con el analito se obtuvieron 108 colonias. Se ensayó el sobrenadante de todas ellas pero ninguno presentó reconocimiento hacia el conjugado de tapizado del hexaconazol. En vista de los resultados desfavorables obtenidos al aplicar las condiciones establecidas a esta nueva biblioteca, y de que el bajo número de colonias eluidas hizo innecesaria la realización de rondas de enriquecimiento adicionales, se planteó la necesidad de modificar las condiciones de *panning* establecidas hasta el momento.

En primer lugar, se ensayaron dos tipos de soporte: se comparó el *panning* empleando pocillos de placas de ELISA como soporte sólido (método empleado hasta ahora) con el *panning* sobre partículas magnéticas. En el primer método, la inmovilización del conjugado tiene lugar por adsorción a la superficie de plástico de los pocillos, mientras que en el segundo método el conjugado se inmoviliza covalentemente a las partículas magnéticas empleadas como soporte. Inicialmente, los dos tipos de *panning* se desarrollaron aplicando las mismas cantidades iniciales de fagos, así como el mismo número de lavados y tiempos de incubación.

Para este estudio, se utilizaron bibliotecas controladas que contenían 3, 30 y 300 colonias que producían AcRbs capaces de reconocer a un analito determinado, junto a 10^6 colonias procedentes de una biblioteca distinta y que producían AcRbs incapaces de reconocer al analito en cuestión. Cada una de estas mezclas se trató como una biblioteca ordinaria. Así, a cada una de estas bibliotecas se le aplicó una ronda de enriquecimiento empleando cada uno de los dos soportes sólidos con el conjugado inmovilizado. Los resultados obtenidos al ensayar el sobrenadante de 48 colonias procedentes del *panning* con cada uno de los soportes se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Resultados obtenidos tras aplicar el *panning* con distintos soportes a mezclas controladas de colonias

		Colonias positivas ⁽¹⁾ /colonias negativas iniciales ⁽²⁾		
		3/10 ⁶	30/10 ⁶	300/10 ⁶
POCILLOS PLACA ELISA	Fagos eluidos	1300	1500	4000
	Colonias positivas⁽³⁾/ colonias ensayadas	4/48	24/48	44/48
	Porcentaje de positivas (%)	7	50	90
	Colonias positivas totales	90	750	3600
PARTÍCULAS MAGNÉTICAS	Fagos eluidos	150	1000	6000
	Colonias positivas/ colonias ensayadas	33/48	44/48	38/48
	Porcentaje de positivas (%)	70	90	80
	Colonias positivas totales	105	900	4800

- (1) Colonias cuyo sobrenadante contiene fragmentos scFv-pIII capaces de reconocer al conjugado de tapizado empleado en el inmunoensayo.
- (2) Colonias cuyo sobrenadante contiene fragmentos scFv-pIII que no reconocen al conjugado de tapizado empleado en el inmunoensayo.
- (3) El número de colonias positivas equivale al número fagos positivos (aquellos que expresan en su superficie el AcRb capaz de reconocer al conjugado) ya que cada colonia procede de la infección de una célula por un único fago.

Como se puede observar, en ambos casos se obtuvieron colonias positivas tras una única ronda de *panning*, independientemente de la cantidad de colonias positivas añadidas inicialmente. Estos resultados muestran la elevada eficiencia de estos métodos de enriquecimiento con elución selectiva y, dado el tamaño de nuestras bibliotecas, una única colonia positiva inicial proporcionaría un porcentaje relativamente elevado de colonias positivas tras la primera ronda de *panning*. Observando principalmente el número de colonias positivas totales eluidas, no se detectan diferencias significativas entre ambos métodos. En ambos casos, a medida que aumentó la proporción de colonias positivas añadidas inicialmente, aumentó también el número total de colonias positivas recuperadas, aproximadamente en la misma proporción. Por otro lado, el proceso desarrollado sobre partículas magnéticas permite un manejo más cómodo del material y mayor

versatilidad para modificar las condiciones del proceso, ya que tiene lugar en tubos de plástico que permiten la adición de un volumen mayor y favorecen la agitación. Por tanto, se optó por el soporte en partículas magnéticas para el enriquecimiento de las bibliotecas de hexaconazol e imazalil.

A continuación, se estudió la influencia de la concentración inicial de fagos recombinantes en el proceso de *panning*. Para ello se usó como modelo de estudio una biblioteca real, la biblioteca procedente de ratones inmunizados frente a tetraconazol. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Resultados obtenidos tras aplicar dos rondas de *panning* a la biblioteca de anticuerpos recombinantes frente a tetraconazol, empleando diferentes cantidades iniciales de fagos.

Ronda 1				
Fagos añadidos	Fagos eluidos	Colonias positivas⁽¹⁾ /colonias ensayadas	Porcentaje de positivos (%)	Colonias positivas totales
10⁹	100	10/48	20	20
10¹⁰	5·10 ³	2/48	4	208
10¹¹	2·10 ⁴	5/48	10	2083
Ronda 2				
Fagos añadidos	Fagos eluidos	Colonias positivas /colonias ensayadas	Porcentaje de positivos (%)	Colonias positivas totales
10¹⁰	1000	42/48	85	875
10¹¹	10000	40/48	80	8333

⁽¹⁾ El número de colonias positivas equivale al número fagos positivos (aquellos que expresan en su superficie el AcRb capaz de reconocer al conjugado) ya que cada colonia procede de la infección de una célula por un único fago. Se consideraron positivas las colonias cuyo sobrenadante proporcionó A₄₉₀>1 en el inmunoensayo.

En primer lugar, como se puede observar, al aumentar la cantidad inicial de fagos, también aumentó el número de fagos recuperados tras la elución. En cada caso, tras la primera ronda de enriquecimiento, se analizó el sobrenadante de 48

colonias infectadas, mediante ELISA no competitivo. Aunque el porcentaje de colonias positivas obtenidas tras la primera ronda de *panning* fue del mismo orden en todos los casos, el número total de colonias positivas obtenidas aumentó de manera proporcional al número de fagos añadidos inicialmente. Así, se recuperaron alrededor de 20, 200 y 2000 colonias positivas a partir 10^9 a 10^{10} y 10^{11} fagos iniciales, respectivamente.

A continuación, se aplicó una segunda ronda de *panning* a las bibliotecas enriquecidas a partir de 10^{10} y 10^{11} fagos iniciales. Tras la elución, esta vez con tetraconazol 100 nM para hacer más restrictivas las condiciones, se obtuvieron 10^3 y 10^4 fagos eluidos, respectivamente. Nuevamente, se ensayó el sobrenadante de 48 colonias mediante ELISA no competitivo. El porcentaje de colonias positivas obtenidas fue semejante en ambos casos y, al igual que tras la primera ronda, el número total de colonias positivas aumentó al aumentar el número de fagos añadidos inicialmente.

La adición de 10^{11} fagos iniciales conlleva una serie de dificultades prácticas, ya que en ocasiones, si el título de fagos no es muy elevado, éstos no se pueden diluir suficientemente en tampón de bloqueo antes de la incubación con las partículas magnéticas. Además, el volumen de la dilución de trabajo es mayor que en el caso de 10^{10} fagos iniciales, lo cual dificulta su manipulación y agitación durante el proceso. Así pues, teniendo en cuenta tanto los resultados anteriores como las consideraciones prácticas, la condición intermedia, es decir, el uso de 10^{10} fagos iniciales, parece la más adecuada para llevar a cabo el enriquecimiento mediante *panning* de una biblioteca determinada, en partículas magnéticas.

Finalmente, se estudió si los AcRbs obtenidos a partir del *panning* en partículas magnéticas presentaban características analíticas distintas a los AcRbs obtenidos mediante el *panning* en placas ELISA. Para ello, se escogieron 4 colonias positivas procedentes del *panning* con partículas magnéticas aplicado en las experiencias anteriores de optimización de condiciones. Se realizaron curvas competitivas con los sobrenadantes de estas 4 colonias y se compararon con las curvas obtenidas con el AcRb DTPH L-1.1 y el AcRb DTPH L-1.2 (procedentes del *panning* en placa ELISA). Los AcRbs procedentes del *panning* en partículas magnéticas mostraron, en todos los casos, un valor de I_{50} comparable o superior al del AcRb DTPH L-1.1 y al del AcRb DTPH L-1.2 (datos no mostrados). Por tanto, se consideró oportuno seguir adelante con los AcRbs frente a tetraconazol

obtenidos a partir del *panning* en placas ELISA (AcRb DTPH L-1.1 y AcRb DTPH L-1.2) ya que cuando se realizaron estos estudios, ya se tenían producidos y caracterizados los correspondientes fragmentos scFv y scFv-pIII (apartado 3 de esta sección).

*2.2.3. Enriquecimiento de la biblioteca de hexaconazol mediante el proceso de *panning* en soporte de partículas magnéticas.*

El proceso de *panning* se llevó a cabo mediante la inmovilización covalente del conjugado de **hexaconazol**, OVA-HH, a las partículas magnéticas. Los resultados se muestran en la Tabla 3.6 (apartado 2.2.4). Tras la primera ronda de enriquecimiento se recuperaron alrededor de 400 colonias. Se estudiaron 96 colonias mediante ELISA de fracción soluble scFv-pIII sin obtener resultados positivos. A continuación, se aplicó una nueva ronda de *panning* a las colonias restantes y, tras la elución, se recuperaron 300 colonias. Nuevamente, se estudiaron 96 colonias, de las cuales 23 resultaron positivas (el sobrenadante proporcionó $A_{490} \geq 1$ en el ensayo no competitivo). Para estudiar estas colonias en profundidad se realizaron ELISAs competitivos con sus sobrenadantes frente a varias concentraciones de hexaconazol. Todos los sobrenadantes mostraron un patrón de reconocimiento similar, así que, probablemente, se trataba de un único clon. Además, en todos los casos se observó poca afinidad hacia el analito libre, ya que sólo disminuyó parcialmente la absorbancia frente a concentraciones elevadas de hexaconazol (1 μ M). Finalmente, se escogió una de esas colonias y se realizó una curva competitiva con el sobrenadante de cultivo. Los resultados se muestran en la Figura 3.8.

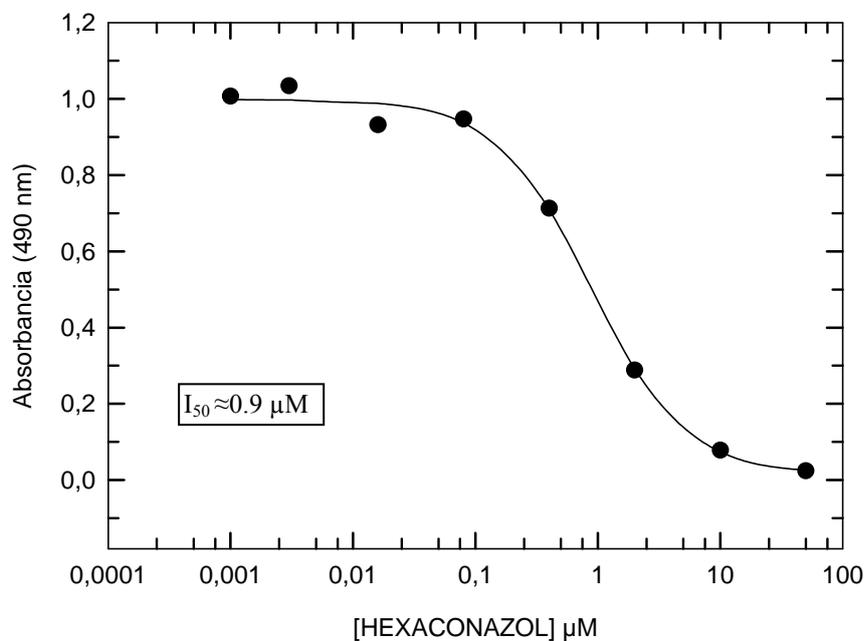


Figura 3.8. Curva de inhibición de hexaconazol obtenida al ensayar el sobrenadante de una de las colonias positivas procedente de la segunda ronda de *panning* de la biblioteca de AcRbs de hexaconazol.

Como se puede observar, y como ya se intuía por los estudios preliminares, este anticuerpo presenta mucha afinidad hacia el conjugado de tapizado pero poca hacia el analito, ya que el valor de la I_{50} del inmunoensayo de hexaconazol es relativamente elevado: 871 nM (274 ng/ml). Este valor es aproximadamente 100 veces mayor que el del inmunoensayo realizado con el anticuerpo recombinante procedente de hibridomas y 200 veces superior al realizado con el anticuerpo monoclonal frente a hexaconazol. Al proporcionar ensayos tan poco sensibles, este anticuerpo no se consideró adecuado para la futura determinación de hexaconazol en zumos de frutas y, por tanto, se descartó para futuras experiencias.

2.2.4. *Enriquecimiento de la biblioteca de imazalil mediante el proceso de panning en soporte de partículas magnéticas.*

El proceso de *panning* se llevó a cabo mediante la inmovilización del conjugado de **imazalil**, OVA-IMH, a las partículas magnéticas. Los resultados se muestran en la Tabla 3.6. Tras la elución selectiva con imazalil 1 μM , se recuperaron alrededor de 10^3 colonias, de las cuales se estudiaron 60 mediante ELISA de fracción soluble sin obtener resultados positivos. A continuación, las colonias restantes se recogieron de la placa y se sometieron a una nueva ronda de *panning*. En esta ocasión, se recuperaron alrededor de 2000 colonias de las cuales se analizaron 96 sin obtener, de nuevo, ninguna claramente positiva. Los sobrenadantes de tres colonias dieron señales de A_{490} entre 0.2-0.4 en el ensayo no competitivo. Como los anticuerpos recombinantes procedentes de hibridomas necesitaron una concentración de tapizado elevada para dar señales aceptables en ensayo, se aumentó la concentración de tapizado y se repitieron los ELISAs con los sobrenadantes de esas colonias. Sin embargo, ninguna de las señales se incrementó significativamente tras el aumento de la concentración de tapizado. Aunque había suficientes colonias para aplicar otra ronda de enriquecimiento, no se consideró necesario ni oportuno, ya que los ensayos preliminares habían demostrado que se pueden seleccionar 2-3 colonias positivas iniciales frente a 10^6 negativas. Por tanto, si tras la primera ronda se obtuvieron 1000 colonias, 1 única colonia positiva hubiera sido suficiente para obtener un porcentaje alto de positivos tras la segunda ronda de enriquecimiento.

Tabla 3.6. Resultados obtenidos tras aplicar dos rondas de *panning* en partículas magnéticas a las bibliotecas de anticuerpos recombinantes frente a hexaconazol e imazalil.

Biblioteca	1ª Ronda de <i>panning</i>		2ª Ronda de <i>panning</i>		Patrón de reconocimiento único
	Colonias recuperadas	Colonias positivas	Colonias recuperadas	Colonias positivas	
Hexaconazol	400	0/96	300	23/96	1
Imazalil	1000	0/60	2000	0/60	-

3. EXPRESIÓN DE FRAGMENTOS SOLUBLES scFv Y PROTEÍNA DE FUSIÓN scFv-pIII.

Las vías más habituales de expresión de los fragmentos scFv en organismos procariontes son la secreción citoplasmática, la formación de cuerpos de inclusión en el citoplasma y la secreción periplásmica. Esta última aumenta la probabilidad de un correcto plegamiento de la proteína ya que el entorno oxidante del periplasma favorece la formación de puentes disulfuro. Además, la expresión periplásmica favorece el procesamiento y purificación de los fragmentos scFv recombinantes (Leong y Chen, 2008). Por tanto, se optó por esta vía tanto para la expresión del fragmento libre scFv como de la proteína de fusión scFv-pIII. Por otra parte, se ha demostrado que una fracción de proteína es secretada al medio de cultivo y la cantidad secretada depende de las condiciones de incubación, de la concentración del inductor de la expresión y de la propia naturaleza de la secuencia de la proteína (Kipriyanov *et al.*, 1997). En este trabajo se ha seguido el protocolo descrito por Kipriyanov *et al.* (1997) para la expresión del fragmento scFv y scFv-pIII. Las condiciones establecidas - incubación en matraz, presencia de sacarosa 0.4M y temperatura de incubación por encima de 20°C - favorecen la filtración de gran cantidad de proteína periplásmica al medio de cultivo y, por tanto, es posible recuperar los fragmentos recombinantes tanto del sobrenadante periplásmico como del sobrenadante de cultivo.

Para la expresión de todos los anticuerpos recombinantes (AcRb DTPH L-1.1, AcRb DTPH L-1.2, AcRb DTPH H-4.1, AcRb HH H-1.4 y AcRb IMH H-5.1) tanto en su forma libre (scFv) como en forma de proteína de fusión (scFv-pIII), se emplearon dos cepas diferentes de *E. coli*. En primer lugar, se empleó la cepa supresora *E.coli XL-1Blue*, que suprime la acción de parada del codón ámbar situado en 3' del fragmento clonado, continuando la traducción y expresando el fragmento como proteína de fusión scFv-pIII. En segundo lugar, se transformó la cepa *E. coli HB2151*. Esta cepa es no-supresora, de modo que la pauta de lectura se detiene en el codón ámbar y el fragmento se expresa como proteína libre scFv. Para ambas cepas se recuperó tanto el sobrenadante de cultivo como el sobrenadante periplásmico. Posteriormente, se titularon ambos tipos de sobrenadantes de algunas de las colonias para comprobar si, tal y como se esperaba en función de las condiciones de expresión aplicadas, había presencia del fragmento scFv correspondiente en sendos sobrenadantes. Los resultados se muestran en la Tabla 3.7. Todos los ensayos se realizaron empleando el conjugado homólogo.

Tabla 3.7. Resultados de los ensayos no competitivos de los sobrenadantes de cultivo y de los sobrenadantes periplásmicos de colonias productoras de anticuerpos recombinantes frente a tetraconazol, hexaconazol e imazalil.

Anticuerpo	Dilución de sobrenadante en ensayo ⁽¹⁾	A₄₉₀ Sobrenadante cultivo	A₄₉₀ Sobrenadante periplásmico
AcRb DTPH L-1.1	1/5	1.2	1.1
AcRb DTPH L-1.2	1/10	0.9	1.6
AcRb DTPH H-4.1	1/64	1.3	1.3
AcRb HH H-1.4	1/2	0.8	0.8
AcRb HH H-1.4-pIII	1/2	1.8	0.7
AcRb IMH H-5.1-pIII	1/0	0.9	1.8

⁽¹⁾Las diluciones aplicadas fueron las necesarias para obtener señales próximas a 1.

Como se puede observar, en todos los casos se detectó presencia de la proteína de interés tanto en el sobrenadante de cultivo como en el sobrenadante periplásmico. No se puede establecer una tendencia clara, ya que dependiendo del anticuerpo, se detectó más actividad en uno u otro sobrenadante. Así, se ha argumentado que la propia secuencia del anticuerpo puede influir en la cantidad de proteína secretada al sobrenadante de cultivo (Kipriyanov *et al.*, 1997). En cualquier caso, para tratar de recuperar la mayor cantidad posible de anticuerpo, se juntaron ambos sobrenadantes procedentes de cada colonia de interés aislada en este estudio. Finalmente, los sobrenadantes se concentraron y se emplearon directamente para el desarrollo de los inmunoensayos posteriores.

4. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS ANTICUERPOS RECOMBINANTES FRENTE A TETRACONAZOL.

Únicamente se analizaron las secuencias de los anticuerpos recombinantes frente a tetraconazol, ya que se pudieron comparar secuencias de varios anticuerpos capaces de reconocer a un mismo analito. En concreto, se disponía de un anticuerpo, procedente de hibridomas, y de dos anticuerpos, procedentes del material genético de linfocitos, capaces de reconocer al tetraconazol en ensayo.

Tras la secuenciación del DNA de los anticuerpos recombinantes, se identificaron y compararon sus respectivas secuencias de aminoácidos. Tanto la numeración de los aminoácidos como la identificación de cada uno de los segmentos se realizó de acuerdo con las normas establecidas por Kabat *et al.* (1991). Las secuencias aminoacídicas de cada uno de los anticuerpos recombinantes se muestran en las Tablas 3.8 y 3.9. Como se puede observar, los dominios variables de los anticuerpos recombinantes secuenciados presentan una similitud de, aproximadamente, el 90%, excepto en el caso de V_H del AcRb DTPH L-1.2 que muestra homología en el 85% de su secuencia. Por otro lado, aproximadamente la mitad de las sustituciones de los aminoácidos se encuentran en las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs). Por tanto, a pesar de que los 3 anticuerpos presentan un reconocimiento semejante de tetraconazol en ensayo, difieren significativamente en su estructura. Esto se pone de manifiesto especialmente en el caso de las CDRs de la V_H del AcRb DTPH L-1.2.

Tabla 3.8. Comparación de las secuencias de las cadenas pesadas (V_H) de los anticuerpos recombinantes frente a tetraconazol. Los aminoácidos que coinciden con la primera secuencia representada (AcRb DTPH H-4.1) se han indicado con un guión (-).

AcRb	Cadena pesada (V _H)
	FR-1
DTPH H-4.1	Q V Q L Q Q S G A E L A K P G A S V K M S C K A S D Y T F T
DTPH L-1.2	- - - - - V T - - - - - G - - - - I
DTPH L-1.1	- - - - - G - - - -
	CDR-H1
DTPH H-4.1	R Y W M H
DTPH L-1.2	S S - - -
DTPH L-1.1	S - - - -
	FR-2
DTPH H-4.1	W V K Q R P G Q G L E W I G
DTPH L-1.2	- - - E - - - - -
DTPH L-1.1	- - - - -
	CDR-H2
DTPH H-4.1	Y I N P S T G Y T E Y N Q K F K D
DTPH L-1.2	W - Y - R - - H I - - - - -
DTPH L-1.1	- - - - -
	FR-3
DTPH H-4.1	K A T L T A D I S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R
DTPH L-1.2	- - - - - S - - T - - - - - D - - - - -
DTPH L-1.1	- - - - - K - R K - - - - - N
	CDR-H3
DTPH H-4.1	A T N Y A M D Y
DTPH L-1.2	- G Y D - L - -
DTPH L-1.1	- D Y D - - - -
	FR4
DTPH H-4.1	W G Q G T S V T V S S A
DTPH L-1.2	- - - - -
DTPH L-1.1	- - - - -

Tabla 3.9 Comparación de las secuencias de las cadenas ligeras (V_L) de los anticuerpos recombinantes frente a tetraconazol. Los aminoácidos que coinciden con la primera secuencia representada (AcRb DTPH H-4.1) se han indicado con un guión (-).

AcRb	Cadena ligera (V _L)
	FR-1
DTPH H-4.1	D V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C
DTPH L-1.2	- I - - - - S - - - - - - - - - - - - - - - -
DTPH L-1.1	- I - - - - S - - - - - - - - - - - V - - - -
	CDR-L1
DTPH H-4.1	R S S Q S V V H S N G N T Y L Q
DTPH L-1.2	- - - - - I - - - - - - - - - - - E
DTPH L-1.1	- - - - - N I - - - - T T - - - - -
	FR-2
DTPH H-4.1	W F L Q K P G Q S P K L L I Y
DTPH L-1.2	- Y - - - - - - - - - - - - - - - -
DTPH L-1.1	- I - - - - S - - - - - - - - - - -
	CDR-L2
DTPH H-4.1	K V S N R F S
DTPH L-1.2	- - - - - - - - - - - - - - - -
DTPH L-1.1	- - - - - - - - - - - - - - - -
	FR-3
DTPH H-4.1	G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y Y C
DTPH L-1.2	- -
DTPH L-1.1	- - - - - S - - - - - - - - - - - - - - - -
	CDR-L3
DTPH H-4.1	F Q G S H V P W T
DTPH L-1.2	- - - - - - - - - - - - - - - -
DTPH L-1.1	- - - - - - - - - - - - - - - -
	FR-4
DTPH H-4.1	F G G G T K L E L K R
DTPH L-1.2	- - - - - - - - - - I - - - - -
DTPH L-1.1	- - - - - - - - - - - - - - - -

5. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE LOS INMUNOENSAYOS.

5.1. Inmunoensayos con anticuerpos monoclonales.

En primer lugar, se estudió la influencia de distintos factores (concentración de inmunorreactivos, pH, fuerza iónica, concentración de detergente y presencia de disolventes orgánicos) sobre los inmunoensayos configurados con anticuerpos monoclonales. En todos los casos se desarrollaron ELISAs competitivos en formato de conjugado inmovilizado y se estudió el efecto de los diversos factores sobre los parámetros de cada inmunoensayo, especialmente sobre la I_{50} y la A_{max} .

Los anticuerpos empleados para llevar a cabo los estudios de optimización fueron AcMo DTPH 4.1, AcMo HH 1.4 y AcMo IMH 5.1 para los ensayos de tetraconazol, hexaconazol e imazalil, respectivamente. Dichos anticuerpos se seleccionaron previamente en función de su capacidad de reconocimiento del analito libre (Moreno *et al.*, 2007; Manclús *et al.*, 2008).

5.1.1. Determinación de las concentraciones óptimas de los inmunorreactivos.

Una teoría ampliamente fundamentada experimentalmente en el desarrollo de inmunoensayos competitivos sostiene que los conjugados heterólogos pueden modificar la afinidad aparente de los anticuerpos hacia un analito (Wie y Hammock, 1984; Harrison *et al.*, 1991; Manclús *et al.*, 1994). Así pues, en ocasiones, el empleo de conjugados heterólogos puede mejorar la sensibilidad del ensayo, ya que si la afinidad del anticuerpo hacia el conjugado heterólogo es ligeramente inferior a la que presenta dicho anticuerpo hacia el conjugado homólogo, la afinidad aparente del anticuerpo hacia el analito libre aumenta.

Por ello, en esta experiencia se ensayaron varios conjugados (homólogo y heterólogos) para cada uno de los inmunoensayos y se determinó cual de ellos proporcionaba un ensayo más sensible. Asimismo, se determinó la concentración óptima de cada pareja de reactivos (anticuerpo/conjugado de tapizado).

Cada uno de los anticuerpos se ensayó con los siguientes conjugados: OVA-DTPH, OVA-HH, OVA-IMH y OVA-DTPO (ver Tabla 2.1 de la sección *Materiales y Métodos*). En primer lugar, se llevaron a cabo inmunoensayos no competitivos bidimensionales, para determinar las concentraciones de cada

pareja de reactivos que proporcionaban una A_{490} próxima a la unidad. A continuación, estas concentraciones se utilizaron para obtener curvas de inhibición con su analito correspondiente. En la Tabla 3.10 se muestran las concentraciones de cada pareja de inmunorreactivos que proporcionaron ensayos con menores valores de I_{50} .

Tabla 3.10. Influencia del conjugado de tapizado sobre la afinidad de los anticuerpos monoclonales seleccionados hacia tetraconazol, hexaconazol e imazalil.

AcMo	Concentración de anticuerpo en ensayo ($\mu\text{g/ml}$)	Conjugado OVA-hapteno	Concentración de conjugado ($\mu\text{g/ml}$)	A_{max}	I_{50} (ng/ml)
AcMo DTPH 4.1	0.03	O-HH	1	1.1	2.2
	-	O-IMH	-	NE ⁽¹⁾	
	0.03	O-DTPH	0.1	1.1	6.0
	0.03	O-DTPO	0.5	2	7.3
AcMo HH 1.4	0.05	O-HH	0.5	0.7	17.3
	-	O-IMH	-	NE	
	0.06	O-DTPH	2	1.3	1.1
	-	O-DTPO	-	NE	
AcMo IMH 5.1	-	O-HH	-	NE	
	0.04	O-IMH	0.75	1.6	1.8
	0.1	O-DTPH	2	0.9	1.2
	-	O-DTPO	-	NE	

⁽¹⁾ NE: No ensayado. Parejas de reactivos con las que no se realizaron curvas competitivas ya que eran necesarias concentraciones, bien de conjugado o bien de anticuerpo, demasiado elevadas

En la Tabla 3.10 se han destacado en negrita las parejas de reactivos seleccionadas como óptimas para el desarrollo de los inmunoensayos posteriores. En el caso del AcMo DTPH 4.1 y AcMo HH 1.4, se escogieron los conjugados heterólogos ya que mejoraban significativamente la sensibilidad del ensayo. En cambio, en el caso del AcMo IMH 5.1 no se observó un aumento significativo de la sensibilidad del ensayo realizado con el conjugado heterólogo, siendo necesario emplear concentraciones superiores tanto de anticuerpo como de

conjugado. Por tanto, se seleccionó el conjugado homólogo OVA-IMH para los inmunoensayos siguientes.

A continuación, empleando las concentraciones de reactivos seleccionadas, se realizaron ensayos para estudiar una serie de factores adicionales que afectan a los parámetros analíticos de los inmunoensayos.

5.1.2. Influencia del detergente.

Para estudiar este efecto, las curvas estándar se prepararon en PBS y los anticuerpos se diluyeron en PBS con diferentes concentraciones de Tween 20. Los resultados se muestran en las Figura 3.9. Como se puede observar, la proporción de detergente no parece afectar significativamente al valor de la absorbancia máxima de ninguno de los ensayos. Por otro lado, la mayor variación de I_{50} se observa en el ensayo con el AcMo HH 1.4. En este caso, la disminución del porcentaje de Tween 20 añadido al tampón de dilución del anticuerpo, se traduce en un aumento de la sensibilidad del ensayo, entendiéndose como tal una disminución del valor de la I_{50} . Sin embargo, la ausencia total de Tween afecta negativamente a la reproducibilidad del ensayo (datos no mostrados). Este fenómeno se observó también en el caso de los otros dos anticuerpos. Por tanto, la presencia de Tween en los inmunoensayos es necesaria, pero se optó por un porcentaje muy bajo de dicho detergente para que no influyera negativamente en la sensibilidad. Así pues, el tampón empleado para diluir los anticuerpos en los sucesivos ensayos se preparó añadiendo Tween 20 al 0.0025%. El porcentaje de detergente escogido fue el mismo en todos los casos, permitiendo así una mayor comodidad de manejo y preparación de tampones en el laboratorio, ya que los parámetros (I_{50} y A_{max}) de los inmunoensayos realizados con los otros dos anticuerpos monoclonales (AcMo DTPH 4.1 y AcMo IMH 5.1) no se vieron afectados significativamente por este factor.

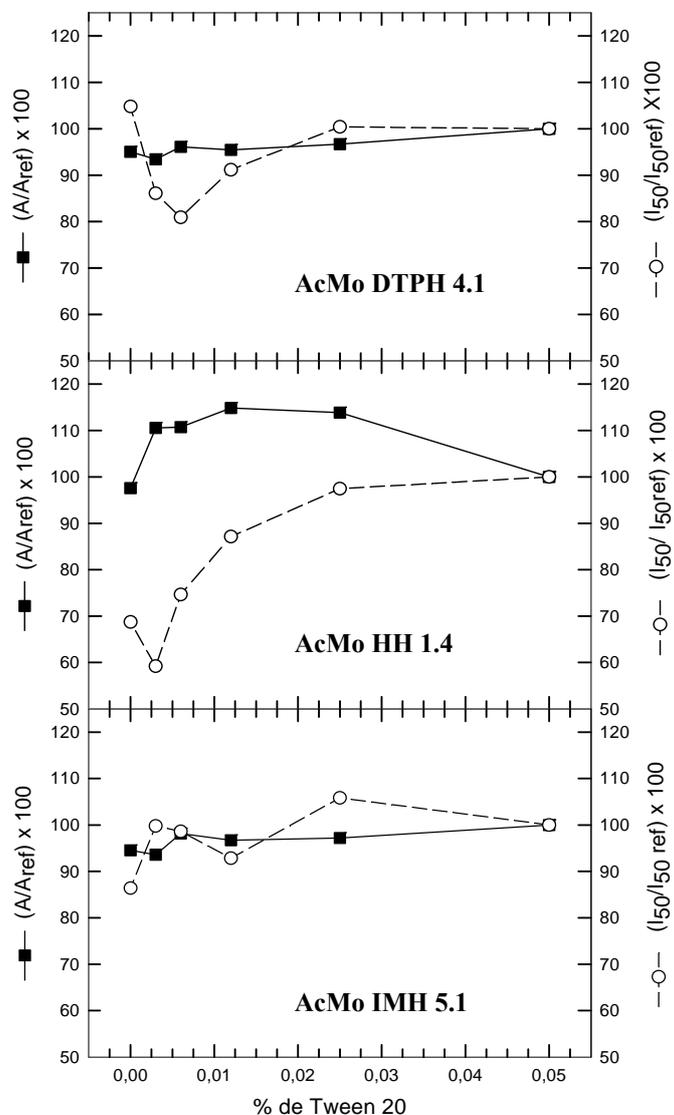


Figura 3.9. Influencia de la concentración de Tween 20 sobre la A_{max} (■) y la I_{50} (○) de los inmunoensayos, basados en anticuerpos monoclonales, de tetraconazol, hexaconazol e imazalil. En las gráficas se ha representado A/A_{ref} e I/I_{50ref} , siendo A_{ref} e I_{50ref} los valores de referencia obtenidos usando como tampón de dilución del anticuerpo PBS 1X con 0.05% de Tween 20. Los datos se obtuvieron a partir de curvas competitivas realizadas por triplicado.

5.1.3. *Influencia de la fuerza iónica.*

Para llevar a cabo este estudio, la curva estándar se preparó en agua y los anticuerpos se diluyeron en tampones PBS de distintas concentraciones, conteniendo un 0.0025% de Tween. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.10. En este caso, además de los parámetros A_{\max} e I_{50} , también se ha representado el valor de su relación (A_{\max}/I_{50}) (Figura 3.11). Observando el efecto de la fuerza iónica sobre dicho cociente, se puede determinar que la condición más favorable (mayor absorbancia y menor I_{50}) se obtiene, en general, cuando el PBS en ensayo es 1X o 2X. Para unificar las condiciones de ensayo, se decidió emplear el tampón PBS 1X para todos los ensayos posteriores.

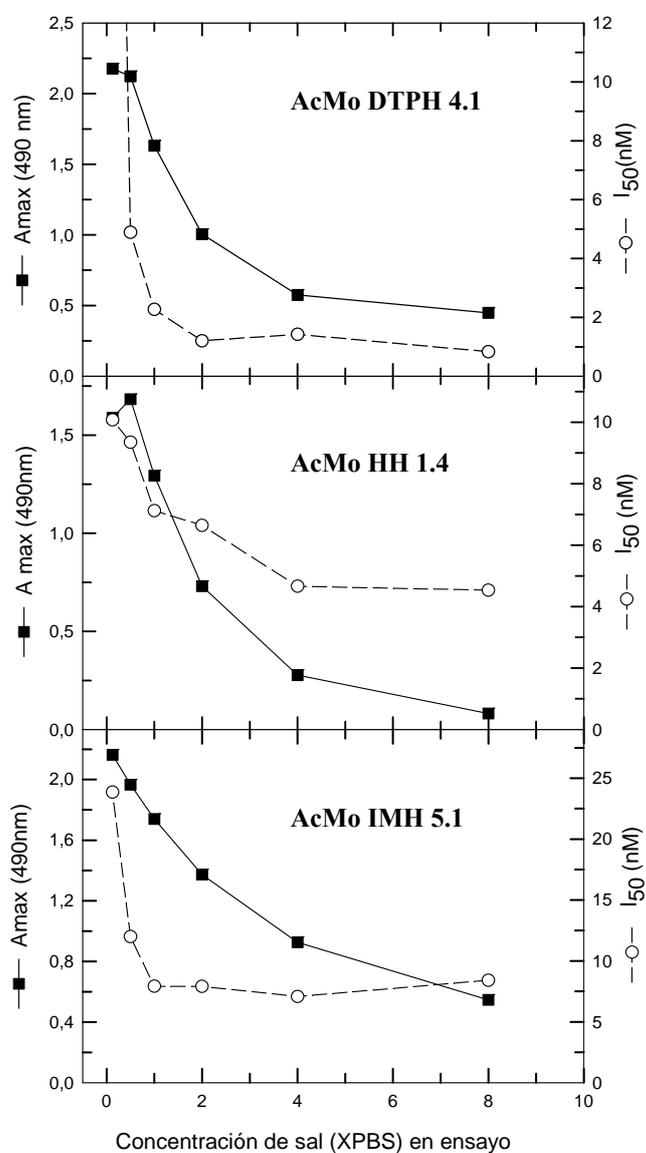


Figura 3.10. Influencia de la concentración de sal sobre la A_{max} (■) y la I_{50} (○) de los inmunoensayos, basados en anticuerpos monoclonales, de tetraconazol, hexaonazol e imazalil. Los datos se obtuvieron a partir de curvas competitivas realizadas por triplicado.

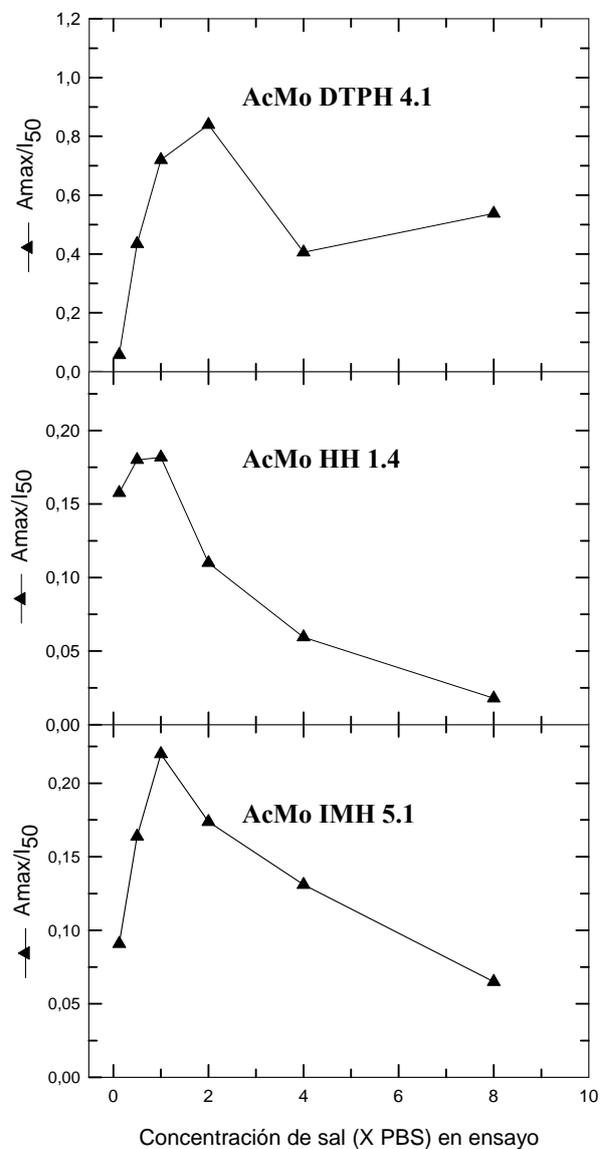


Figura 3.11. Influencia de la concentración de sal sobre el cociente A_{max}/I_{50} de los inmunoensayos, basados en anticuerpos monoclonales, de tetraconazol, hexaconazol e imazalil. Los datos se obtuvieron a partir de curvas competitivas realizadas por triplicado.

5.1.4. Influencia del pH.

Para estudiar la influencia del pH, la curva estándar se preparó en agua y los anticuerpos se diluyeron en PBS 2x con Tween 20 al 0.0025%, a diferente pH (4.5-9.5). Los resultados se pueden observar en la Figura 3.12. Nuevamente, además de los parámetros A_{\max} e I_{50} , se ha representado el valor de su relación (A_{\max}/I_{50}) (Figura 3.13). En general, la A_{\max} de los inmunoensayos varía ligeramente en función del pH, especialmente a pH inferior a 5.5, donde se produce una disminución significativa de este parámetro. Con respecto a la I_{50} , el efecto más drástico se observa en el inmunoensayo de imazalil (AcMo IMH 5.1) que muestra un aumento importante de dicho parámetro a pH ácido. Por el contrario, los inmunoensayos realizados con los otros dos anticuerpos (AcMo DTPH 4.1 y AcMo HH 1.4) presentan menor variación de la sensibilidad en función del pH, e incluso se observa una disminución de I_{50} a pH ligeramente ácido. Así pues, teniendo en cuenta ambos parámetros e intentando unificar condiciones de ensayo como en los casos anteriores, se optó por un tampón con un pH próximo a la neutralidad (pH 7.4) para la realización de posteriores inmunoensayos.

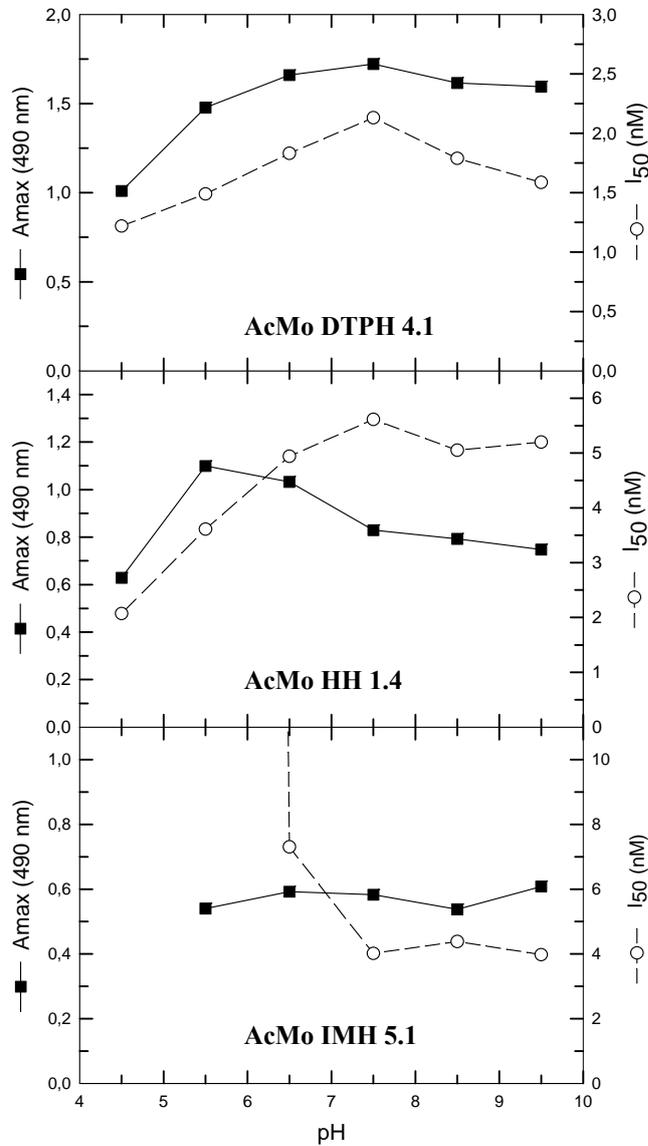


Figura 3.12. Influencia del pH sobre la A_{max} (■) y la I_{50} (○) de los inmunoensayos, basados en anticuerpos monoclonales, de tetraconazol, hexaconazol e imazalil. Los datos se obtuvieron a partir de curvas competitivas realizadas por triplicado.

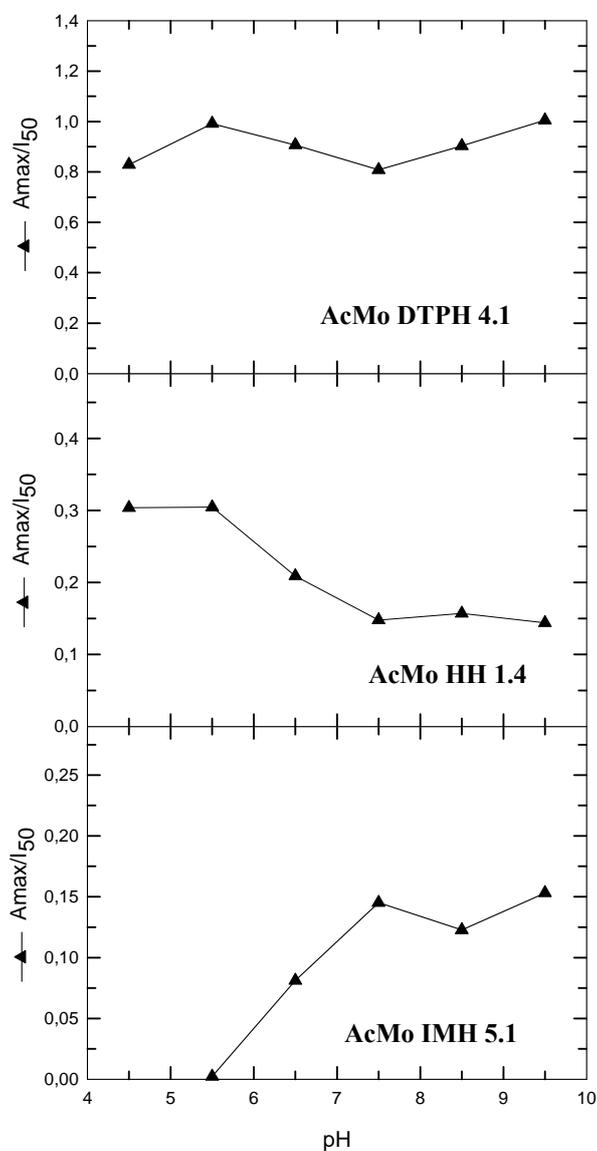


Figura 3.13. Influencia del pH sobre el cociente A_{max}/I_{50} de los inmunoensayos, basados en anticuerpos monoclonales, de tetraconazol, hexaconazol e imazalil. Los datos se obtuvieron a partir de curvas competitivas realizadas por triplicado.

5.1.5. Tolerancia a disolventes orgánicos.

La curva estándar se preparó en tampón PBS y los anticuerpos se diluyeron en tampones PBS, 0.0025% Tween, pH 7.4, con diferentes proporciones de disolventes miscibles con agua (acetona, metanol, isopropanol, acetonitrilo y etanol). Los resultados de A_{\max} e I_{50} se muestran en las Figuras 3.14, 3.15 y 3.16. Tanto en los ensayos del AcMo DTPH 4.1 como en los del AcMo HH 1.4 se observa una clara disminución de la señal máxima cuando se añaden porcentajes crecientes de la mayoría de disolventes al tampón. Con respecto a la I_{50} de ambos ensayos, el efecto del disolvente es diferente. Mientras que en los ensayos del AcMo DTPH 4.1 se observa un aumento de la I_{50} a medida que aumenta la proporción de los disolventes ensayados, los ensayos con el AcMo HH 1.4 presentan una disminución de dicho valor. Por su parte, en los inmunoensayos con el AcMo IMH 5.1 no se observa una clara disminución de la señal máxima, pero sí un aumento notable de la I_{50} , en presencia de porcentajes crecientes de la mayoría de disolventes. A la vista de los resultados, se puede concluir que, en el caso del ensayo del AcMo IMH 5.1, el disolvente más tolerado es el metanol, el cual no parece afectar a la señal máxima y sólo afecta ligeramente a la I_{50} del ensayo a partir de 5%. En el caso de los otros anticuerpos monoclonales, sólo son tolerados porcentajes muy bajos de metanol (entre 1 y 2%).

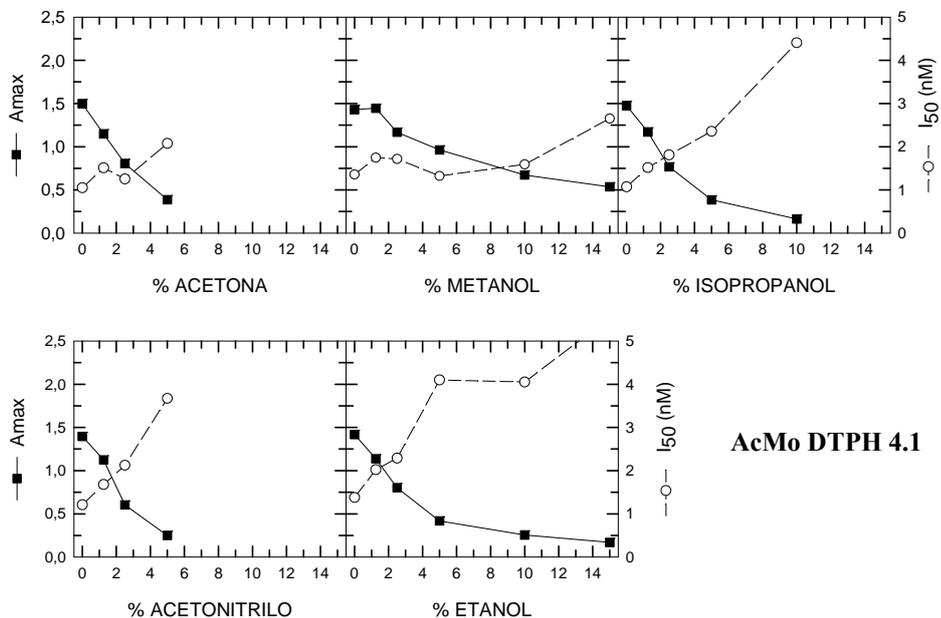


Figura 3.14. Efecto del porcentaje de disolvente orgánico en el tampón de ensayo sobre la A_{max} (■) y la I_{50} (○) de los inmunoensayos basados en anticuerpos monoclonales de tetraconazol. Los datos se obtuvieron a partir de curvas competitivas realizadas por triplicado. Algunos valores de A_{max} e I_{50} no aparecen en las gráficas porque las correspondientes curvas no se ajustaban a la ecuación de 4 parámetros.

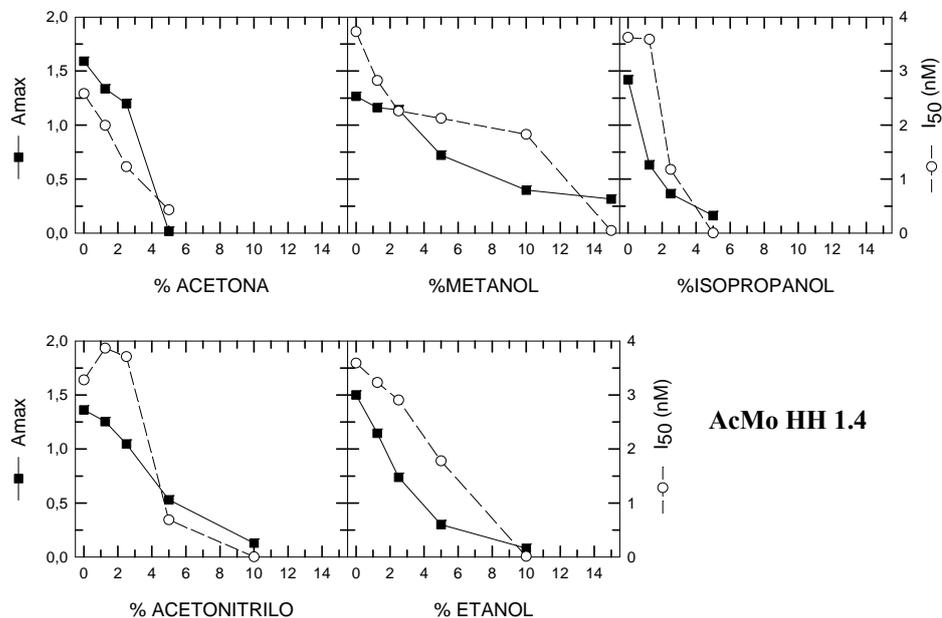


Figura 3.15. Efecto del porcentaje de disolvente orgánico en el tampón de ensayo sobre la A_{max} (■) y la I_{50} (○) de los inmunoensayos basados en anticuerpos monoclonales de hexaconazol. Los datos se obtuvieron a partir de curvas competitivas realizadas por triplicado. Algunos valores de A_{max} e I_{50} no aparecen en las gráficas porque las correspondientes curvas no se ajustaban a la ecuación de 4 parámetros.

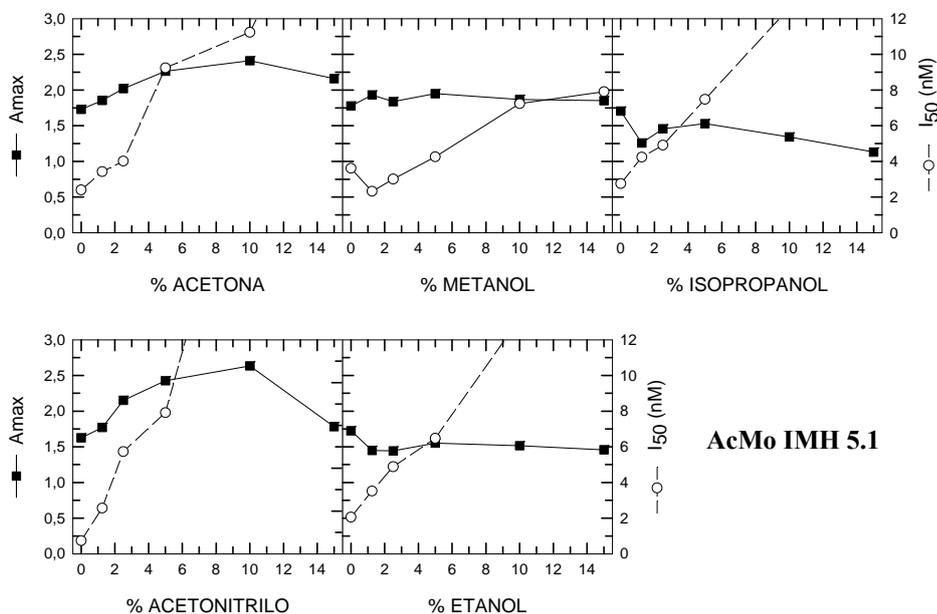


Figura 3.16. Efecto del porcentaje de disolvente orgánico en el tampón de ensayo sobre la A_{max} (■) y la I_{50} (○) de los inmunoensayos basados en anticuerpos monoclonales de imazalil. Los datos se obtuvieron a partir de curvas competitivas realizadas por triplicado. Algunos valores de A_{max} e I_{50} no aparecen en las gráficas porque las correspondientes curvas no se ajustaban a la ecuación de 4 parámetros.

5.2. Inmunoensayos con anticuerpos recombinantes.

En primer lugar, para seleccionar tanto el conjugado de ensayo como las concentraciones óptimas de inmunorreactivos para cada uno de los inmunoensayos configurados con anticuerpos recombinantes, se desarrollaron ELISAs bidimensionales con los conjugados OVA-IMH, OVA-HH, OVA-DTPH y OVA-DTPO, y se escogieron las parejas conjugado-anticuerpo que proporcionaban una A_{max} entre 1 y 2. A continuación, se desarrollaron ELISAs

competitivos empleando dichas parejas de reactivos para comparar sus valores de I_{50} .

En la Tabla 3.11 se muestran las parejas de inmunorreactivos que mejores resultados proporcionaron en cada uno de los inmunoensayos de anticuerpos recombinantes de tetraconazol.

Tabla 3.11. Influencia del conjugado de tapizado sobre la afinidad de los anticuerpos recombinantes de tetraconazol.

AcRb	Dilución en ensayo	Conjugado OVA-hapteno	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	A_{max}	I_{50} (ng/ml)
DTPH H-4.1	1/1000	O-DTPH	0.25	1.4	9
	1/640	O-HH	0.5	1.8	8
	1/640	O-DTPO	0.25	2.4	11
DTPH H-4.1-pIII	1/120	O-DTPH	0.25	1.4	8
	1/20	O-HH	0.5	1.4	20
	1/80	O-DTPO	1	1.8	7
DTPH L-1.1	1/320	O-DTPH	0.25	1.1	6
	1/320	O-HH	1	0.9	6
	1/320	O-DTPO	0.5	2.1	7
DTPH L-1.1-pIII	1/80	O-DTPH	0.5	1.4	7
	1/20	O-HH	1	1.3	21
	1/80	O-DTPO	1	1.1	5
DTPH L-1.2	1/640	O-DTPH	0.5	1.5	9
	1/280	O-HH	1	1.0	7
	1/280	O-DTPO	0.25	1.1	12
DTPH L-1.2-pIII	1/640	O-DTPH	0.5	1.1	5
	1/640	O-HH	1	1.2	16
	1/640	O-DTPO	1	0.9	5

Como se puede observar, en el caso de los anticuerpos recombinantes de tetraconazol, el empleo de conjugados heterólogos para el tapizado de las placas de ELISA no disminuyó significativamente la I_{50} del ensayo. Por el contrario, en algunos casos, se observó que los inmunoensayos con el conjugado OVA-HH presentaron un valor de I_{50} aproximadamente 3 veces superior al obtenido con el conjugado homólogo. También se observó que, en general, el empleo de dicho conjugado proporcionaba curvas con una pendiente muy pronunciada ($B > 3$). Aunque, en teoría, la pendiente de la curva es el parámetro que indica realmente la sensibilidad del ensayo y, a mayor pendiente, mayor sensibilidad (Tijssen, 1985) una pendiente muy elevada implica también un rango de trabajo estrecho y, por tanto, es desaconsejable el uso de parejas de inmunorreactivos que proporcionen pendientes tan elevadas como las obtenidas con el conjugado OVA-HH. Entre los valores de I_{50} obtenidos con O-DTPH y O-DTPO no se observaron diferencias significativas, de modo que se optó por el conjugado homólogo ya que era del que mayor cantidad se disponía en el laboratorio.

Por otro lado, los anticuerpos recombinantes de imazalil y hexaconazol únicamente reconocieron a los conjugados homólogos. En el caso de los inmunoensayos con los anticuerpos recombinantes frente a imazalil, fue necesario trabajar con concentraciones altas de conjugado. Una disminución en la concentración de conjugado no mejoró la sensibilidad del ensayo, por lo que se optó por economizar el empleo de anticuerpo ya que supone una mayor dificultad de obtención.

En la Tabla 3.12 se presenta un resumen de las parejas anticuerpo/conjugado de tapizado seleccionadas definitivamente para el desarrollo de cada inmunoensayo.

Tabla 3.12. Características de los inmunoensayos configurados con los anticuerpos recombinantes frente a tetraconazol, hexaconazol e imazalil.

Analito	Anticuerpo recombinante	Dilución ⁽¹⁾ en ensayo	Conjugado (OVA-hapteno)	Concentración de conjugado ($\mu\text{g/ml}$)	A_{max}	I_{50} (ng/ml)
Tetraconazol	DTPH H-4.1-pIII	1/120	O-DTPH	0.25	1.4	8
	DTPH H-4.1	1/1000	O-DTPH	0.25	1.4	9
	DTPH L-1.2-pIII	1/640	O-DTPH	0.5	1.1	5
	DTPH L-1.2	1/640	O-DTPH	0.5	1.5	9
Imazalil	IMH H-5.1-pIII	1/80	O-IMH	4	0.6	9
	IMH H-5.1	1/80	O-IMH	4	1.1	38
Hexaconazol	HH H-1.4-pIII	1/120	O-HH	1	1.0	3
	HH H-1.4	1/80	O-HH	1	1.4	4

⁽¹⁾ Dilución del sobrenadante procedente de las colonias productoras de AcRb frente a cada analito.

En la tabla no se han incluido las condiciones establecidas para el AcRb DTPH L-1.1, ya que tras un periodo largo de almacenamiento a -20°C , se observó una pérdida gradual de la señal máxima a medida que se desarrollaban los ensayos. Por tanto, se descartó dicho anticuerpo y se continuó el trabajo únicamente con el AcRb DTPH L-1.2.

Una vez seleccionadas las concentraciones de reactivos, se repitieron los inmunoensayos, pero aplicando las condiciones de pH, concentración de Tween y fuerza iónica establecidas como óptimas para los inmunoensayos de anticuerpos monoclonales. No se observaron diferencias significativas en los valores de A_{max} e I_{50} y, en algunos casos, incluso se mejoró ligeramente alguno de estos valores. Por tanto, para facilitar el trabajo de laboratorio, se consideró oportuno aplicar las mismas condiciones a todos los ensayos. Las curvas estándar y sus correspondientes parámetros analíticos se muestran en el siguiente apartado.

6. COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LOS ANTICUERPOS RECOMBINANTES Y DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.

6.1. Parámetros analíticos del ensayo.

En las Figuras 3.17, 3.18 y 3.19 se muestran las curvas estándar de cada uno de los anticuerpos producidos frente a tetraconazol, hexaconazol e imazalil, respectivamente. Resulta evidente que los anticuerpos recombinantes obtenidos frente a tetraconazol presentan un comportamiento semejante entre ellos, caracterizado por una afinidad hacia el analito libre menor que la del monoclonal del cual derivan. Por su parte, los anticuerpos recombinantes frente a hexaconazol son los que proporcionan las curvas, y por tanto los parámetros analíticos, más parecidas a la del anticuerpo monoclonal parental. Finalmente, se puede observar una clara diferencia entre las curvas obtenidas con el anticuerpo AcRb IMH H-5.1 y el AcRb IMH H-5.1-pIII, al cual parece afectar favorablemente el hecho de estar unido a la proteína pIII del fago M13.

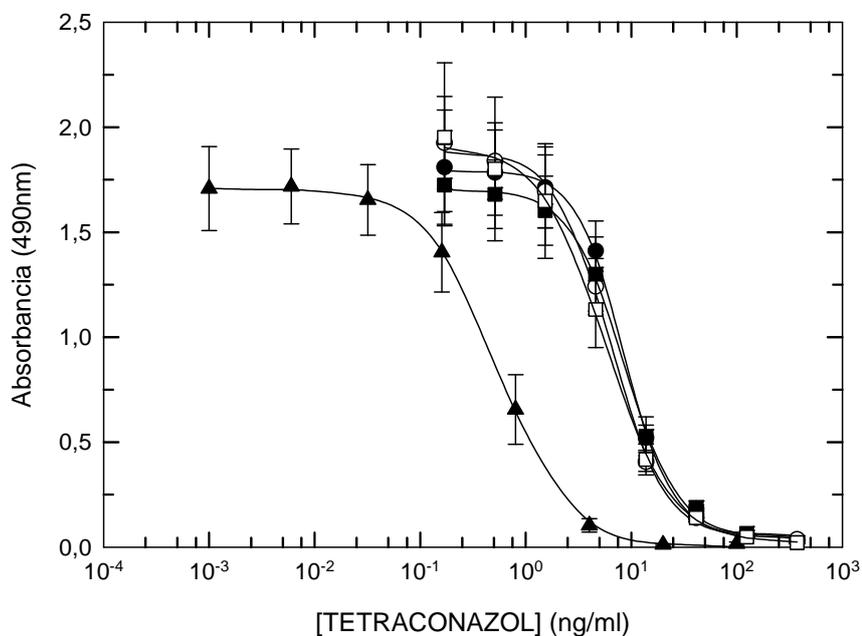


Figura 3.17. Curvas estándar de los inmunoensayos de tetraconazol. Anticuerpos monoclonales (▲), anticuerpos recombinantes procedentes de hibridomas expresados como proteína libre scFv (●), anticuerpos recombinantes procedentes de hibridomas expresados como proteína de fusión scFv-pIII (■), anticuerpos recombinantes procedentes de linfocitos expresados como proteína libre scFv (○), anticuerpos recombinantes procedentes de linfocitos expresados como proteína de fusión scFv-pIII (□). Los datos se obtuvieron a partir de curvas competitivas realizadas por triplicado.

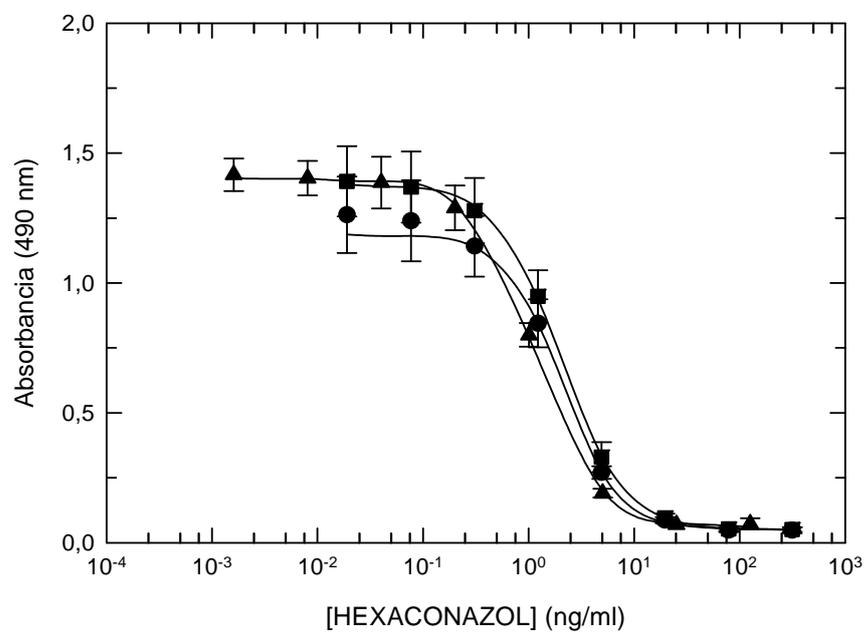


Figura 3.18. Curvas estándar de los inmunosayos de hexaconazol. Anticuerpos monoclonales (▲), anticuerpos recombinantes procedentes de hibridomas expresados como proteína libre scFv (●), anticuerpos recombinantes procedentes de hibridomas expresados como proteína de fusión scFv-pIII (■). Los datos se obtuvieron a partir de curvas competitivas realizadas por triplicado.

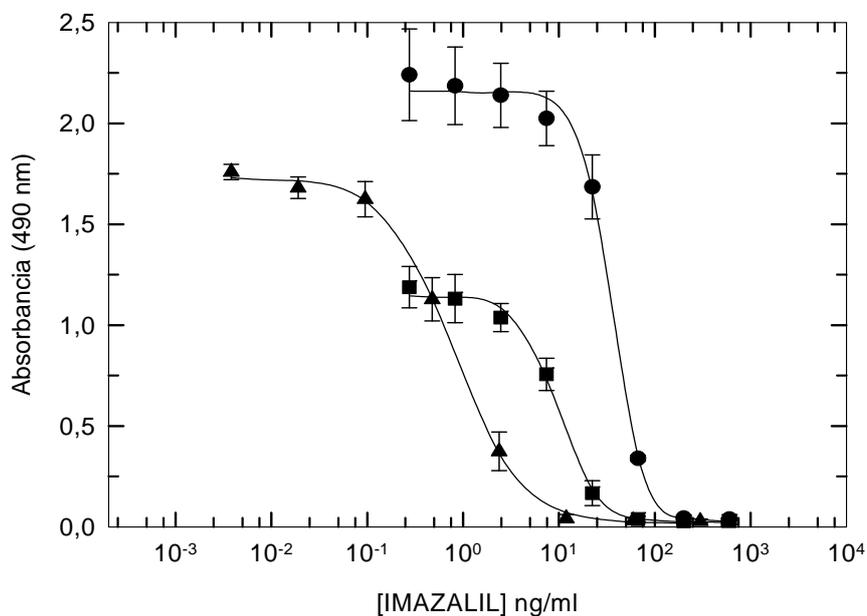


Figura 3.19. Curvas estándar de los inmunoensayos de imazalil. Anticuerpos monoclonales (▲), anticuerpos recombinantes procedentes de hibridomas expresados como proteína libre scFv (●), anticuerpos recombinantes procedentes de hibridomas expresados como proteína de fusión scFv-pIII (■). Los datos se obtuvieron a partir de curvas competitivas realizadas por triplicado.

A continuación, en la Tabla 3.13 se presentan las características de los inmunoensayos optimizados para los fungicidas en estudio, desarrollados con los anticuerpos monoclonales y recombinantes. Los parámetros analíticos se estimaron a partir de las curvas de las figuras anteriores.

En primer lugar, se puede observar que los inmunoensayos de tetraconazol basados en AcRbs presentan valores de I_{50} (entre 5.7 y 8.5 ng/ml) un orden de

magnitud mayor que los inmunoensayos realizados con el AcMo (I_{50} de 0.5 ng/ml). Del mismo modo, los otros parámetros de interés, LOD y rango de trabajo, de los ELISAs de anticuerpos recombinantes mantienen la misma relación con los del ELISA del anticuerpo monoclonal.

En segundo lugar, se puede observar que los LOD de los inmunoensayos de hexaconazol, basados tanto en anticuerpos recombinantes como en anticuerpos monoclonales, son comparables entre sí. Por otra parte, los valores de I_{50} de los ELISAs desarrollados con anticuerpos recombinantes (2 ng/ml) son ligeramente superiores, aunque del mismo orden de magnitud, que el del desarrollado con el anticuerpo monoclonal (1.1 ng/ml).

Finalmente, los resultados obtenidos con los anticuerpos de imazalil son los más peculiares ya que, en este caso, se observan claras diferencias entre los parámetros analíticos obtenidos empleando el anticuerpo recombinante expresado como proteína libre scFv y el anticuerpo expresado como proteína de fusión scFv-pIII. El LOD y el rango de trabajo del ensayo basado en el AcRb IMH H-5.1 en su forma soluble (scFv) son mayores que los de los inmunoensayos basados en el AcMo IMH 5.1 y en el AcRb IMH H-5.1-pIII. De igual modo, el valor de I_{50} del ELISA realizado con la proteína de fusión scFv-pIII (9.6 ng/ml) es un orden de magnitud mayor que el del ELISA del anticuerpo monoclonal (0.8 ng/ml), mientras que el obtenido empleando la proteína soluble scFv (35 ng/ml) es casi 50 veces superior. Por tanto, en este caso, la unión del fragmento scFv a la proteína pIII mejora, aparentemente, las propiedades analíticas del anticuerpo recombinante.

Tabla 3.13. Parámetros analíticos de las curvas estándar de tetraconazol, hexaconazol e imazalil obtenidas con los anticuerpos monoclonales y recombinantes.

Analito	Anticuerpo	Parámetros		
		I ₅₀ (ng/ml)	Rango de trabajo (ng/ml)	LOD (ng/ml)
Tetraconazol	AcMo DTPH 4.1	0.5	0.2-1.6	0.1
	AcRb DTPH H-4.1	8.5	3.8-18.5	2.2
	AcRb DTPH H-4.1-pIII	8.6	3.4-20.3	1.8
	AcRb DTPH L-1.2	6.4	2.5-15.0	1.3
	AcRb DTPH L-1.2-pIII	5.7	1.9-15.4	0.9
Hexaconazol	AcMo HH 1.4	1.1	0.4-2.9	0.2
	AcRb HH H-1.4	2.1	0.9-4.9	0.5
	AcRb HH H-1.4-pIII	2.0	0.8-5.3	0.4
Imazalil	AcMo IMH 5.1	0.5	0.3-2.4	0.1
	AcRb IMH H-5.1	35.0	21.0-59.0	15.0
	AcRb IMH H-5.1-pIII	9.6	5.0-19.0	3.4

6.2. Estudio de la especificidad de los inmunoensayos.

El estudio de la especificidad de ensayo es un aspecto muy importante a tener en cuenta a la hora de poner a punto un inmunoensayo, ya que es posible que el anticuerpo empleado sea capaz de reconocer a otros compuestos relacionados con el plaguicida de interés, lo que implicaría un problema en la cuantificación de dicho plaguicida. Sin embargo, aunque a menudo la falta de especificidad suele considerarse como un aspecto negativo, anticuerpos que presentan reactividad cruzada pueden emplearse para la detección cualitativa simultánea de un conjunto de analitos relacionados entre sí. En cualquier caso, es importante conocer la especificidad de cada anticuerpo para poder estudiar las posibles aplicaciones del inmunoensayo.

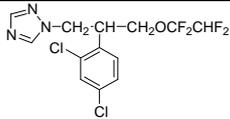
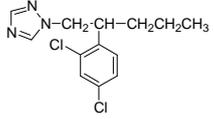
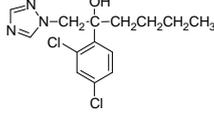
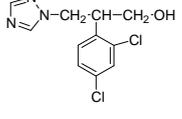
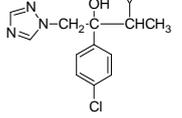
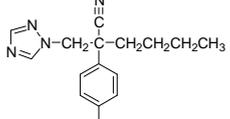
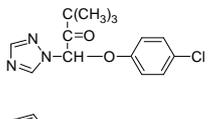
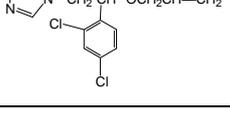
La especificidad de los inmunoensayos desarrollados con anticuerpos monoclonales y recombinantes de tetraconazol, hexaconazol e imazalil se evaluó

mediante la realización de ELISAs competitivos frente a compuestos de la familia de los conazoles, estructuralmente relacionados con los analitos. Los parámetros analíticos obtenidos en cada ensayo se emplearon para calcular la reactividad cruzada, de acuerdo con la expresión descrita en el apartado 5.2 de la sección de *Materiales y Métodos*. A continuación, se presentan los resultados de reactividad cruzada obtenidos al realizar los inmunoensayos frente a tetraconazol, penconazol, imazalil, hexaconazol, DTP, cyproconazol, myclobutanil y triadimefon. Se ensayaron también otros fungicidas que no dieron resultados de reactividad cruzada en ninguno de los casos, por ello sólo se han incluido en las tablas los más relacionados estructuralmente con los analitos de estudio.

En la Tabla 3.14 se muestran los resultados de reactividad cruzada obtenidos con los anticuerpos de tetraconazol. Como se puede observar, tanto el anticuerpo monoclonal como los anticuerpos recombinantes presentan reactividad cruzada frente a algunos de los compuestos ensayados. El patrón general de todos los anticuerpos se caracteriza por un elevado reconocimiento de penconazol y un bajo reconocimiento de hexaconazol y triadimefon. Además, los 5 anticuerpos reconocen, en mayor o menor medida, al resto de analitos. También se puede apreciar que los anticuerpos recombinantes presentan un patrón de reconocimiento parecido, aunque no idéntico, al del anticuerpo monoclonal. En concreto, los anticuerpos derivados del material genético de hibridomas muestran un reconocimiento ligeramente superior de la mayoría de los compuestos ensayados, mientras que los anticuerpos recombinantes procedentes del material genético de linfocitos reconocen peor al cyproconazol y triadimefon.

En lo que respecta a las dos formas de expresión del anticuerpo recombinante, como proteína libre (scFv) y como proteína de fusión (scFv-pIII), no se observaron diferencias significativas de especificidad entre ellas.

Tabla 3.14. Reactividad cruzada de los inmunoensayos desarrollados con anticuerpos monoclonales y recombinantes de tetraconazol.

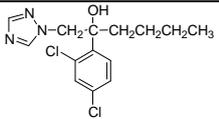
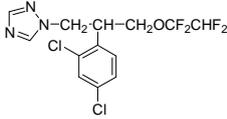
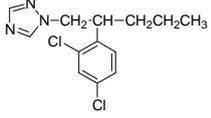
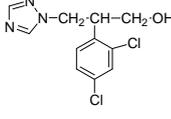
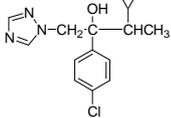
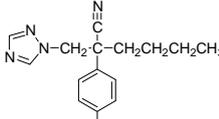
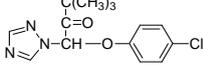
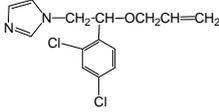
Estructura química	Compuesto	Reactividad cruzada (%)				
		AcMo DTPH	AcRb DTPH			
		4.1	H-4.1 (scFv)	H-4.1 (scFv-pIII)	L-1.2 (scFv)	L-1.2 (scFv-pIII)
	Tetraconazol	100 (4) ⁽¹⁾	100 (32)	100 (28)	100 (25)	100 (22)
	Penconazol	44	87	90	64	47
	Hexaconazol	<0.1	0.5	0.7	<0.1	<0.1
	DTP	24	58	50	40	29
	Cyproconazol	32	63	50	7	5
	Myclobutanil	14	33	26	13	11
	Triadimefon	1	1	1	0.2	0.1
	Imazalil	1.5	2.5	2.7	<0.1	<0.1

⁽¹⁾ Los números entre paréntesis corresponden a la I₅₀ (nM) para el analito principal, obtenida en los ensayos de reactividad cruzada.

En la Tabla 3.15 se muestran los resultados de reactividad cruzada de los anticuerpos de hexaconazol. Como se puede observar, el anticuerpo monoclonal AcMo HH 1.4 presenta una gran especificidad de ensayo, ya que no reconoce significativamente a ninguno de los compuestos ensayados. Asimismo, el anticuerpo recombinante procedente de hibridomas, expresado tanto en forma de proteína libre como en forma de proteína de fusión, proporciona un inmunoensayo específico de hexaconazol.

De igual modo, los anticuerpos de imazalil, tanto el monoclonal AcMo IMH 5.1 como los recombinantes AcRb IMH H-5.1 y AcRb IMH H-5.1-pIII, proporcionan inmunoensayos claramente específicos. Los resultados se muestran en la Tabla 3.16. Por tanto, a pesar de las grandes diferencias mostradas en los parámetros analíticos de los anticuerpos recombinantes, en términos de especificidad dichos anticuerpos son similares.

Tabla 3.15. Reactividad cruzada de los inmunoensayos desarrollados con anticuerpos monoclonales y recombinantes de hexaconazol.

Estructura química	Compuesto	Reactividad cruzada (%)		
		AcMo	AcRb	
		HH 1.4	HH H-1.4 (scFv)	HH H-1.4 (scFv-pIII)
	Hexaconazol	100 (9) ⁽¹⁾	100 (9)	100 (9)
	Tetraconazol	<0.1	0.3	0.3
	Penconazol	<0.1	0.1	0.1
	DTP	0.2	0.2	0.1
	Cyproconazol	<0.1	<0.1	<0.1
	Myclobutanil	<0.1	<0.1	<0.1
	Triadimefon	<0.1	<0.1	<0.1
	Imazalil	<0.1	<0.1	<0.1

(1) Los números entre paréntesis corresponden a la I₅₀ (nM) para el analito principal, obtenida en los ensayos de reactividad cruzada.

Tabla 3.16. Reactividad cruzada de los inmunoensayos desarrollados con anticuerpos monoclonales y recombinantes de imazalil.

Estructura química	Compuesto	Reactividad cruzada (%)		
		AcMo	AcRb	
		IMH 5.1	IMH H-5.1 (scFv)	IMH H-5.1 (scFv-pIII)
	Imazalil	100 (4) ⁽¹⁾	100 (200)	100 (39)
	Tetraconazol	<0.1	<0.1	<0.1
	Penconazol	0.1	0.6	0.4
	Hexaconazol	<0.1	<0.1	<0.1
	DTP	<0.1	<0.1	<0.1
	Cyproconazol	<0.1	<0.1	<0.1
	Myclobutanil	<0.1	<0.1	<0.1
	Triadimefon	<0.1	<0.1	<0.1

⁽¹⁾ Los números entre paréntesis corresponden a la I₅₀ (nM) para el analito principal, obtenida en los ensayos de reactividad cruzada.

6.3. Recapitulación.

En primer lugar, a partir de cada uno de los hibridomas seleccionados se han obtenido los correspondientes anticuerpos recombinantes, que se han expresado tanto en su forma scFv como scFv-pIII. En el caso de los inmunoensayos de tetraconazol e imazalil, basados en anticuerpos recombinantes, los valores de I_{50} fueron claramente superiores (al menos un orden de magnitud) a los de los inmunoensayos realizados con los anticuerpos monoclonales parentales. Por el contrario, los inmunoensayos de hexaconazol, realizados tanto con anticuerpos recombinantes como con el monoclonal, presentaron una sensibilidad comparable, aunque ligeramente menor en el caso de los AcRbs. Estos resultados están de acuerdo con los presentados por otros autores. Así, se ha descrito la obtención, a partir de hibridomas, de fragmentos scFv frente a moléculas de pequeño tamaño que mostraban una afinidad hacia el analito comparable a (Nishi *et al.*, 2005; Alcocer *et al.*, 2000; Garret *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 1997) o menor que (Navarro-Teulón *et al.*, 1995; Kramer y Hock, 1996; Graham *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 2004) la de los anticuerpos monoclonales de origen. Por otro lado, otros autores han publicado la obtención de anticuerpos recombinantes con una afinidad ligeramente mayor que la del anticuerpo monoclonal del que derivan. Alcocer *et al.* (2000) describieron la obtención de un anticuerpo recombinante con el que llevaron a cabo inmunoensayos frente a clorpirifos con un valor de I_{50} de 1 $\mu\text{g/ml}$ mientras que el de los ensayos con el anticuerpo monoclonal original era de 4.2 $\mu\text{g/ml}$. Pan *et al.* (2006) desarrollaron ELISAs de clembuterol basados en anticuerpos recombinantes, con un valor de I_{50} (0.78 ng/ml) del mismo orden aunque ligeramente inferior al del ELISA basado en el anticuerpo monoclonal (1.34 ng/ml). Finalmente, Strachan *et al.* (1998) obtuvieron un anticuerpo recombinante frente a atrazina con una afinidad hacia el analito 6 veces superior a la del anticuerpo monoclonal.

Aunque podría pensarse que los anticuerpos recombinantes procedentes de hibridomas deben mantener el sitio de unión al antígeno idéntico a los sitios de unión del anticuerpo monoclonal y, por tanto, sus propiedades analíticas deben ser semejantes, esto no siempre ocurre. Atendiendo únicamente a la valencia de cada uno de los anticuerpos, algunos autores afirman que la monovalencia del anticuerpo recombinante favorece la sensibilidad del ensayo. Esto se debe a que en presencia de concentraciones bajas de analito, uno de los sitios de unión del anticuerpo monoclonal puede quedar libre para unirse al conjugado, mientras que en el caso de los anticuerpos recombinantes el único sitio de unión estará unido al

analito libre (Pan *et al.*, 2006). Estos resultados siguen la misma línea que los presentados con anterioridad por Grant *et al.* (1999), que desarrollaron inmunoensayos de atrazina con un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo recombinante monovalente y un anticuerpo recombinante divalente, siendo el inmunoensayo realizado con el anticuerpo monovalente significativamente más sensible que los otros dos.

Sin embargo, existen otros factores, además de la valencia, que afectan a las propiedades de unión del anticuerpo (Kramer y Hock, 2003):

- En primer lugar, la estructura globular del fragmento scFv y del AcMo puede ser diferente. El fragmento scFv representa únicamente una pequeña parte del anticuerpo monoclonal, por lo que su estructura terciaria no tiene por qué coincidir con la de la proteína natural.
- El espaciador polipeptídico flexible introducido entre la cadena ligera y la cadena pesada no forma parte de la molécula original y puede repercutir en cambios conformacionales. En este sentido, las moléculas tipo Fab, imitan mejor la estructura del anticuerpo monoclonal.
- Durante el proceso de clonación de los fragmentos scFv pueden producirse, como resultado de errores en la PCR, alteraciones de la secuencia del DNA original debido a mutaciones, inserciones o deleciones.
- Finalmente, como ya se ha mencionado con anterioridad (apartado 1.2 de esta sección), los hibridomas poseen el material genético tanto de linfocitos como de las células de los mielomas necesarios para propagar la línea celular. De esta manera, durante el ensamblaje del fragmento scFv, las cadenas provenientes de linfocitos pueden asociarse a cadenas inespecíficas de los mielomas dando lugar a fragmentos de anticuerpo recombinantes con propiedades diferentes (habitualmente peores) a las del anticuerpo monoclonal original.

En segundo lugar, en lo que respecta a los anticuerpos recombinantes procedentes de linfocitos de ratones inmunizados, se ha obtenido un anticuerpo recombinante frente a tetraconazol, con propiedades similares a las del anticuerpo recombinante procedente de hibridomas y, por tanto, con menor afinidad hacia el analito que el anticuerpo monoclonal. También se obtuvo un anticuerpo recombinante capaz de reconocer al conjugado de hexaconazol pero

con relativamente poca afinidad hacia el analito libre, por lo que se descartó para posteriores aplicaciones analíticas. Por último, no se obtuvo ningún AcRb a partir del material genético de linfocitos de ratones inmunizados frente a imazalil.

El empleo de linfocitos como fuente de material genético para la obtención de anticuerpos recombinantes frente a moléculas de pequeño tamaño está mucho menos extendido que el uso de hibridomas. Así, se han publicado estudios que describen la obtención de fragmentos scFv a partir de diversos animales inmunizados (Brichta *et al.*, 2005). Tout *et al.* (2001) sintetizaron fragmentos scFv a partir de ratones hiperinmunizados frente a picloram que mostraron una afinidad por el analito comparable a la del anticuerpo monoclonal y a la del anticuerpo recombinante procedente de hibridomas. Li *et al.* (2006) describieron la obtención de fragmentos scFv a partir de ratones inmunizados frente a metamidophos y el desarrollo de inmunoensayos que proporcionaron un valor de I_{50} entre 18 y 46 ng/ml. Estos valores mejoraron los obtenidos con el anticuerpo monoclonal de referencia, aunque en este caso, la afinidad del monoclonal por el analito era realmente baja (el valor de la I_{50} del inmunoensayo era de 180 µg/ml). Por otro lado, Charlton *et al.* (2001) llevaron a cabo ELISAs de atrazina con fragmentos scFv obtenidos a partir de linfocitos de ovejas inmunizadas, que mostraron una afinidad mayor que los realizados por Strachan *et al.* (1998) con AcRbs obtenidos a partir de hibridomas. Por último, Finlay *et al.* (2006) describieron la obtención de anticuerpos recombinantes de alta afinidad frente al ácido domoico a partir de pollos inmunizados.

Finalmente, es importante destacar que a pesar de que los inmunoensayos basados en los anticuerpos recombinantes (tanto procedentes de material genético de hibridomas como de linfocitos) no mejoraron los resultados obtenidos con los anticuerpos monoclonales producidos en el laboratorio, sí que son comparables e incluso más sensibles que algunos inmunoensayos publicados por otros autores para la detección de fungicidas azólicos con anticuerpos monoclonales y policlonales (Chen *et al.*, 1996; Cairoli *et al.*, 1996; Székács *et al.*, 1995; Danks *et al.*, 2001).

En lo que respecta a la especificidad del inmunoensayo, parece razonable asumir que si un anticuerpo monoclonal, secretado por un hibridoma, no es capaz de reconocer a un compuesto análogo al analito, los anticuerpos recombinantes obtenidos a partir de dicho hibridoma tampoco lo serán. Sin embargo, como ya se ha comentado con detalle, existen ciertos factores que pueden afectar tanto a la

secuencia como a la estructura del anticuerpo recombinante, repercutiendo en sus propiedades analíticas, incluyendo la especificidad del ensayo. Así pues, aunque en la mayoría de los casos descritos los anticuerpos recombinantes procedentes de hibridomas presentan una reactividad cruzada comparable a la del anticuerpo monoclonal parental, algunos autores como Alcocer *et al.* (2000) y Yuan *et al.* (1996) han publicado la obtención de fragmentos scFv con patrones de reconocimiento diferentes a los de sus respectivos anticuerpos monoclonales.

7. APLICACIÓN DE LOS INMUNOENSAYOS AL ANÁLISIS DE LOS PLAGUICIDAS EN MUESTRAS FORTIFICADAS.

La finalidad de los inmunoensayos es su empleo como método analítico alternativo o complementario a otras técnicas de detección previamente existentes. Para ello, una vez se han desarrollado los inmunoensayos, es necesario demostrar su aplicabilidad mediante el análisis de los plaguicidas en cuestión en matrices de interés. La adición de cantidades determinadas de analito a muestras reales es una práctica bastante utilizada para realizar una evaluación preliminar de la fiabilidad analítica de los inmunoensayos.

En este apartado, se describe la aplicación de los inmunoensayos, basados tanto en anticuerpos monoclonales como en anticuerpos recombinantes, a zumos de fruta fortificados con cantidades conocidas de los plaguicidas estudiados.

En trabajos anteriores (Manclús *et al.*, 2008; Moreno *et al.* 2007) se estudió el efecto de la matriz sobre los inmunoensayos, basados en anticuerpos monoclonales, de tetraconazol, hexaconazol e imazalil en zumos de fruta. En estos estudios se determinó que, aplicando diluciones superiores a 1/50 (en ensayo) se obtenían datos de recuperación y precisión aceptables. Estos estudios no se repitieron para los anticuerpos recombinantes pero, con la finalidad de evitar posibles interferencias, se emplearon diluciones mayores (superiores a 1/200 en ensayo) de las muestras fortificadas.

Cada placa de ELISA incluyó su propia curva estándar, de modo que las señales obtenidas a partir de las muestras se interpolaron sobre la curva presente en la misma placa.

7.1. Determinación de tetraconazol en zumos de fruta.

Los zumos de naranja y manzana se fortificaron con 1000, 2000 y 5000 ng/ml de tetraconazol a partir de un stock a 372.1 µg/ml en DMF. De este modo, las concentraciones de tetraconazol añadidas a las muestras son del mismo orden de magnitud que los LMRs establecidos para dicho plaguicida en muestras agroalimentarias. A continuación, las muestras se diluyeron 500, 1000 y 2500 veces en PBS, respectivamente, antes de analizarlas mediante el ELISA del anticuerpo monoclonal y 100, 100 y 500 veces, respectivamente, antes de

analizarlas mediante los ELISAs de los anticuerpos recombinantes. Para poder comparar los inmunoensayos basados en los anticuerpos recombinantes y el del anticuerpo monoclonal, se analizó la misma muestra mediante los dos tipos de inmunoensayo. Como la sensibilidad del inmunoensayo del anticuerpo monoclonal es un orden de magnitud mayor que la de los inmunoensayos de los anticuerpos recombinantes, las diluciones aplicadas en los inmunoensayos con anticuerpos monoclonales fueron muy elevadas. Al aplicar las diluciones correspondientes, la concentración de tetraconazol en ensayo, para cada una de las muestras, se halló, en la mayoría de los casos, dentro del rango de trabajo de cada inmunoensayo.

Las Tablas 3.17 y 3.18 reflejan los resultados obtenidos en la determinación de tetraconazol en zumos de manzana y naranja, respectivamente. En general, la reproducibilidad del ensayo se puede considerar aceptable ya que la mayoría de los coeficientes de variación se encuentran por debajo del 20 %. Los porcentajes de recuperación son bastante satisfactorios, variando entre el 78 % y el 145 %. Por otro lado, no se observan diferencias significativas entre los resultados obtenidos mediante los inmunoensayos basados en los anticuerpos recombinantes y el basado en el anticuerpo monoclonal, ni entre los obtenidos con los distintos tipos de anticuerpos recombinantes.

Tabla 3.17. Análisis comparativo de tetraconazol en muestras fortificadas de zumo de manzana mediante inmunoensayos basados en distintos tipos de anticuerpos.

Zumo de manzana				
Anticuerpo	Tetraconazol añadido (ng/ml)	Tetraconazol recuperado⁽¹⁾ (ng/ml)	C.V. (%)	Recuperación (%)
AcMo DTPH 4.1	1000	1190	18	119
	2000	1681	10	84
	5000	3922	14	78
AcRb DTPH H-4.1	1000	1091	7	109
	2000	2116	5	106
	5000	4401	13	88
AcRb DTPH H-4.1-pIII	1000	1172	1	117
	2000	2151	12	108
	5000	4757	7	95
AcRb DTPH L-1.2	1000	875	3	88
	2000	1823	8	91
	5000	4051	21	81
AcRb DTPH L-1.2-pIII	1000	1006	24	101
	2000	2036	7	102
	5000	3969	13	79

⁽¹⁾ Los datos de recuperación corresponden a la media obtenida a partir de 4 réplicas realizadas en días consecutivos.

Tabla 3.18. Análisis comparativo de tetraconazol en muestras fortificadas de zumo de naranja mediante inmunoensayos basados en distintos tipos de anticuerpos.

Zumo de naranja				
Anticuerpo	Tetraconazol añadido (ng/ml)	Tetraconazol recuperado⁽¹⁾ (ng/ml)	C.V. (%)	Recuperación (%)
AcMo DTPH 4.1	1000	1210	14	121
	2000	1876	3	94
	5000	4987	8	100
AcRb DTPH H-4.1	1000	1316	10	132
	2000	2326	7	116
	5000	5323	19	107
AcRb DTPH H-4.1-pIII	1000	1449	15	145
	2000	2647	8	132
	5000	6390	6	128
AcRb DTPH L-1.2	1000	1178	7	118
	2000	2519	12	126
	5000	5190	10	104
AcRb DTPH L-1.2-pIII	1000	1300	12	130
	2000	2724	8	136
	5000	5274	3	106

⁽¹⁾ Los datos de recuperación corresponden a la media obtenida a partir de 4 réplicas realizadas en días consecutivos.

7.2. Determinación de hexaconazol en zumos de fruta.

Los zumos de manzana y naranja se fortificaron con 200, 400, 800 y 1000 ng/ml de hexaconazol, a partir de un stock de 100 µg/ml en DMF. Al igual que en el caso anterior, la concentración de hexaconazol añadida a las muestras es del mismo orden de magnitud que los LMRs establecidos para dicho plaguicida en muestras agroalimentarias. Las muestras se diluyeron 200 veces en PBS antes de analizarlas mediante los ELISAs tanto del anticuerpo monoclonal como de los anticuerpos recombinantes. En este caso, la afinidad de los anticuerpos recombinantes es comparable a la del anticuerpo monoclonal, por lo que la dilución aplicada fue la misma en todos los casos. De este modo, la concentración de hexaconazol en ensayo, en la mayoría de las muestras, está dentro del rango de trabajo de cada inmunoensayo.

En las Tablas 3.19 y 3.20 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de hexaconazol en zumos de manzana y naranja, respectivamente. Como se puede observar, los porcentajes de recuperación en las muestras con concentraciones dentro del rango de trabajo son bastante aceptables, variando entre el 70 % y el 131 %. Sin embargo, la concentración de hexaconazol en ensayo de las muestras fortificadas a 200 ng/ml se halló por debajo del límite inferior del rango de trabajo de los inmunoensayos basados en anticuerpos recombinantes. Como consecuencia, los porcentajes de recuperación obtenidos para dichas muestras son bastante elevados (entre el 123 % y el 187 %).

Por otro lado, en lo que se refiere a la reproducibilidad del ensayo, los coeficientes de variación varían entre 4 % y 31 %, aunque la mayoría no supera el 20 %.

Finalmente, tampoco en este caso se observan diferencias significativas entre los resultados de los inmunoensayos basados en los distintos tipos de anticuerpo.

Tabla 3.19. Análisis comparativo de hexaconazol en muestras fortificadas de zumo de manzana mediante inmunoensayos basados en distintos tipos de anticuerpos.

Zumo de manzana				
Anticuerpo	Hexaconazol añadido (ng/ml)	Hexaconazol recuperado ⁽¹⁾ (ng/ml)	C.V. (%)	Recuperación (%)
AcMo HH 1.4	200	238	15	119
	400	296	14	74
	800	620	9	77
	1000	699	17	70
AcRb HH H-1.4	200	337	11	169
	400	429	14	107
	800	724	8	91
	1000	821	5	82
AcRb HH H-1.4-pIII	200	373	9	187
	400	474	6	118
	800	834	15	104
	1000	1013	20	101

⁽¹⁾ Los datos de recuperación corresponden a la media obtenida a partir de 4 réplicas realizadas en días consecutivos.

Tabla 3.20. Análisis comparativo de hexaconazol en muestras fortificadas de zumo de naranja mediante inmunoensayos basados en distintos tipos de anticuerpos.

Zumo de naranja				
Anticuerpo	Hexaconazol añadido (ng/ml)	Hexaconazol recuperado ⁽¹⁾ (ng/ml)	C.V. (%)	Recuperación (%)
AcMo HH 1.4	200	211	31	106
	400	428	19	107
	800	829	17	104
	1000	1060	19	106
AcRb HH H-1.4	200	247	17	123
	400	466	4	117
	800	802	12	100
	1000	1034	14	103
AcRb HH H-1.4-pIII	200	333	14	166
	400	526	9	131
	800	888	6	111
	1000	115	9	112

⁽¹⁾ Los datos de recuperación corresponden a la media obtenida a partir de 4 réplicas realizadas en días consecutivos.

7.3. Determinación de imazalil en zumos de fruta.

Los zumos de manzana y naranja se fortificaron con 1000, 2000 y 5000 ng/ml de imazalil, a partir de un stock de 100 µg/ml en DMF. Al igual que en los casos anteriores estas concentraciones de plaguicida son del mismo orden de magnitud de los LMRs establecidos para imazalil en muestras agroalimentarias. Cada muestra se diluyó 100 veces antes del análisis mediante los ELISAs basados en anticuerpos recombinantes, excepto la muestra de 5000 ng/ml que se diluyó 300 veces antes del ensayo con el AcRb IMH H-5.1-pIII. En el caso de los inmunoensayos basados en el anticuerpo monoclonal, las muestras se diluyeron 1000, 1000 y 2000 veces, respectivamente. En este caso, debido a las grandes diferencias entre la sensibilidad de cada inmunoensayo, resultó difícil realizar el análisis de las muestras con todos los tipos de anticuerpos. Así, después de aplicar las distintas diluciones, la concentración de imazalil en ensayo se encontraba, en la mayoría de los casos, dentro del rango de trabajo del AcMo IMH 5.1 y del AcRb IMH H-5.1-pIII. Sin embargo en algunas de las muestras, la concentración de imazalil en ensayo era menor que el límite de detección del AcRb IMH H-5.1.

Las Tablas 3.21 y 3.22 muestran los resultados de la determinación de imazalil en zumos de fruta mediante los inmunoensayos basados en los distintos tipos de anticuerpos. En primer lugar, se observa que los valores de recuperación varían entre el 79 % y el 156 %. Con respecto a la reproducibilidad de los ensayos, los coeficientes de variación están comprendidos entre el 7 % y el 44 %. Este valor tan elevado, podría deberse a que en ese caso la concentración de imazalil en ensayo se hallaba muy próxima al límite del rango de trabajo. Por último, en el caso de la determinación en zumo de naranja, se observa una ligera tendencia a la sobreestimación por parte de los anticuerpos recombinantes.

Tabla 3.21. Análisis comparativo de imazalil en muestras fortificadas de zumo de manzana mediante inmunoensayos basados en distintos tipos de anticuerpos.

Zumo de manzana				
Anticuerpo	Imazalil añadido (ng/ml)	Imazalil recuperado ⁽¹⁾ (ng/ml)	C.V. (%)	Recuperación (%)
AcMo IMH 5.1	1000	1360	44	136
	2000	2120	11	106
	5000	3950	18	79
AcRb IMH H-5.1	1000	- ⁽²⁾	-	-
	2000	-	-	-
	5000	7600	18	152
AcRb IMH H-5.1-pIII	1000	1110	44	111
	2000	2340	14	117
	5000	5950	17	119

⁽¹⁾ Los datos de recuperación corresponden a la media obtenida a partir de 4 réplicas realizadas en días consecutivos.

⁽²⁾ Determinaciones que no se pudieron llevar a cabo porque las concentraciones de imazalil en ensayo se encontraban fuera del rango de trabajo.

Tabla 3.22. Análisis comparativo de imazalil en muestras fortificadas de zumo de naranja mediante inmunoensayos basados en distintos tipos de anticuerpos.

Zumo de naranja				
Anticuerpo	Imazalil añadido (ng/ml)	Imazalil recuperado ⁽¹⁾ (ng/ml)	C.V. (%)	Recuperación (%)
AcMo IMH 5.1	1000	1350	23	135
	2000	2100	22	105
	5000	4200	18	84
AcRb IMH H-5.1	1000	- ⁽²⁾	-	-
	2000	-	-	-
	5000	7800	11	156
AcRb IMH H-5.1-pIII	1000	1250	17	125
	2000	3000	7	150
	5000	7500	17	150

⁽¹⁾ Los datos de recuperación corresponden a la media obtenida a partir de 4 réplicas realizadas en días consecutivos.

⁽²⁾ Determinaciones que no se pudieron llevar a cabo porque las concentraciones de imazalil en ensayo se encontraban fuera del rango de trabajo.

7.4. Recapitulación

En vista de los resultados obtenidos parece razonable asumir que, en general, tanto los anticuerpos monoclonales como los recombinantes pueden emplearse para la determinación del correspondiente fungicida en muestras de zumos, teniendo en cuenta los diferentes rangos de trabajo de cada uno de los anticuerpos. Además, no se han observado diferencias significativas entre las determinaciones realizadas con los distintos tipos de anticuerpos (linfocitos e hibridomas) ni entre los dos tipos de proteínas expresadas (scFv y scFv-pIII).

Tal y como se ha comentado en la introducción, se han publicado pocos artículos en los que se presenten resultados de determinación de plaguicidas en muestras reales mediante inmunoensayos basados en anticuerpos recombinantes. Algunos autores como Yuan *et al.* (1997), Yau *et al.* (1998) y Yang *et al.* (2006) realizaron curvas estándar de los analitos en matrices reales de extractos de maíz, de agua y suelo, y de leche, respectivamente, pero no presentaron datos de recuperación en dichas matrices. Por otro lado, Nishi *et al.* (2005) describieron la determinación de simetryn en muestras fortificadas de agua y suelo, mediante inmunoensayos basados en anticuerpos recombinantes, obteniendo buenos resultados de recuperación (90-110 %). Del mismo modo, Li *et al.* (2006) aplicaron los inmunoensayos de anticuerpos recombinantes a la determinación de metamidophos en muestras de agua, extractos de arroz y de col, obteniendo recuperaciones aceptables (entre 78 y 107 %). Por su parte, Garret *et al.* (1997) analizaron el contenido de paration en muestras fortificadas obteniendo porcentajes de recuperación por debajo del 80 % en la mayoría de los ensayos. En este caso, los porcentajes de recuperación fueron bajos en las determinaciones llevadas a cabo tanto con anticuerpos recombinantes como con anticuerpos monoclonales, por lo que se atribuyó esta baja recuperación a las condiciones del ensayo y no a las propiedades intrínsecas de los anticuerpos empleados.

Por tanto, los resultados obtenidos en este trabajo, así como los publicados por los autores citados anteriormente, indican que los inmunoensayos realizados con anticuerpos recombinantes permiten determinaciones, en muestras reales o fortificadas, tan satisfactorias como los inmunoensayos desarrollados con los anticuerpos monoclonales de los que provienen.

Así pues, aunque el proceso de obtención AcRbs frente a moléculas pequeñas sigue presentando ciertas dificultades prácticas, una vez obtenido un

AcRb con unas propiedades analíticas determinadas, éste puede emplearse en la determinación de dichas moléculas en muestras reales. Por tanto, teniendo en cuenta su aplicabilidad, así como otras ventajas adicionales ya mencionadas, como son su bajo coste de producción y el fácil acceso al material genético, los AcRbs podrían convertirse en un futuro en herramientas inmunoanalíticas de gran utilidad para la determinación de moléculas de interés agroalimentario.

IV. CONCLUSIONES

- Se ha establecido un protocolo para la obtención de anticuerpos recombinantes a partir de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales. Así, se han obtenido anticuerpos recombinantes frente a tetraconazol, hexaconazol e imazalil.
- Por el contrario, no se ha logrado estandarizar un protocolo de obtención de anticuerpos recombinantes de elevada afinidad a partir del material genético de animales inmunizados frente a los fungicidas azólicos. Así, se han obtenido bibliotecas a partir de ratones inmunizados frente a cada uno de los plaguicidas. Sin embargo, sólo se ha obtenido un anticuerpo recombinante comparable, en términos analíticos, al derivado de hibridomas, a partir de la biblioteca de tetraconazol. Por su parte, el anticuerpo obtenido a partir de la biblioteca de hexaconazol no presentó las propiedades deseadas, y a partir de la biblioteca de imazalil no se ha conseguido obtener ningún anticuerpo capaz de reconocer al analito o al hapteno conjugado.
- Se ha establecido un procedimiento de cribado y selección de anticuerpos recombinantes, frente a moléculas de bajo peso molecular, basado en el ELISA de fracción soluble. La realización simultánea de ELISAs no competitivos y competitivos permite la selección de colonias bacterianas que expresan anticuerpos recombinantes capaces de reconocer al hapteno conjugado y al analito, respectivamente.
- Se han optimizado las condiciones del *panning* basado en la tecnología de *phage display* para seleccionar anticuerpos recombinantes a partir de bibliotecas derivadas de linfocitos. En bibliotecas controladas, las condiciones establecidas han mostrado una eficiencia elevada. Esto parece indicar que la ausencia de AcRbs de elevada afinidad, procedentes de las bibliotecas de hexaconazol e imazalil, está relacionada con la calidad inicial de la biblioteca y no con la eficiencia del proceso de enriquecimiento aplicado.
- Se han comparado las secuencias aminoacídicas de los anticuerpos recombinantes de tetraconazol obtenidos a partir del material genético de hibridomas y de linfocitos. Se ha observado que anticuerpos con diferencias significativas en su estructura primaria pueden presentar parámetros analíticos similares.

- Los anticuerpos recombinantes obtenidos se han expresado en forma de proteína libre (scFv) y como proteína de fusión (scFv-pIII). No se puede establecer un criterio claro para determinar el efecto de la presencia de la proteína troncada pIII unida al fragmento recombinante scFv. En algunos casos, ésta parece no influir en el comportamiento analítico del anticuerpo, mientras que en otros parece favorecer la afinidad aparente del anticuerpo hacia el analito
- Todos los anticuerpos recombinantes producidos presentan una afinidad hacia el analito libre menor o comparable a la del anticuerpo monoclonal obtenido frente al mismo analito. Este fenómeno puede ser atribuible a propiedades intrínsecas de cada tipo de anticuerpo relacionadas, principalmente, con la estructura primaria y terciaria de los sitios de unión al antígeno.
- Se han desarrollado inmunoensayos, basados tanto en anticuerpos monoclonales como en anticuerpos recombinantes, para la determinación de tetraconazol, hexaconazol e imazalil.
- Los ELISAs de imazalil y hexaconazol son altamente específicos. Por su parte, los anticuerpos de tetraconazol reconocen algunos compuestos relacionados estructuralmente con el analito. El patrón de reconocimiento es independiente tanto del tipo de anticuerpo (monoclonal o recombinante) como del modo de expresión de la proteína (scFv o scFv-pIII).
- Todos los inmunoensayos desarrollados han permitido la determinación directa del correspondiente plaguicida en zumos de fruta, de manera rápida y sencilla, y con una precisión y exactitud aceptables.

V. BIBLIOGRAFÍA

- Aherne, G. W. Immunochemical Analysis of Water Micropollution. *Sci. Total Environ.* **1993**, 135, 78-80.
- Alcocer, M. J. C.; Doyen C., Lee, H. A.; Morgan. M. R. A. Properties of Polyclonal, Monoclonal and Recombinant Antibodies Recognizing the Organophosphorus Pesticide Chlorpyrifos-Ethyl. *J. Agric. Food. Chem.* **2000**, 48, 4053-4059.
- Avrameas, S.; Uriel, J.; Méthode de Marquage d'Antigènes et d'Anticorps avec des Enzymes et son Application en Immuno-Diffusion. *C. R. Acad. Sci. Paris* **1966**, 262, 2543.
- Azzazy, H. M. E.; Highsmith Jr, W. E. Phage Display Technology: Clinical Applications and Recent Innovations. *Clinical Biochemistry* **2002**, 35, 425-445.
- Benhar, I. Biotechnological Applications of Phage and Cell Display. *Biotechnology Advances* **2001**, 19, 1-33.
- Bicchi, C.; Cordero, C.; Rubiolo, P.; Occelli, A. Simultaneous Determination of Six Triazolic Pesticide Residues in Apple and Pear Pulps by Liquid Chromatography with Ultraviolet Diode Array Detection. *Journal of AOAC International* **2001**, 84, 1543-1550.
- Bird, R. E.; Hardman, K. D.; Jacobson, J. W.; Johnson, S.; Kauffman, B. M.; Lee, S-M.; Lee, T.; Pope, S. P.; Riordan, G. S.; Whitlow, M. Single Chain Antigen Binding Proteins. *Science* **1955**, 242, 423-426.
- Brichta, J.; Hnilova, M.; Viskovic, T. Generation of Hapten-Specific Recombinant Antibodies: Antibody Phage Display Technology: a Review. *Vet. Med.* **2005**, 50, 231-252.
- Burton, D. R. Antibody Libraries. En *Phage Display. A Laboratory Manual*; Barbas, C. F.; Burton, D. R.; Scott, J. K.; Silverman, G. J.; Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Presss. New York, USA. **2001**, 3.1-3.18.

- Burton, D.R.; Barbas, C. F.; Persson, M.; Koeing, S.; Chanock, R.; Lerner, R.A. A Large Array of Human Monoclonal Antibodies to Type 1 Human Immunodeficiency Virus from Combinatorial Libraries of Asymptomatic Seropositive Individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, 88, 10134-10137.
- Cairolì, F.; Arnoldi, A.; Pagani, S. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Quantitation of the Fungicide Tetraconazole in Fruits and Fruit Juices. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 3849-3854.
- Charlton, K.; Harris, W. J.; Porter, A. J. The Isolation of Super-sensitive Anti-hapten Antibodies from Combinatorial Antibody Libraries Derived from Sheep. *Biosensors and Bioelectronics* **2001**, 16, 639-646.
- Chen, T.; Dwyre-Gygax, C.; Hadfield, S.; Willetts, C.; Breuil, C. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for a Broad Spectrum Triazole Fungicide: Hexaconazole. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 1352-1356.
- Chiu, Y.W.; Chen, R.; Li, Q.X.; Karu, A.E. Derivation and Properties of Recombinant Fab Antibodies to Coplanar Polychlorinated Biphenyls. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 2614-2624.
- Choi, G-H.; Lee, D-H.; Min, W-K.; Cho, Y-J.; Kweon, D-H.; Son, D-H.; Park, K.; Seo, J-H. Cloning, Expression, and Characterization of Single-Chain Variable Fragment Antibody against Mycotoxin Deoxynivalenol in Recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* **2004**, 35, 84-92.
- Clackson, T.; Hoogenboom, H. R.; Griffiths, A. D.; Winter, G. Making Antibody Fragments Using Phage Display Libraries. *Nature* **1991**, 352, 624-628.
- Cwirla, S. E.; Peters, E. A.; Barret, R. W.; Dower, W. J.; Peptides on Phage: A Vast Library of Peptides for Identifying Ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1990**, 87, 6378-6382.

- Daly, S. J.; Dillon, P. P.; Brennan, J.; Dunne, L.; Fitzpatrick, J.; O'Kennedy, R. Production and Analytical Applications of scFv Antibody Fragments. *Anal. Let.* **2001**, *34*, 1799-1827.
- Danks, C.; Chaudhry, M.Q.; Parker, L.; Baker, J.N. Development and Validation of an Immunoassay for the Determination of Tebuconazole Residues in Cereal Crops. *Food Agric. Immunol.* **2001**, *13*, 151-159.
- De Liñán, C. Vademecum de Productos Fitosanitarios y Nutricionales. Ed Agrotécnicas S.L. **2000**, 168.
- Engvall, E.; Perlmann, P. Enzyme-Linked Labelled Immunosorbent, Assay (ELISA). III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme Labelled Antiimmunoglobulin in Antigen-Coated Tubes. *J. Immunol. Meth.* **1971**, *10*, 161-170.
- EPA. Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential. Science Information Management Branch. Health Effects Division. Office of Pesticide Programs. U.S. Environmental Protection Agency, **2002**. Disponible en: <http://www.epi.uci.edu/valleycenter/EPAListCarcinogenicChemicals.pdf>
- EPA. Pesticide Fact Sheet: Tetraconazol. United States Environmental Protection Agency, **2005a**. Disponible en: <http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/tetraconazole.pdf>
- EPA. R.E.D Facts: Imazalil. United States Environmental Protection Agency, **2005b**. Disponible en: <http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDS/factsheets/2325fact.pdf>
- Erhard, M. H.; Jungling, A.; Brendgen, S.; Kellner, J. Y.; Losch, U. Development of a Direct and Indirect Chemiluminiscence Immunoassay for the Detection of an Organophosphorus Compound. *J. Immunoassay* **1992**, *13*, 273-287.
- EU Pesticide Database. Pesticide EU-MRLs. Disponible en: http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm

- FAO *Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Estudio FAO: Producción y protección vegetal N° 173. Roma, Italia, **2002**.
- Fernández, M.; Rodríguez, R.; Picó, Y; Mañes, J. Liquid Chromatographic-Mass Spectrometric Determination of Post-Harvest Fungicides in Citrus Fruits. *J. Chromatogr. A* **2001**, 912, 301-310.
- Ferrer A. Intoxicación por Plaguicidas. *Anales Sis. San. Navarra*. **2003** [periódico en la Internet]. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272003000200009&lng=es&nrm=iso.
- Finlay, W. J. J.; Shaw, I.; Reilly, J. P.; Kane, M. Generation of High-Affinity Chicken Single-Chain Fv Antibody Fragments for Measurement of the *Pseudonitzschia pungens* Toxin Domoic Acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, 72, 3343-3349.
- Forlani, F.; Arnoldi, A.; Pagani, S. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Triazole Fungicides. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 328-331.
- Fortún, J. Antifúngicos: Azoles, Imidazoles, Triazoles. *Medicine* **1998**, 7, 4231-4241.
- Gabaldon, J. A.; Maquieira, A.; Puchades, R. Current Trends in Immunoassay-Based Kits for Pesticide Analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **1999**, 39, 519-538.
- Garret, S. D.; Appleford, D. J. A.; Wyatt, G. M.; Lee, H. A.; Morgan M. R. A. Production of a Recombinant Anti-Paration Antibody (scFv): Stability in Methanolic Food Extracts and Comparison to an Anti-Paration Monoclonal Antibody. *J. Agric. Food. Chem.* **1997**, 45, 4183-4189.
- Garrido, J.; de Alba, M.; Jiménez, I.; Casado, E.; Folgueiras, M. L. Chromatographic Analysis of Imazalil and Carbendazim in Fruits. Method Validation and Residue Monitoring Program 1995. *J. Chromatogr. A* **1997**, 765, 91-97.

- Gavilondo, J. V.; Larrick, J. W. Antibody Engineering at the Millennium. *Biotechniques* **2000**, 29, 128-145.
- Ge, L.; Knappik, A.; Pack, P.; Freund, C.; Plückthun, A. Expressing Antibodies in *Escherichia coli*. En *Antibody Engineering*, 2ªed. C.A.K. Borrebaek; Eds.; Oxford University Press, Oxford, **1995**, 229.
- Gerdes, M.; Meusel, M.; Spener, F. Influence of Antibody Valency in a Displacement Immunoassay for the Quantitation of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. *J. Immunol. Meth.* **1999**, 223, 217-226.
- Graham, B. M.; Porter, A. J.; Harris, W. J. Cloning, Expression and Characterization of a Single-Chain Antibody Fragment to the Herbicide Paraquat. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1995**, 63, 279-289.
- Grant, S. D.; Porter, A.J.; Harris, W. J. Comparative Sensitivity of Immunoassays for Haptens Using Monomeric and Dimeric Antibody Fragments. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 340-345.
- Haarpanta, T.; Huse, W. D.; A Combinatorial Method for Constructing Libraries of Long Peptides Displayed by Filamentous Phage. *Mol. Divers.* **1995**, 1, 39-52.
- Hammock, B. D.; Gee, S. J. Impact of Emerging Technologies on Immunochemical Methods for Environmental Analysis. En *Immunoanalysis of Agrochemicals*; ACS Symposium Series 586; Nelson, J. O.; Karu, A. E.; Wong, R. B. American Chemical Society: Washington, DC, **1995**.
- Harrison, R. O.; Goodrow, M. H.; Hammock, B. D. Competitive Inhibition ELISA for the s-Triazine Herbicides-Assay Optimization and Antibody Characterization. *J. Agric. Food. Chem.* **1991**, 39, 122-128.
- Hoogenboom, H. R.; de Bruïne A. P.; Hufton, S. E.; Hoet, R. M.; Arends, J-W. Roovers, R. C. Antibody Phage Display Technology and its Applications. *Immunotechnology* **1998**, 4, 1-20.
- Hoogenboom, H. R. Selecting and Screening Recombinant Antibody Libraries. *Nature Biotechnology* **2005**, 23, 1105-1116.

- Huston, J. S.; Levinson, D.; Mudgett-Hunter, M.; Tai, M. S.; Novotný, J.; Margolies, M. N.; Ridge, R. J.; Bruccoleri, R. E.; Haber, E.; Crea, R.; et al. Protein Engineering of Antibody Binding Sites: Recovery of Specific Activity in an Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1988**, 85, 5879-83.
- Ito, Y.; Ikai, Y.; Oka, H.; Hayakawa, J.; Kagami, T. Application of Ion-Exchange Cartridge Clean-Up in Food Analysis I. Simultaneous Determination of Thiabendazole and Imazalil in Citrus Fruit and Banana Using High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *J. Chromatogr. A* **1998**, 810, 81-87.
- Kabat, E. A.; Wu, T. T.; Reid-Miller, M.; Perry, M.; Gottesman, K S.; Foeller, C. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a ed. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington, **1991**.
- Karu, A. E.; Scholthof, K-B. G.; Zhang, G.; Bell, C.W. Recombinant Antibodies to Small Analytes and Prospects for Deriving Them from Synthetic Combinatorial Libraries. *Food & Agric. Immunol.* **1994**, 6, 277-286.
- Kaur, J.; Boro, R. C.; Wangoo, N.; Singh, K. R.; Suri, C. R. Direct Hapten Coated Immunoassay Format for the Detection of Atrazine and 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Herbicides. *Anal. Chem. Acta* **2008**, 607, 92-99.
- Kay, B. K.; Adey, N. B.; He, Y-S.; Manfredi, J. P.; Matargnon, A. H.; Fowlkes, D. M. An M13 Phage Library Displaying Random 38-Amino-acid Peptides as a Source of Novel Sequences with Affinity to Select Targets. *Gene* **1993**, 128, 59-65.
- Kettleborough, C.A.; Ansell, K. H.; Allen, R. W.; Rosell-Vives, E.; Güssow, D. H.; Bending, M. M. Optimization of Primers for Cloning Libraries of Mouse Immunoglobulins Genes Using the Polymerase Chain Reaction. *Eur. J. Immunol.* **1993**, 23, 206-211.

- Kimura, N.; Nagayama, T.; Takano, I.; Kobayashi, M.; Tamura, Y.; Tateishi, Y.; Kitayama, K.; Saita, K. Analysis of Imazalil and its Major Metabolite in Citrus Fruits by GC-FTD. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* **2003**, 44, 63-68.
- Kipriyanov, S. M.; Dubel, S.; Breitling, F.; Kontermann, R. E.; Little, M. Recombinant Single-Chain Fv Fragments Carrying C-terminal Cysteine Residues: Production of Bivalent and Biotnylated Mini-antibodies *Mol. Immunol.* **1994**, 31, 1047-1058.
- Kipriyanov, S.M.; Moldenhauer, G.; Little, M. High Level, Production of Soluble Single Chain Antibodies in Small-scale *Escherichia coli* Cultures. *J. Immunol. Meth.* **1997**, 200, 69-77.
- Knappik, A.; Plückthun, A. Engineered Turns of a Recombinant Antibody Improve its *In Vivo* Folding. *Protein Engineering* **1995**, 8, 81-89.
- Köhler, G.; Milstein, C.; Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* **1975**, 256, 495-497.
- Kramer, K.; Hock, B. Recombinant Single-Chain Antibodies against s-Triazines. *Food & Agric. Immunol.* **1996**, 8, 97-109.
- Kramer, K.; Hock, B. Recombinant Antibodies for Environmental Analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 377, 417-426.
- Kramer, K. Synthesis of a Group-selective Antibody Library against Haptens. *J. Immunol. Meth.* **2002**, 266, 209-220.
- Krebber, A.; Bornhauser, S.; Burmester, J.; Honegger, A.; Willuda, J.; Bosshard, H.R.; Plückthun, A. Reliable Cloning of Functional Antibody Variable Domains from Hybridomas and Spleen Cell Repertoire Employing a Reengineered Phage Display System. *J. Immunol. Meth.* **1997**, 201, 35-55.
- Lafuente, M. T.; Tadeo, J. L. Residue Analysis of Post-Harvest Imidazole Fungicides in Citrus Fruit by HPLC and GLC. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1985**, 22, 99-108.

- Langone, J.J.; Van Vunakis, H. Radioimmunoassay for Dieldrin and Aldrin. *Res. Comm. Chem. Path. Pharm.* **1975**, 10, 163-171.
- Langone, J.J.; Van Vunakis, H. Radioimmunoassay of Nicotine, Cotinine, and γ -(3-Piridyl)- γ -oxo-N-Methylbutyramida. *Meth. Enzym.* **1981**, 84, 628-640.
- Lee, H. A.; Wyatt, G.; Garret, S. D.; Yanguela, M. C.; Morgan, M. R. A. Recombinant Antibodies against Hapten Mycotoxins. *Immunoanalysis Agrochemicals: Emerging Technologies*; American Chemical Society; Washington D.C. 1995,22-30.
- Lee, N.; Holtzapple, C. K.; Stanker, L. H. Cloning, Expression, and Characterization of Recombinant Fab Antibodies against Dioxin *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 3381–3388.
- Lee, Y.; Jeong, Y.; Kang, H. J.; Chung, S. J.; Chuung, B. H. Cascade Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (CELISA). *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, 25, 332-337.
- Leong, S. S. J.; Chen, W. N. Preparing Recombinant Single Chain Antibodies. *Chemical Engineering Science* **2008**, 63, 1401-1414.
- Li, T.; Zhang, Q.; Liu, Y.; Chen, D.; Hu, B.; Blake, D. A.; Liu, F. Production of Recombinant scFv Antibodies against Metamidophos from a Phage-Display Library of a Hyperimmunized Mouse. *J. Agric. Food. Chem.* **2006**, 54, 9085-9091.
- Li, Y.; Cockburn, W.; Kilpatrick, J. B.; Whitlam, G. C. High Affinity scFvs from a Single Rabbit Immunized with Multiple Haptens. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2000**, 268, 398-404.
- Longstaff, M.; Newell, C. A.; Boonstra, B.; Strachan, G.; Learmonth, D.; Harris, W. J.; Porter, A.J.; Hamilton, W. D. Expression and Characterisation of Single-Chain Antibody Fragments Produced in Transgenic Plants Against the Organic Herbicides Atrazine and Paraquat. *Biochimica et Biophysica Acta* **1998**, 1381, 147-160.

- López, M. L.; Riba, M. Residue Levels of Ethoxyquin, Imazalil, and Iprodione in Pears under Cold-Storage Conditions. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3228-3236.
- Lukens, H. R.; Williams, C. B.; Levinson, S. A.; Dendliker, W. B.; Murayama, D.; Barn, R. L. Fluorescence Immunoassay Technique for Detecting Organic Environmental Contaminants. *Environ. Sci. Technol.* **1977**, *11*, 292-297.
- Manclús, J. J.; Abad, A.; Lebedev, F. M.; Mojarrad, F.; Micková, B.; Mercader, J. V.; Primo, J.; Miranda, M. A.; Montoya, A. Development of a Monoclonal Immunoassay Selective for Chlorinated Cyclodiene Insecticides. *J. Agric. Food Chem* **2004**, *52*, 2776-2784.
- Manclús, J. J.; Moreno, M. J.; Plana, E.; Montoya, A.; Development of Monoclonal Immunoassays for the Determination of Triazole Fungicides in Fruit Juices. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 8790-8800.
- Manclús, J. J.; Primo, J.; Montoya, A. Development of a Chlorpyrifos Immunoassay Using Antibodies Obtained from a Simple Hapten Design. *J. Agric. Food. Chem.* **1994**, *42*, 1257-1260.
- MARM. *Informe Sobre el Nuevo Reglamento de Comercialización de los Productos Fitosanitarios*. Ministerio del Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. España, **2009c**. Disponible en:
<http://www.mapa.es/agricultura/pags/fitos/registro/fichas/pdf/ImpactoNormativa.pdf>
- MARM. *Productos fitosanitarios*. Ministerio del Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. España **2009a**. Disponible en:
<http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/fitos/fitos.asp>
- MARM. *Sustancias Activas de Productos Fitosanitarios Aceptadas, Excluidas y en Revisión Comunitaria*. Ministerio del Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. España **2009b**. Disponible en:
http://www.mapa.es/agricultura/pags/fitos/registro/fichas/pdf/Lista_sa.pdf

- Matsumoto, H. Simultaneous Determination of Imazalil and its Major Metabolite in Citrus Fruit by Solid-Phase Extraction and Capillary Gas Chromatography with Electron Capture Detection. *J. of AOAC International* **2001**, 84, 546-550.
- McLafferty, M. A.; Kent, R. B.; Ladner, R. C.; Markland, W. M13 Bacteriophage Displaying Disulfide-Constrained Microproteins. *Gene* **1993**, 128, 29-36.
- Moreno, M. J.; Plana, E.; Montoya, A.; Caputo, P.; Manclús, J. J. Application of a Monoclonal-Based Immunoassay for the Determination of Imazalil in Fruit Juices. *Food Additives and Contaminants* **2007**, 24, 704-712.
- Morozova, V. S.; Levahova, A. I.; Eremin, S. A. Determination of Pesticides by Enzyme Immunoassay. *J. Anal. Chem.* **2005**, 60, 230-246.
- Nakane, P. K.; Pierce, G.B. Enzyme-Labelled Antibodies. Preparation and Application for the Localization of Antigens. *J. Histochem.* **1966**, 14, 929.
- Navarro-Teulon, I.; Peraldi-Roux, S.; Bernardi, T.; Marin, M.; Piechaczyk, M.; Shire, D.; Pau, B.; Biard- Piechaczyk, M. Expression in *Escherichia coli* of Soluble and M13 Phage-Display Forms of a Single-Chain Antibody Fragment Specific for Digoxin: Assessment in a Novel Drug Immunoassay. *Immunotechnology* **1995**, 1, 41-52.
- Nishi, K.; Ishiuchi, M.; Morimune, K.; Ohkawa, H. Molecular and Immunochemical Characteristics of Monoclonal and Recombinant Antibodies Selective for Triazine Herbicide Symetryn and Application to Environmental Analysis. *J. Agric. Food. Chem.* **2005**, 53, 5096-5104.
- Nozal, M. J.; Bernal, J. L.; Jiménez, J. J.; Martín, M. T.; Bernal, J. Determination of Azolic Fungicides in Wine by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1076, 90-96.

- Ørum, H.; Andersen, P. S.; Øster, A.; Johansen, L. K.; Riise, E.; Bjørnvard, M.; Svendsen, I.; Engberg, J. Efficient Method for Constructing Comprehensive Murine Fab Antibody Libraries Displayed on Phage: *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 4491-4498.
- Pan, K.; Wang, H.; Zhang, H.; Lui, H.; Lei, H.; Huang, L.; Sun, Y. Production and Characterization of Single Chain Fv Directed against β_2 -Agonist Clenbuterol. *J. Agric. Food. Chem.* **2006**, 54, 6654-6659.
- Paschke, M. Phage Display Systems and their Applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2006**, 70, 2-11.
- Paulus, W. Azoles. In *Directory of Microbicides for the Protection of Materials*. Springer Netherlands **2004**, 650-656.
- Petrenko, V. A.; Smith, G. P.; Gong, X.; Quinn, T. A Library of Organic Landscapes on Filamentous Phage. *Protein Eng.* **1996**, 797-801.
- Queffelec, A-L.; Boisdé, F.; Larue, J.P.; Haelters, J. P.; Corbel, B.; Thouvenot, D.; Nodet, P. Development of an Immunoassay (ELISA) for the Quantification of Thiram in Lettuce, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 1675-1680.
- Raab, G. M. Comparison of a Logistic and a Mass-Action Curve for Radioimmunoassay Data. *Clin. Chem.* **1983**, 29, 1757-1761.
- Rajkowski, K. M.; Cittanova, N.; Desfosses, B.; Jayle, M. F. The Conjugation of Testosterone with Horseradish Peroxidase and a Sensitive Enzyme Assay for the conjugate. *Steroids* **1977**, 29, 701-713.
- Sambrook, J.; Russell, D. W. *Molecular Cloning*. CHSL Press.N.Y.; U.S.A. **2001**.
- Sannino, A.; Bolzoni, L.; Bandini, M. Application of Liquid Chromatography with Electrospray Tandem Mass Spectrometry to the Determination of a New Generation of Pesticides In Processed Fruits and Vegetables. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1036, 161-169.
- Santos, F. J.; Galceran, M. T. The Application of Gas Chromatography to Environmental Analysis. *Trends in Anal. Chem.* **2002**, 21, 672-685.

- Schermerhorn, P. G.; Golden, P. E.; Krynitsky, A. J.; Leimkuehler, W. M. Determination of 22 Triazole Compounds Including Parent Fungicides and Metabolites in Apples, Peaches, Flour, and Water by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International* **2005**, 88, 1491-1502.
- Scholthof, K-B. G.; Zhang, G.; Karu A. E. Derivation and Properties of Recombinant Fab Antibodies to the Phenilurea Herbicide Diuron. *J. Agric. Food. Chem.* **1997**, 45, 1509-1517.
- Schwalbe, M.; Dorn, E.; Beyermann, K. Enzyme Immunoassay and Fluoroimmunoassay for the Herbicide Diclofop-Methyl. *J. Agric. Food. Chem.* **1984**, 32, 734-741.
- Scott, J. K.; Smith, G. P. Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library. *Science* **1990**, 249, 386-390.
- Seidel, M; Niessner, R. Automated Analytical Microarrays: A Critical Review. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, 1521-1544.
- Sheedy, C.; MacKenzie, C. R.; Hall, J. C. Isolation and Affinity Maturation of Hapten-specific Antibodies. *Biotechnology Advances* **2007**, 25, 333-352.
- Sidhu, E. S.; Fellohouse, F. A. Synthetic Therapeutic Antibodies. *Nature Chemical Biology* **2006**, 2, 682-689.
- Skerra, A.; Plückthun, A. Assembly of Functional Immunoglobulin Fv Fragment in *Escherichia coli*. *Science* **1988**, 240, 1038-1041.
- Smith, G. P. Filamentous Fusion Phage: A Novel Expression Vectors that Display Cloned Antigens on the Virion surface. *Science* **1985**, 28, 1315-1317.
- Spinks, C. A. Broad-specificity Immunoassay of Low Molecular Weight Food Contaminants: New Paths to Utopia! *Trends Food Sci. Technol.* **2000**, 11, 210-217.

- Strachan, G.; Grant, S. D.; Learmonth, D.; Longstaff, M.; Porter, A. J.; Harris, W. J. Binding Characteristics of Anti-Atrazine Monoclonal Antibodies and their Fragments Synthesised in Bacteria and Plants. *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13*, 665-673.
- Strachan, G.; Williams, S.; Moyle S. P.; Harris, W.J.; Porter A. J.R. Reduced Toxicity of Expression, in *Escherichia coli*, of Anti Pollutant Antibody Fragments and their Use as Sensitive Diagnostic Molecules. *J. of applied Microbiol.* **1999**, *87*, 410-417.
- Suri, C. R.; Boro, R.; Nangia, Y.; Gandhi, S.; Sharma, P.; Wangoo, N.; Rajesh, K.; Shekhawat, G. S. Immunoanalytical Techniques for Analyzing Pesticides in the Environment. *Trends in Anal. Chem.* **2009**, *28*, 29-39.
- Székács, A.; Hammock, B. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of the Triazole Fungicide Myclobutanil. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2083-2091.
- Tijssen, P. In *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*; Burdon, R. H.; Knippenberg, P. H. Eds.; Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology vol. 15; Elsevier: Amsterdam, **1985**.
- Tomlin, C. *The Pesticide Manual : a World Compendium*. Tomlin, C. Ed.; The British Crop Protection Council: Farnham, Surry, U. K., 1997.
- Tonogai, Y.; Tsumura, Y.; Nakamura, Y.; Ito, Y. Analytical Results of Post-Harvest Pesticides in Citrus Fruits and Fruit Juices by GC-MS (SIM) and HPLC with Fluorescent Detector. *Eisei Shikenjo Hokoku* **1992**, *110*, 135-140.
- Tout, N.L.; Yau, K. Y. F.; Trevors, J. T.; Lee, H.; Hall, J. C. Synthesis of Ligand-Specific Phage-display scFv against the Herbicide Picloram by Direct Cloning from Hyperimmunized Mouse. *J. Agric. Food. Chem.* **2001**, *49*, 3628-3637.
- Trösken, E. R.; Bittner, N.; Völkel, W.; Quantitation of 13 Azole Fungicides in Wine Samples by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1083*, 113-119.

- Van Weemen, B. L.; Schuurs, A. H. W. M. Immunoassay Using Antigen Enzyme Conjugates. *FEBS Lett.* **1971**, 15, 232-236.
- Vaughan, T. J.; Williams, A. J.; Pritchard, K.; Osbourn, J. K.; Pope, A. R.; Earnshaw, J. C.; McCafferty, J.; Hodits, R. A.; Wilton, J.; Johnson, K. S. Human Antibodies with Sub-nanomolar Affinities Isolated from a Large Non-immunized Phage Display Library. *Nature Biotechnol.* **1996**, 14, 309.
- Vispo, N. S.; Puchades, Y. Bacteriófagos: de la Terapia con Fagos a la Biología Combinatoria. *Biotecnología Aplicada* **2001**, 18, 135-147.
- Viti, F.; Nilsson, F.; Demartis, S.; Huber, A.; Neri, D. Design and Use of Phage Libraries for the Selection of Antibodies and Enzymes. *Methods Enzymol.* **2000**, 326, 480-505.
- Ward, E. S.; Gussow, D.; Griffiths, A.D.; Jones, P. T.; Winter, G. Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted from *Escherichia coli*. *Nature* **1989**, 341, 544-546.
- Ward, V. K.; Schneider, P. G.; Kreissig, S. B.; Hammock, B. D.; Choudary, P. V.; Cloning, Sequencing and Expression of the Fab Fragment of a Monoclonal Antibody to the Herbicide Atrazine. *Protein Eng.* **1993**, 6, 981-988.
- Watanabe, E.; Watanabe, S.; Ito, S.; Hayashi, M, Watanabe, T.; Yuasa, Y.; Nakazawa, H. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Fungicide Imazalil in Citrus Fruit. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 5124-5130.
- Watanabe, E.; Yoshimura, Y.; Yuasa, Y.; Nakazawa, H. Immunoaffinity Column Clean-Up for the Determination of Imazalil in Citrus Fruit. *Analytica Chimica Acta* **2001**, 433, 199-206.
- Webb, S-R.; Lee, H.; Hall, J. C. Cloning and Expression in *Escherichia coli* of an Anti-Cyclohexanedione Single-Chain Variable Antibody Fragment and Comparison to de Parent Monoclonal Antibody. *J. Agric. Food. Chem.* **1997**, 45, 535-541.

- Webster, R. Filamentous Phage Biology. En *Phage Display. A Laboratory Manual*; Barbas, C. F.; Burton, D. R.; Scott, J. K.; Silverman, G. J.; Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA. **2001**, 1.1-1.37.
- Whitlow, M.; Filpula, D. Single-chain Fv Proteins and Their Fusion Proteins. *Methods A Companion to Methods Enzymol.* **1991**, 2, 97-105.
- Wie, S. I.; Hammock, B. D. Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Residue Analysis of Dibenzuron and BAY SIR 8514. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, 30, 949-957.
- Wie, S. I.; Hammock, B. D. Comparison of Coating and Immunizing Antigen Structure on the Sensitivity and Specificity of Immunoassays for Benzoylphenilurea Insecticides. *J. Agric. Food. Chem.* **1984**, 32, 1294-1301.
- Yallow, R. S.; Berson, S. A. Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods. *Nature* **1959**, 184, 1648-1649.
- Yamazaki, Y.; Ninomiya, T. Determination of Imazalil Residues in Lemons by gas Chromatography with Nitrogen-Posphorus Detection. *J. AOAC Int.* **1996**, 79, 787-790.
- Yang, Z-Y.; Shim, W-B.; Kin, M-G.; Lee, K-H.; Kim, K-S.; Kim, K-Y.; Kim, C-H.; Ha, S-D.; Chung, D-H. Production and Characterization of Monoclonal and Recombinant Antibodies against Antimicrobial Sulfamethazine. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 17, 571-578.
- Yau, K. Y. F.; Tout, N. L.; Trevors, J. T.; Lee, H.; Hall, J. C. Bacterial Expression and Characterization of a Picloram-Specific Recombinant Fab for Residue Analysis. *J. Agric. Food. Chem.* **1998**, 46, 4457-4463.
- Yoshioka, N.; Akiyama, Y.; Teranishi, K. Rapid Simultaneous Determination of *o*-Phenylphenol, Diphenil, Thiabendazole, Imazalil and its Major Metabolite in Citrus Fruits by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Using Atmospheric Pressure Photoionization. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1022, 145-150.

- Yuan, Q.; Clarke, J. R.; Zhoy, H-R.; Linz, J. E.; Pestka J. J.; Hart, L. P. Molecular Cloning Expression, and Characterization of a Functional Single-Chain Fv Antibody to the Mycotoxin Zearalenona. *Applied and Environmental Microbiology* **1997**, 63, 263-269.
- Zamora, T.; Pozo, O. J.; López, F. J.; Hernández, F. Determination of Tridemorph and Other Fungicide Residues in Fruit Samples by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *J. Chratogr.* **2004**, 1045, 137-143.
- Zhou, H.; Fisher, R. J.; Papas, T. S. Optimization of Primer Sequences for Mouse scFv Repertoire Display Library Construction. *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 888-889.

APÉNDICE I:

Publicaciones derivadas de la tesis

Los resultados obtenidos durante estos años han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Moreno, M. J.; Plana, E.; Montoya, A.; Caputo, P.; Manclús, J. J. Application of a Monoclonal-Based Immunoassay for the Determination of Imazalil in Fruit Juices. *Food Additives and Contaminants* **2007**, 24, 704-712.

Manclús, J. J.; Moreno, M. J.; Plana, E.; Montoya, A.; Development of Monoclonal Immunoassays for the Determination of Triazole Fungicides in Fruit Juices. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 8790-8800.

Moreno, M. J.; Plana, E.; Montoya, A.; Manclus, J. J. A comparative study of analytical properties of monoclonal and its recombinant derived antibodies against fungicides. *J. Agric. Food Chem.* En revisión.

Plana, E.; Moreno, M. J.; Montoya, A.; Manclús, J. J. Production and characterization of recombinant antibodies to the fungicide tetraconazole: Application to determination in juice samples. *J. Agric. Food Chem.* En revisión.

