

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Departamento de Química



**Desarrollo de inmunoensayos para antibióticos
en microplaca y en disco compacto aplicados a
la determinación multirresiduo de
contaminantes**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
Ester Gallego Iglesias

Dirigida por:
Ángel Maquieira Catalá
Rosa Puchades Pla

Valencia, Enero 2012



D. Ángel Maquieira Catalá, Catedrático de Universidad del Departamento de Química de la Universidad Politécnica de Valencia.

D^a. Rosa Puchades Pla, Catedrática de Universidad del Departamento de Química de la Universidad Politécnica de Valencia.

CERTIFICAN:

Que el trabajo que presenta Ester Gallego Iglesias en esta memoria, con el título **“Desarrollo de inmunoensayos para antibióticos en microplaca y en disco compacto aplicados a la determinación multirresiduo de contaminantes”** ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Química de la Universidad Politécnica de Valencia”.

Y para que así conste, a efectos de su presentación para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas, expedimos la presente que firmamos en Valencia, a 1 de Enero de 2012.

Dr. Ángel Maquieira Catalá

Dra. Rosa Puchades Pla

*A mi Yaya Mercedes y mi Tio Héctor,
siempre os echaré de menos*

AGRADECIMIENTOS

Esta aventura científica comenzó en Septiembre de 2003 y transcurrió en el Departamento de Química de la Universidad Politécnica hasta Abril de 2008. Mucha gente me ha acompañado a lo largo de este camino, y a todos les debo un millón de gracias.

A Ángel y Rosa, mis directores, por confiar en mí y por el implacable lápiz con el que me han ayudado a corregir esta historia. Al resto de la tribu que puebla el Departamento de Química y el IDM, por su compañía y apoyo. A todos los profesores, becarios y compañeros del primer piso, por el tiempo entre pipetas.

A los compañeros del Laboratorio 2.6, en especial a Elena y Andrea, por tanta ayuda y tantos buenos almuerzos.

A mis chicas del Laboratorio 1.6 y asociados: Marta, Eva, Dolors, Raquel, Carolina, M^a José, Vicky, Tania (y Tama, que siempre ha sido una más), mujeres extraordinarias que dejaron de ser mis compañeras para convertirse en grandes amigas. Nada de todo esto habría sido posible sin vuestro apoyo incondicional, vuestra capacidad para escucharme, vuestras historias y todas las veces en las que lloramos y reímos juntas. Espero que sigamos compartiendo grandes momentos.

A los miembros del Club de Aikido UPV, que abrieron los brazos para acogerme en su peculiar familia y me enseñaron a combinar amistad, filosofía y deporte. En especial, a Déborah, Juanjo, Juan y Mar, por vuestra infinita amistad y cariño fundamental.

Al grupo de Benimaclet, por la amistad entre cañas y tapas.

A mis quimiquitas: Carmen y Vanessa, con quienes aprendí a gatear en el mundo de la química y que, como fieles compañeras de la lucha, me han acompañado en todos los ámbitos de mi vida desde entonces. A Andrés, por los abrazos coordinados, los viajes, las comilonas y ese fino humor manchego con el que nos ilumina. A Juanjo, porque, por muchos años y proyectos que pasan, siempre recuperamos nuestra amistad donde la dejamos.

A Mónica y Raquel, grandes compañeras de trabajo y mejores amigas, por compartirlo todo (risas, penas, reuniones, kilómetros y almuerzos), y endulzar mi día a día.

A Eloisa, porque cuando yo nací ella ya estaba ahí, y lo ha seguido estando.

A mi Piña de Londres: Isa, Nuria, Esther y Vero, por 14 años de la amistad más sincera. Nunca sabréis cuánto bien me habéis hecho.

A mis italianos: Teo, Luca y Manu, por demostrar que mis mejores amigos pueden vivir a 1.500 kms de distancia.

A mi familia, ese gran clan que siempre me rodea, por todo el cariño y el amor recibido.

A mis padres, Mercedes y Vicente, a quienes debo todo. Gracias infinitas por vuestro amor sin condiciones, por ayudarme a ser como soy, por enseñarme a nadar contra la corriente, por apoyarme con todo y para todo.

A mi hermano Javier y mi nueva hermana Alexia, por compartir todo desde siempre y para siempre, por las ilusiones, las risas y el inmenso cariño.

A Pepe, por ser aire, luz, vida, y mi sol y estrellas.

RESÚMENES

RESUMEN

Los antibióticos son ampliamente utilizados en veterinaria, produciendo beneficios inmensos, pero también conllevan riesgos medioambientales debidos a la aparición de residuos “incontrolados” que pueden desencadenar resistencias bacterianas, reacciones alérgicas y otros inconvenientes importantes.

En esta tesis se han desarrollado varios sistemas inmunoquímicos para la determinación de residuos de distintos tipos de antibióticos, tanto mediante el formato tradicional en placa ELISA, como mediante el uso de *microarrays* utilizando CDs como plataformas analíticas.

En primer lugar, se han desarrollado inmunoensayos en **placa ELISA** para sulfonamidas y tetraciclinas. Se han puesto a punto dos inmunoensayos genéricos para la determinación de seis sulfonamidas, con elevada sensibilidad (IC_{50} entre 1,32 y 12,82 $ng\ mL^{-1}$) e inmunoensayos específicos para la determinación de SSZ y SMX con valores de IC_{50} de 0,51 y 0,16 $ng\ mL^{-1}$, respectivamente. Asimismo, se ha puesto a punto un inmunoensayo específico para la determinación de CTC, con un valor de IC_{50} de 36,40 $ng\ mL^{-1}$. Estos ELISAs se han aplicado con éxito a la cuantificación de residuos de sulfonamidas en alimentos (miel), aguas de depuradora y plasma humano.

En otro apartado se presentan los resultados de las investigaciones sobre el desarrollo de microinmunoensayos utilizando la tecnología de **discos compactos**. Este soporte presenta gran área analítica donde depositar miles de biomoléculas sonda y la posibilidad de integrar tanto información numérica como bioquímica (identificando cada punto de cada matriz y

almacenando los resultados del ensayo en la misma plataforma física en la que se desarrolla el análisis); por último, su fabricación a gran escala permite obtener productos de alta calidad a muy bajo precio. Además, los resultados analíticos son leídos y cuantificados por un lector comercial de CDs integrado en un ordenador personal convencional.

Se han desarrollado dos microinmunoensayos genéricos en CD para la determinación de cinco sulfonamidas, con valores de IC_{50} entre 0,22 y 1,98 $ng\ mL^{-1}$, así como microinmunoensayos específicos capaces de determinar SMX ($1,09\ ng\ mL^{-1}$ de IC_{50}) y CTC, ($6,33\ ng\ mL^{-1}$ de IC_{50}). Los microinmunoensayos se han aplicado con éxito a la cuantificación de residuos de sulfonamidas en muestras de alimentos (pescado) y medioambientales (agua de depuradora).

Se ha demostrado que el uso de discos de baja reflectividad (L-CD) y un lector de CDs es una metodología muy adecuada para la determinación de sustancias en formato de alta densidad, con un nivel de sensibilidad de nanogramos por litro, comparable a la obtenida sobre placa ELISA utilizando los mismos inmunorreactivos.

RESUM

Els antibiòtics són àmpliament emprats en veterinària, produint beneficis immensos, però també riscos mediambientals deguts a l'aparició de residus "incontrolats" que poden desencadenar resistències bacterianes, reaccions alèrgiques i altres inconvenients importants.

En aquesta tesi s'han posat a punt diversos sistemes immunoquímics per a la determinació de residus de diferents tipus d'antibiòtics, en concret sulfonamides i tetraciclins, tant mitjançant el format tradicional en placa ELISA com mitjançant l'ús de *microarrays* utilitzant CDs com plataformes analítiques.

En primer lloc, s'han desenvolupat immunoassajos en **placa ELISA** per a sulfonamides i tetraciclins. S'han desenvolupat dos immunoassajos genèrics per a la determinació de sis sulfonamides amb elevada sensibilitat (IC_{50} entre 1,32 y 12,82 ng mL⁻¹) i immunoassajos específics per a la determinació de SSZ i SMX amb valors d' IC_{50} de 0,51 i 0,16 ng mL⁻¹, respectivament. Tanmateix, s'ha posat a punt un immunoassaig específic per a la determinació de CTC, amb un valor d' IC_{50} de 36,40 ng mL⁻¹. Aquests ELISAs s'han aplicat amb èxit a la quantificació de residus de sulfonamides en aliments (mel), aigües de depuradora i plasma humà.

En altre apartat es presenten els resultats de les investigacions sobre el desenvolupament de microimmunoensayos emprant tecnologia de **discos compactes**. Aquest soport presenta una gran àrea analítica on depositar milers de biomolècules sonda i la possibilitat d'integrar tant informació numèrica com bioquímica (identificant cada punt de la matriu i emmagatzemant els resultats de l'assaig en la mateixa plataforma física en

la que es desenvolupa l'anàlisi); per últim, la seua fabricació a gran escala permet obtindre productes d'alta qualitat a molt baix preu. A més, els resultats analítics son llegits i quantificats mitjançant un lector comercial de CDs integrat en un ordinador personal convencional.

S'han desenvolupat dos micro-immunoassajos genèrics en CD per a la determinació de cinc sulfonamides, amb valors d'IC₅₀ entre 0,22 u 1,98 ng mL⁻¹, així com microimmunoensayos específics capaços de determinar SMX (1,09 ng mL⁻¹ d'IC₅₀) i CTC (6,33 ng mL⁻¹ d'IC₅₀). Els microimmunoensayos s'han aplicat amb èxit a la quantificació de residus de sulfonamides en mostres d'aliments (peix) i mediambientals (aigua de depuradora)

Per tant, s'ha demostrat que l'ús de discos de baixa reflectivitat (L-CD) i un lector de CDs és una metodologia molt adequada per a la determinació de substàncies en format d'alta densitat, amb un nivell de sensibilitat de nanograms per litre, comparable a l'obtinguda sobre placa ELISA utilitzant els mateixos immunorreactius.

ABSTRACT

Antibiotics are widely used in veterinary medicine, producing huge benefits, but also environmental risks due to the occurrence of “uncontrolled” residues that can trigger bacterial resistance, allergic reactions and other important inconvenients.

In this thesis several systems for determining immunochemical residues of different types of antibiotics have been developed, both through traditional ELISA plate format and through microarrays using CDs as analytical platforms.

First, **ELISA plate** immunoassays for sulfonamides and tetracyclines have been developed: two generic immunoassays for the determination of six sulfonamides with high sensitivity (IC_{50} values between 1.32 and 12.82 ng mL⁻¹) and specific immunoassays for the determination of SSZ and SMX with IC_{50} values of 0,51 and 0.16 ng mL⁻¹, respectively. It also has been developed a specific immunoassay for the determination of CTC, with IC_{50} value of 36.40 ng mL⁻¹. These ELISAs have been successfully applied to the quantification of sulfonamide residues in food (honey), sewage waters and human plasma.

Another section presents the results of research on the development of microinmunoensayos using the technology of **compact discs**. This platform has large analytical area to deposit thousands of probe biomolecules and the ability to integrate both numerically and biochemical information (identifying each point of each array and storing test results on the same physical platform in which the analysis is developed); moreover, its large scale manufacturing allows high quality products at low prices. In

addition, analytical results are read and quantified by a commercial CD player integrated into a conventional personal computer.

Two generic micro-CD immunoassays for the determination of five sulphonamides, with IC_{50} values between 0.22 and 1.98 $ng\ mL^{-1}$ as well as specific microinmunoensayos for SMX, able to determine a value of IC_{50} 1.09 $ng\ mL^{-1}$, and CTC, with an IC_{50} value of 6.33 $ng\ mL^{-1}$ have been developed. The microinmunoensayos have been successfully applied to the quantification of sulfonamide residues in food samples (fish) and environmental (sewage water).

Therefore, it has been demonstrated that the use of low reflectivity disks (L-CD) and a CD player is a very suitable methodology for the determination of substances in high density format, with a sensitivity level of nanograms per liter, comparable to that obtained on ELISA plate using the same immunoreactives.

ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
AP	Fosfatasa alcalina
BCIP/NBT	Bromocloroindolil fosfato / nitroblue tetrazolium
BIA	Bioinmunoensayo
BSA	Seroalbúmina bovina
CB	Tampón carbonato
CD	Compact disc
CDI	Carbonildiimidazol
CD-R	Disco compacto grabable
CD-RW	Disco compacto regrabable
CFI	Cloroformiato de isobutilo
CTC	Clortetraciclina
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DDD	Dosis diarias definidas
DHD	Dosis diarias definidas por habitante y día
DMSO	Dimetilsulfóxido
DVD	Disco versátil digital
EDC	<i>N</i> -etil- <i>N'</i> -(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
Eds.	Editores
EE.UU.	Estados Unidos de América
EIA	Enzimoimmunoensayo
ELISA	Enzimoimmunoanálisis en fase sólida
FIA	Fluoroimmunoensayo
GAR	Anticuerpos de cabra anti-conejo
GAR-AP	Anticuerpos de cabra anti-conejo marcados con AP
GAR-Gold	Anticuerpos de cabra anti-conejo marcados con oro
GAR-HRP	Anticuerpos de cabra anti-conejo marcados con HRP
GC/MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HAT	Hipoxantina-aminopterina-timidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HSA	Seroalbúmina humana
Ig	Inmunoglobulina
KLH	Hemocianina del molusco <i>Megathura crenulata</i>
LC	Límite de Cuantificación

L-CD	Disco compacto de baja reflectividad
LD	Límite de detección
LMR	Límite máximo de residuos
LOAC	Laboratorio en un chip
MAB	Anticuerpo monoclonal
MEM	Micro sistema electro mecánico
MS	Espectrometría de masas
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPD	o-fenilendiamina
OTC	Oxitetraciclina
OVA	Ovoalbúmina
pAb	Anticuerpo policlonal
PBS	Tampón fosfato salino
PBS-T	PBS conteniendo 0,05% de Tween 20
PC	Policarbonato
PEG	Polietilenglicol
p. ej.	Por ejemplo
pI	Punto isoeléctrico
PMMA	Polimetilacrilato de metilo
PPB	PBS conteniendo 0,02% de Tween 20 y 10% de glicerol
PS	N^1 -[4-metil-5-[2-(4-carboxietil-1-hidroxifenil)]-azo-2-piridil]sulfanilamida
PSTZ	N^4 -Ftalilsulfatiazol
RC	Reactividad cruzada
RD	Rango Dinámico
RIA	Radioinmunoensayo
SAM	Sulfacetamida
SAN	Sulfanilamida
SDM	Sulfadimetoxina
SDZ	Sulfadiazina
SG	Sulfaguanidina
SMP	Sulfametoxipiridazina
SMR	Sulfamerazina
SMT	Sulfametizol
SMX	Sulfametoxazol
SMZ	Sulfametazina o sulfadimidina
SOX	Sulfisoxazol
SP	Sulfapiridina

SPE	Extracción en fase sólida
STZ	Sulfatiazol
TBA	Tributilamina
TC	Tetraciclina
TLC	Cromatografía en capa fina
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbencidina
TS	N ¹ -[4-(carboximetil)-2-tiazolil]sulfanilamida
UE	Unión Europea
UV	Ultravioleta

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Los antimicrobianos	3
1.1 Sulfonamidas	5
1.1.1 Mecanismo de acción	7
1.2 Tetraciclinas	8
1.2.1 Mecanismo de acción	10
1.3 Uso de antimicrobianos en veterinaria	12
1.4 Consumo de antimicrobianos	17
1.5 Antimicrobianos y medio ambiente	22
2. Determinación de antimicrobianos	25
2.1 Técnicas microbiológicas	26
2.2 Técnicas cromatográficas	30
2.3 Técnicas inmunoquímicas	34
2.3.1. Obtención y características de anticuerpos.....	37
2.3.1.1 <i>Desarrollo de haptenos</i>	40
2.3.2. Tipos de inmunoensayos	44
3. Microinmunoanálisis sobre discos compactos (CDs)	55
3.1 Microarrays	55
3.2 Tipos de soporte	58
3.2.1 Discos Compactos	63
3.3 Tecnología de CDs	65
3.3.1 Estructura de los CDs	65
3.3.2 Funcionamiento de un lector de CDs	67
3.4 Antecedentes de los <i>microarrays</i> sobre CD	71
3.5 Desarrollo de microinmunoensayos sobre CDs	75
3.5.1 Elección de la plataforma analítica.....	75
3.5.2 Amplificación de la señal	76
OBJETIVOS	78
MATERIALES Y MÉTODOS	81
4. Productos y reactivos	83
4.1 Sulfonamidas y tetraciclinas	83
4.2 Reactivos	83
4.3 Tampones	84
4.4 Haptenos	85
4.5 Otros materiales	86
5. Equipos instrumentales	87

6. Técnicas generales	88
6.1 Conjugación de haptenos a proteínas	88
6.2 Purificación de conjugados	91
6.3 Obtención de anticuerpos policlonales	92
6.4 Enzimoimmunoanálisis en fase sólida (ELISA) sobre placas de poliestireno	93
6.4.1 Ensayos de titulación y competición.....	93
6.4.2 Optimización de los ensayos ELISA.....	96
6.4.3 Estudios de selectividad.....	97
6.4.4 Efecto de los disolventes orgánicos.....	98
6.5 Micro-enzimoimmunoanálisis en fase sólida (microinmunoensayo) sobre disco compacto	98
6.5.1 Ensayos de titulación y competición.....	100
6.5.2 Sistema de detección.....	102
RESULTADOS	107
7. Diseño de haptenos	109
7.1 Haptenos para sulfonamidas	110
7.2 Haptenos para tetraciclinas	114
8. Desarrollo y puesta a punto de inmunoensayos en placa ELISA	116
8.1 Sulfonamidas	117
8.1.1 ELISAs competitivos para sulfonamidas.....	117
8.1.2 Optimización y características de los ELISA para sulfonamidas.....	122
8.1.2.1 <i>Efecto de la fuerza iónica</i>	122
8.1.2.2 <i>Efecto del pH</i>	123
8.1.2.3 <i>Efecto de la concentración de tensoactivo</i>	126
8.1.2.4 <i>Efecto del tiempo de incubación en la etapa competitiva</i>	128
8.1.2.5 <i>Prestaciones analíticas de los ELISAs optimizados</i>	130
8.1.2.6 <i>Ensayos de selectividad</i>	132
8.1.3 Determinación de residuos de sulfonamidas en miel.....	140
8.1.3.1 <i>Tolerancia a disolventes orgánicos</i>	141
8.1.3.2 <i>Estudio del procedimiento de extracción de muestras de miel</i>	147
8.1.3.3 <i>Análisis de muestras de miel</i>	151
8.1.4 Determinación de residuos de SSZ en plasma humano.....	155
8.1.4.2 <i>Determinación de SSZ en muestras de suero fisiológico</i>	157
8.1.4.3 <i>Determinación de SSZ en muestras de plasma humano</i> ..	159
8.1.5 Determinación de residuos de SMX en agua de depuradora...	163

8.2 Tetraciclinas	166
8.2.1 ELISAs competitivos para tetraciclinas	166
8.2.2 Optimización y características de los ELISAs para tetraciclinas	168
8.2.2.1 <i>Efecto de la fuerza iónica</i>	169
8.2.2.2 <i>Efecto del pH</i>	170
8.2.2.3 <i>Efecto de la concentración de tensoactivo</i>	171
8.2.2.4 <i>Efecto del tiempo de incubación en la etapa competitiva</i>	172
9. Desarrollo y puesta a punto de inmunoensayos en CD	177
9.1 Sulfonamidas	183
9.1.1 Optimización y características de los microinmunoensayos ...	186
9.1.1.1 <i>Efecto de la fuerza iónica</i>	187
9.1.1.2 <i>Efecto del pH</i>	189
9.1.1.3 <i>Efecto de la concentración de tensoactivo</i>	190
9.1.1.4 <i>Efecto del tiempo de incubación en la etapa competitiva</i>	192
9.1.1.5 <i>Efecto de las condiciones de incubación con</i> <i>el anticuerpo secundario</i>	194
9.1.1.6 <i>Prestaciones analíticas de los</i> <i>microinmunoensayos optimizados</i>	196
9.1.1.7 <i>Ensayos de selectividad</i>	202
9.1.2 Aplicación de los ensayos desarrollados en CD para sulfonamidas	206
9.1.2.1 <i>Determinación de residuos de sulfatiazol en agua</i>	206
9.1.2.2 <i>Determinación de residuos de sulfametoxazol en agua</i> ...	207
9.2 Tetraciclinas	210
9.2.1.1 <i>Efecto de la fuerza iónica</i>	213
9.2.1.2 <i>Efecto del pH</i>	214
9.2.1.3 <i>Efecto de la concentración de tensoactivo</i>	215
9.2.1.4 <i>Efecto del tiempo de incubación en la etapa competitiva</i>	216
9.2.1.5 <i>Efecto de las condiciones de incubación con</i> <i>el anticuerpo secundario.</i>	217
9.2.1.6 <i>Prestaciones analíticas del</i> <i>microinmunoensayo optimizado</i>	219
9.2.1.7 <i>Ensayos de selectividad</i>	223
9.2.2 Aplicación de los ensayos desarrollados en CD para clortetraciclina	224
9.2.2.1 <i>Determinación de residuos de clortetraciclina</i> <i>en dorada (<i>Sparus aurata</i>)</i>	224

9.3 Inmunoensayos en CD: conclusiones	226
CONCLUSIONES GENERALES	229
PUBLICACIONES ASOCIADAS	235
ANEXOS	239

INTRODUCCIÓN

1. Los antimicrobianos

El uso de antibióticos comenzó hace más de tres mil años con la utilización de ciertas plantas y hongos para el tratamiento tópico de infecciones. Hacia el año 2500 AC se describió en China el uso del moho de la soja para el tratamiento de furúnculos, carbunco y otras infecciones cutáneas, mientras que en Egipto (1.500 AC) se empleaba mirra, miel y grasa para curar heridas infectadas. Posteriormente, se continuaron utilizando distintas sustancias en el manejo de heridas, como es el caso de ciertos minerales, por ejemplo malaquita y crisocola -ambas con cobre-, y en el tratamiento de procesos infecciosos¹.

Los avances de las técnicas quirúrgicas hacia mediados del siglo XIX, impulsados por la introducción de la anestesia, trajeron consigo una gran cantidad de complicaciones post-operatorias derivadas de infecciones. En 1865, Joseph Lister demostró que la aplicación de compuestos como el fenol o el calomelano (cloruro mercuríco) en el lavado del instrumental quirúrgico, de las manos y de las heridas, disminuía notablemente la frecuencia de infecciones post-quirúrgicas y permitía disminuir la mortalidad hospitalaria un 30%.

En 1877, Pasteur y Joubert observaron que el crecimiento simultáneo de dos microorganismos en un caldo de cultivo era inferior al de cada uno de ellos por separado, por lo que se dedujo que al menos uno de ellos era inhibido por el otro². Pero fue Paul Vuillemin, en 1889, el primero en aplicar el concepto de antibiosis, al denominar “influencias antibióticas” a

¹ Acuña, G. *Rev. Chil. Infect.* 20 Supl 1 (2003) S7.

² Reiner, R. “Antibiotics, chemotherapeutic agents, and development of chemotherapy”. En: *Antibiotics. An Introduction*. E. Reiner (Eds.). Roche, Basle, Switzerland, 1982, 2.

determinadas interacciones entre animales y plantas³. En 1899, Marshall utilizó por vez primera la palabra “antibiótico”, pero fue Salman Waksman, el descubridor de la estreptomicina, quien la introdujo en medicina y la inmortalizó con su uso actual.

Más tarde, Paul Ehrlich fue el primero en efectuar científicamente una selección sistemática de compuestos con actividad biocida selectiva, mediante un programa racional de síntesis de nuevas sustancias, seguido del ensayo clínico de las mismas. Trabajando en el laboratorio de Koch, probó sistemáticamente derivados del atoxilo (un compuesto que H. Thompson había mostrado como eficaz contra la tripanosomiasis en 1905) y, en 1909, informó de que el compuesto 606 (Salvarsán) era efectivo contra la sífilis⁴. Aunque el Salvarsán presentaba algunos efectos colaterales, fue durante mucho tiempo el único agente disponible contra enfermedades producidas por espiroquetas y sirvió para ilustrar brillantemente la validez de la llamada quimioterapia (término acuñado por el mismo Ehrlich en 1891 para designar el tratamiento de enfermedades mediante sustancias químicas sintéticas), sentando las bases de toda la investigación posterior.

Estrictamente hablando, los antibióticos son sustancias obtenidas de microorganismos que pueden inhibir o matar a otros microorganismos, mientras que los quimioterápicos poseen propiedades similares pero se obtienen por síntesis química. Por tanto, la penicilina sería un antibiótico y las sulfonamidas un quimioterápico. Actualmente, la distinción entre antibiótico y quimioterápico no es tan sencilla, ya que existen gran

³ Levy, S.B., “The antibiotic paradox. How miracle drugs are destroying the miracle”. Plenum Press, New York and London, 1992, 33.

⁴ Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L., Painter, P.R., “Producción microbiana de agentes quimioterapéuticos”. En: *Microbiología* 2ª edición. R.Y. Stanier, J.L. Ingraham, M.L. Wheelis, P.R. Painter (Eds.). Ed Reverté S.A., Barcelona, 1996, 716.

cantidad de sustancias semisintéticas, obtenidas por métodos químicos a partir de precursores microbianos.

1.1 Sulfonamidas

Las sulfonamidas contienen un grupo sulfamilo unido a un anillo benzoico, y grupos NH_2 que le confieren a la molécula actividad antibacteriana (Figura 1).

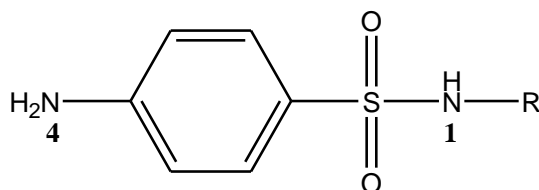


Figura 1. Estructura común de las sulfonamidas

El grupo amino libre (N4) es esencial para la actividad antimicrobiana, así que las sulfonamidas que tienen sustituciones en este nitrógeno deben desdoblarse, liberándolo para poder actuar, tal y como sucede con el Prontosil y con las sulfonamidas no absorbibles (p. ej. Ftalilsulfatiazol). La acetilación de este grupo produce la pérdida de la actividad antimicrobiana. Las sustituciones en el grupo sulfamilo (N1) o amida, dan lugar a compuestos con diversas propiedades físicas, químicas, farmacológicas y antibacterianas, conformando la familia de las sulfonamidas.

Las sulfonamidas pueden ser clasificadas (Tabla 1) según su patrón de absorción y eliminación.

Tabla 1. Clasificación de las sulfonamidas

<i>Tipo</i>	<i>Acción</i>	<i>Uso</i>	<i>Ejemplos</i>
Absorbibles via oral	Rápida <6 h	Infecciones urinarias	Sulfisoxazol Sulfametizol Sulfatiazol
	Intermedia 11-18 h	Asociado con trimetoprim	Sulfametoxazol Sulfadiazina
	Prolongada 24-60 h	Usos especiales Terapéutica general	Sulfadimetoxina Sulfametoxipiridazina
No absorbibles	Inactivas hasta ser hidrolizadas por bacterias intestinales	Quimioterapia intestinal	Sulfasalazina Ftalilsulfatiazol
Otros		Tópico	Sulfacetamida

1.1.1 Mecanismo de acción

Las sulfonamidas son antimicrobianos de amplio espectro, capaces de inhibir a las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como a los protozoos. Sus propiedades antibacterianas se deben a que son capaces de inhibir la síntesis del ácido fólico, necesario para la síntesis de ADN, impidiendo la reproducción de las células bacterianas. La analogía entre la estructura química de las sulfonamidas y la del ácido paraaminobenzoico (PABA) (Figuras 1 y 2), necesario para la síntesis del ácido fólico bacteriano, hace que actúen como antagonistas competitivos, debido a que se unen a la enzima tetrahidropterico sintetasa necesaria para la condensación del ácido fólico. Este ácido es convertido en tetrahidrofolato, que actúa como coenzima en la transferencia de grupos metilo a las bases púricas y pirimidínicas para la síntesis del ADN y ARN⁵.

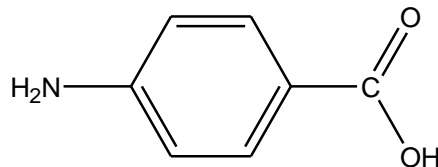


Figura 2. Estructura del ácido p-aminobenzoico (PABA)

⁵ Pumarola Busquets, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J.A. *et al.* “Antimicrobianos”. En: *Microbiología y parasitología médica* 2ª edición. A. Pumarola Busquets, A. Rodríguez-Torres, J.A. García-Rodríguez *et al.* (Eds.). Ed. Elsevier-Masson. Barcelona, 1999, 127.

De este modo, las sulfonamidas impiden la incorporación de PABA a la molécula de ácido fólico, dificultando su biosíntesis, etapa esencial para el crecimiento y la multiplicación bacteriana. Así pues, los microorganismos sensibles a las sulfonamidas son aquellos que deben sintetizar su propio ácido fólico, o bien son impermeables al ácido fólico de los líquidos circundantes.

1.2 Tetraciclinas

Las tetraciclinas fueron descubiertas a finales de los años cuarenta del siglo pasado, como resultado de la necesidad de disponer de nuevos y potentes antibióticos. Las primeras tetraciclinas se obtuvieron a partir de microorganismos presentes en muestras de suelos recogidos en diferentes partes del mundo⁶. En 1948, Benjamin M. Duggar aisló la clortetraciclina a partir del *Streptomyces aureofaciens* (por lo que en un principio fue denominada aureomicina). Dos años más tarde, un grupo de científicos de los laboratorios Pfizer aisló la oxitetraciclina del *Streptomyces rimosus*, tras ensayar 116.000 muestras distintas de suelos. Pero hasta 1953 no se descubrió que ambos fármacos eran derivados de la tetraciclina, un compuesto que ahora se obtiene de *Streptomyces viridifaciens*⁷.

Las tetraciclinas constituyen una familia de productos naturales (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina y demeclociclina) y semisintéticos (metaciclina, doxiciclina, minociclina, limeciclina,

⁶ Francke, E. L., Neu, H. C. *Med. Clin. North Am.* 71 (1987) 1155.

⁷ Hill, J.W., Kolb, D. K. "Tetraciclinas: cuatro anillos y otras cosas". En: *Química para el nuevo milenio*. B. Roberts, F. Corey (Eds.). Prentice Hall, Mexico, 1999, 545.

rolitetraciclina y tigeciclina) de amplio espectro, derivados de diferentes especies de *Streptomyces* spp., que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas⁸. Son agentes bacteriostáticos con actividad frente a una gran variedad de microorganismos (bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, aeróbicas y anaeróbicas)⁹, por lo que se han convertido en antibióticos de uso habitual en humanos y animales^{10,11}.

Actualmente el uso en humanos es cada vez menor, pero siguen siendo utilizadas como promotores del crecimiento en veterinaria¹², a pesar de la prohibición llevada a cabo por la Unión Europea (regulación 1831/2003 del Parlamento Europeo, vigente a partir de 1/1/2006)^{13,14}.

Todas las tetraciclinas poseen un núcleo de estructura tetracíclica lineal compuesta de cuatro anillos fusionados (Figura 3). La nomenclatura genérica de estos compuestos se deriva de las sustituciones de 4 anillos en el núcleo central tetraciclo u octahidronaftaceno, de modo que la suma de diferentes grupos funcionales ha dado lugar a numerosos compuestos. El grupo octahidronaftaceno es anfótero por poseer un grupo OH (ácido) en posición 10 y un grupo amínico terciario (básico) en posición 4, lo que hace que formen sales con los ácidos y con las bases. Las bases forman compuestos poco estables, por lo que generalmente se utilizan sales ácidas como los clorhidratos.

⁸ Pérez-Trallero, E., Iglesias, L. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21 (2003) 520.

⁹ Goodman, L., Gilman, A., En: *The Pharmacological Basis Of Therapeutics 8 ed.* L.L. Brunton (Ed.). Pergamon. New York, 1990, 1158.

¹⁰ Smilack J.D. *Mayo Clin. Proc.* 74 (1999) 727.

¹¹ Chopra I., Roberts M. *Microbiol Mol Biol Rev* 65 (2001) 232.

¹² Lazaro Bengoa, E., Madurga Sanz, M. *Med. Clin.* 118 (2002) 561.

¹³ European Commission, Council Regulation No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September on additives for use in animal nutrition, *Off. J. Eur. Union* L268 (2003) 29.

¹⁴ <http://eur-lex.europa.eu/en/index.htm>

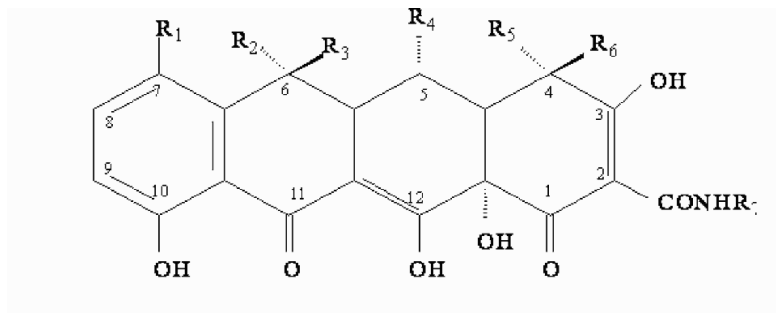


Figura 3. Estructura común de las tetraciclinas

Estos antibióticos son poco solubles en agua, pero forman sales sódicas y clorhidratos muy solubles. Son estables en forma de polvo seco, pero pierden rápidamente su actividad cuando están en disolución^{15,16}.

Las tetraciclinas pueden agruparse en tres generaciones, en función de la fecha de su descubrimiento (Tabla 2)^{17,18}.

1.2.1 Mecanismo de acción

Las tetraciclinas atraviesan la membrana externa de las bacterias a través de las porinas y llegan al citoplasma, de modo que se unen al ribosoma inhibiendo la síntesis de las proteínas. Este efecto se produce al

¹⁵ Malgor, L.A., Valsecia, M.E., "Antibióticos de amplio espectro" En: *Farmacología Médica, Farmacología Antimicrobiana, Farmacología Dermatológica*. Volumen 3. Online (2000) 34.

¹⁶ http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/temas_farma/indice_v3.htm

¹⁷ Damaso, D. "Tetraciclinas". En *Antibacterianos*. D. Dámaso (Ed.). Ed. Marketing Pharm SA, Madrid, 1990, 331.

¹⁸ Chopra, I. *Curr Opin Pharmacol* 1 (2001) 464.

impedir la unión del sitio aminoacil del ácido ribonucleico (ARN) de transferencia a la subunidad 30S ribosómica. La asociación es reversible, lo cual explicaría su efecto bacteriostático. La ausencia de actividad frente a células eucariotas confiere a estos compuestos propiedades antimicrobianas selectivas¹⁹.

Tabla 2. Clasificación de las tetraciclinas por generaciones

<i>Generación</i>	<i>Nombre genérico</i>	<i>Origen</i>
Primera (1948 – 1963)	Clortetraciclina	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
	Oxitetraciclina	<i>Streptomyces rimosus</i>
	Tetraciclina	<i>Streptomices viridifaciens</i> o semisintética a partir de clortetraciclina
	Demeclociclina	Mutación de una cepa de <i>S. aureofaciens</i>
	Rolitetraciclina	Derivados semisintéticos
	Limeciclina	
	Clomociclina	
Segunda (1965 – 1972)	Metaciclina	Derivados semisintéticos
	Doxiciclina	
	Minociclina	
Tercera (1993-)	Glicilglicinas	Modificación de la posición 9 del anillo tetracíclico

¹⁹ Chopra, I., Roberts, M. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65 (2001) 232.

1.3 Uso de antimicrobianos en veterinaria

Los sistemas actuales de explotación ganadera intensiva favorecen la aparición de procesos infecciosos y parasitarios, que requieren la utilización de fármacos con fines terapéuticos y profilácticos -para tratar o bien prevenir enfermedades-. Así, los antimicrobianos son ampliamente utilizados para estos fines debido a su bajo coste y alta eficacia en la lucha contra las enfermedades bacterianas.

Además, ciertos antimicrobianos también pueden ser empleados en producción animal como promotores del crecimiento, existiendo una lista positiva de antibióticos autorizados en función de la especie animal. Para este fin no se requiere el uso de la receta veterinaria, ya que son considerados aditivos del pienso²⁰.

La propiedad de los antimicrobianos de mejorar las tasas de crecimiento animal se conoce desde finales de los años cuarenta del siglo pasado, cuando se observó que las aves alimentadas con productos de la fermentación de *Streptomyces aureofaciens* mejoraban su desarrollo. Se identificó el factor de crecimiento en dichos extractos como residuos de clortetraciclina^{21,22}. Posteriormente se confirmó esta propiedad en múltiples antimicrobianos, y para diversas especies animales.

El mecanismo por el cual los antimicrobianos favorecen el crecimiento no se conoce con exactitud. Básicamente actúan modificando cuantitativa y cualitativamente la flora microbiana intestinal, provocando

²⁰ Long, A.R., Hsieh, L.C., Malbrough, M.S., Short, C.R., Barker, S.A. *J. Agric. Food Chem.* 38 (1990) 423.

²¹ Stokstad, E.L.R., Jukes, T.H. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 72 (1950) 523.

²² Stokstad, E.L.R., Jukes, T.H. *Poult. Sci.* 29 (1950) 611.

una disminución de los microorganismos causantes de enfermedades subclínicas. Actúan también reduciendo la flora, que compete con el huésped por los nutrientes. Todo ello conduce a una mejora en la productividad, ganancia de peso de alrededor del 5% y reduce la mortalidad de los animales.

En aquel entonces no se tuvo en cuenta el efecto que el consumo de estos «factores nutritivos» (como se les consideraba en un principio) pudiera tener sobre la resistencia bacteriana. En 1969 se publicó el informe británico Swann donde, tras relacionar la aparición de un brote de salmonelosis en humanos con el tratamiento de terneras con antibióticos, se alertaba del posible riesgo de selección de bacterias resistentes en animales que pudieran pasar posteriormente al ser humano²³. Dicho informe recomendaba que no se utilizaran como promotores de crecimiento antimicrobianos que pudieran emplearse en medicina humana, o antimicrobianos que causaran resistencias cruzadas. En 1970 se publicó la Directiva CEE 70/524 sobre los aditivos en la alimentación animal. Solamente podrían ser empleados como promotores aquellos antimicrobianos que tuvieran un efecto demostrado sobre el crecimiento animal, que fueran activos frente a bacterias Gram-positivas y que no presentaran absorción intestinal para prevenir la presencia de residuos en la carne. Se decidió eliminar como promotores aquellos antimicrobianos que también fueran utilizados en la medicina humana o animal. De este modo, se prohibía en Europa el empleo de tetraciclinas o β -lactámicos como promotores del crecimiento en animales.

²³ Report of the Joint Committee of the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine. Swann Committee Report. London: HMSO, 1969.

Dicha directiva fue reemplazada por la Regulación 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre los aditivos en alimentación animal. Esta regulación indicaba que los antimicrobianos podían ser comercializados y utilizados como aditivos alimentarios solamente hasta el 31 de diciembre de 2005. Tras esta fecha, las sustancias médicas en los productos alimentarios destinados a animales debían limitarse a aquellas prescritas por un veterinario con fines terapéuticos^{24,25}.

La cantidad total de antibióticos utilizada anualmente solo puede estimarse de manera aproximada. En Europa se ha registrado un gran descenso en la utilización de antibióticos en la producción agropecuaria desde la prohibición de los promotores del crecimiento en 2006. Sin embargo, se estima que la mitad de los antibióticos producidos a nivel mundial están destinados a usos veterinarios^{26,27}.

La situación respecto de los promotores del crecimiento en EE.UU. ha sido, y es, muy diferente a la europea. Actualmente están autorizados como promotores del crecimiento la penicilina, clortetraciclina, eritromicina, estreptomicina, bacitracina y espectinomina (antibióticos de uso en humanos), tilosina y virginamicina (antibióticos con estructuras similares a otros usados en humanos), entre otros²⁸. En EE.UU. se ha estimado que, en un año, las infecciones relacionadas con resistencias antimicrobianas pueden costar billones de dólares y causar la muerte de

²⁴ European Commission, Council Regulation No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September on additives for use in animal nutrition, *Off. J. Eur. Union* L268 (2003) 29.

²⁵ <http://eur-lex.europa.eu/en/index.htm>

²⁶ World Health Organization. Use of antimicrobials outside human medicine and resultant antimicrobial resistance in humans (2002).

²⁷ www.who.int/mediacentre/factsheets/fs268/en/.

²⁸ Editorial *Gac. Sanit.* 16 (2002) 109

unas 63.000 personas²⁹. En la actualidad, la administración Obama estudia la prohibición de algunos antimicrobianos como la penicilina, tetraciclina, eritromicina, tilosina, bacitracina y virginiamicina, aunque todavía no existe normativa al respecto³⁰.

Además de la problemática de la generación de cepas bacterianas resistentes, cabe considerar otros efectos adversos producidos por la presencia de residuos de antibióticos en los distintos tejidos utilizados como alimento o destinados a la obtención de los mismos, como por ejemplo miel, leche, huevos, carne o pescado³¹.

En la literatura podemos encontrar distintos antimicrobianos como la penicilina, las sulfonamidas y la estreptomina, cuyos residuos en alimentos pueden desencadenar reacciones alérgicas, causar hipersensibilidad, o ambas situaciones. Por ejemplo, los residuos de las sulfonamidas (sulfadimetoxina, sulfametazina, sulfametoxazol) pueden causar *rash* cutáneo, así como afecciones endocrinas, particularmente en tiroides y pituitaria³².

La presencia de residuos de antibióticos en alimentos es muy problemática. Así, por ejemplo, las carnes contaminadas con residuos de antibióticos utilizadas para la obtención de productos fermentados, pueden dar lugar a cultivos anómalos y fallos de los iniciadores. Asimismo, la presencia de estos residuos en leche puede inhibir o alterar el crecimiento de

²⁹ 85 Infectious Diseases Society of America. 2007. Facts about antibiotic resistance. www.idsociety.org/Content.aspx?id=5650.

³⁰ Infectious Diseases Society of America (IDSA) HR 1549 Letter to Representative Slaughter. *Preservation of Antibiotics for Medical Treatment Act of 2009*

³¹ Franco D.A., Webb J., Taylor C.E. *J. Food Protect* 53 (1990) 178.

³² López, L.C., Romero, J., Velásquez, L.E. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.* 21 (2008) 121.

los microorganismos necesarios para la fabricación de queso y/o yogur^{33,34}. Además, los residuos de antibióticos podrían llegar incluso a alterar el desarrollo de la flora microbiana contaminante, lo que podría ocasionar el enmascaramiento de algunos agentes patógenos durante el control bacteriológico de los alimentos.

Algunos de los antimicrobianos administrados como promotores del crecimiento se absorben poco en el tracto intestinal de los animales, eliminándose a través de las heces a elevadas concentraciones. Por el contrario, otros antimicrobianos se absorben a nivel intestinal, pero sus metabolitos pueden ser eliminados por la orina. Como consecuencia, la práctica de incorporar los purines como fertilizantes favorece aún más la dispersión de estas sustancias en el medio ambiente³⁵.

Los estudios llevados a cabo para la detección de residuos de antimicrobianos en agua y sedimentos son cada vez más numerosos, y en ellos se describen los efectos negativos que pueden ejercer, a medio y largo plazo, en los organismos y microorganismos que habitan estos ecosistemas^{36,37}.

³³ Smit, L.A., Hoogenboom, L.A., Berghmans, M.C., Haagsma, N. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 198 (1994) 480.

³⁴ Grunwald, L., Petz, M. *Anal. Chim. Acta* 483 (2003) 73.

³⁵ Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.T. *Chemosphere* 64 (2006) 497.

³⁶ Le-Minh, N., Khan, S.J., Drewe, J.E., Stuetz, R.M. *Water Research* 44 (2010) 4295.

³⁷ Martinez, J.L. *Environmental Pollution* 157 (2009) 2893.

1.4 Consumo de antimicrobianos

El consumo anual estimado de antimicrobianos, tanto en la Unión Europea (UE) como en Estados Unidos (EE.UU.), es de aproximadamente 10.000 toneladas de ingrediente activo. De acuerdo a la información disponible, se estima que en la UE el 52% fue utilizado en medicina humana, el 33% en medicina veterinaria y el 15% en producción animal, mientras que más del 70% del consumo en EE.UU. fue destinado a producción animal^{38,39}. Estos datos incluyen los antimicrobianos añadidos a los alimentos de los animales para prevenir y tratar enfermedades, así como para promover el crecimiento. Mientras que la UE ha prohibido el uso no terapéutico de antimicrobianos, en EE.UU. se utilizan anualmente cerca de 6 toneladas con estos fines⁴⁰.

Los grupos de antimicrobianos más ampliamente utilizados en veterinaria en la UE son tetraciclinas, macrólidos, penicilinas, aminoglicósidos y sulfonamidas/trimetoprim⁴⁰.

El uso de antimicrobianos ha sido objeto especial de seguimiento en la UE desde 2001, con lo que se ha pretendido poner a disposición pública los datos EUROMED-STAT de uso de medicamentos de una buena parte de los países europeos^{41,42}. Otro estudio (ESAC: European Surveillance of

³⁸ Hughes, D., Andersson, D.I. Antibiotic development and resistance. Taylor & Francis, 2001.

³⁹ Mellon M., Benbrook C., Lutz Benbrook K. Estimates of Antimicrobial Abuse in Livestock, Union of Concerned Scientists, Cambridge, MA, 2001.

⁴⁰ European Commission, Opinion of the Scientific Steering Committee on Antimicrobial Resistance, 1999.

⁴¹ EUROMED-STAT. A Project funded by the European Commission. En: <http://www.euromedstat.cnr.it>

⁴² The EuroMedStat Group. Monitoring expenditure and utilization of medicines in the European Union. A public health approach. Italian Journal Public Health 3 (2006) 15.

Antimicrobial Consumption), puso a disposición de los profesionales sanitarios, la comunidad científica y los ciudadanos en general, los datos del uso de medicamentos con cargo al Sistema Nacional de Salud de los diferentes países miembros de la U.E. (Figuras 4 y 5).

Siguiendo las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre Estudios de Utilización de Medicamentos, los consumos de las especialidades farmacéuticas se han expresado como dosis diarias definidas (DDD) por 1.000 habitantes y día (DHD). La DDD es una unidad técnica de medida que corresponde a la dosis de mantenimiento en la principal indicación, para una vía de administración determinada en adultos; como unidad técnica no refleja necesariamente la dosis diaria realmente prescrita o utilizada por el paciente, aunque debería aproximarse a ella. El cálculo de las DHD a partir del número de envases dispensados se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$DHD = (UV \times FF \times C \times 1.000) / (DDD \times N^{\circ} \text{ de habitantes} \times 365 \text{ días})$$

donde

UV = unidades de envase vendidas

FF = número de formas farmacéuticas por envase

C = cantidad de principio activo en cada forma farmacéutica

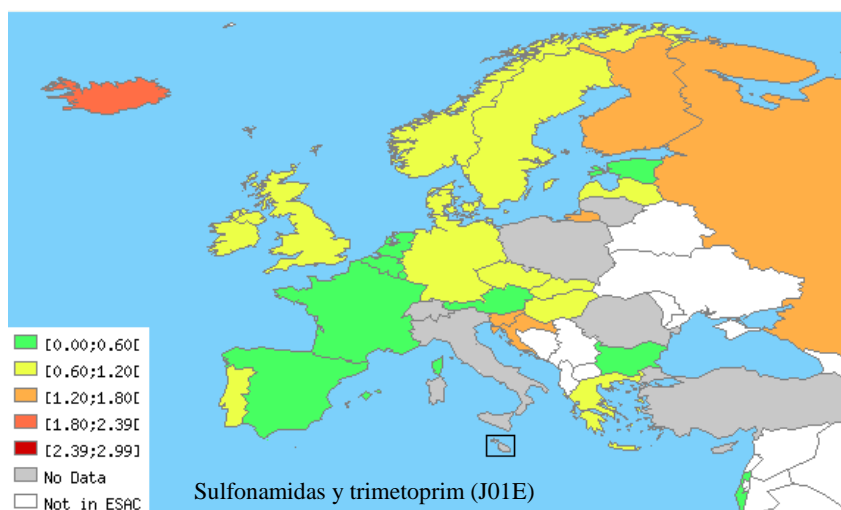


Figura 4. Sulfonamidas y trimetoprim (J01E) dispensadas por la Seguridad Social en Europa (2004), expresados como dosis diarias definidas por 1.000 habitantes y día (DHD). Proyecto europeo ESAC (Fuente: <http://www.esac.ua.ac.be>).

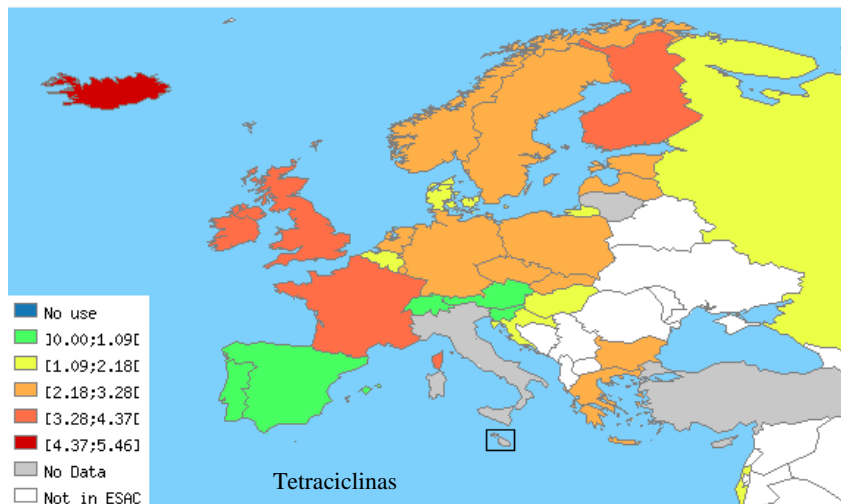


Figura 5. Tetraciclinas dispensadas por la Seguridad Social en Europa (2004), expresados como dosis diarias definidas por 1.000 habitantes y día (DHD). Proyecto europeo ESAC (Fuente: <http://www.esac.ua.ac.be>).

Así, una utilización de 20 DHD en un año dado puede ser interpretada como si cada día de dicho año, 20 habitantes de cada 1.000 hubiesen recibido una DDD del medicamento.

El consumo de antimicrobianos en España alcanzó su máximo histórico en 1995, con 22,1 DHD y, a partir de ese momento, disminuyó hasta las 18 DHD que se contabilizaron en 2001 (Figura 6). Lamentablemente, a partir de esa fecha se registró un aumento del consumo, llegando en el año 2005 a 19,3 DHD, no habiendo datos más actuales.

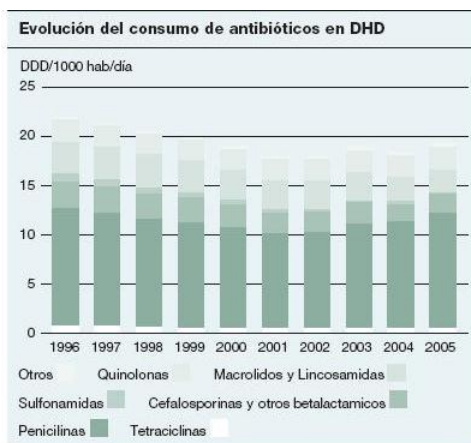


Figura 6. Evolución del consumo de antibióticos en España⁴³

⁴³ Lázaro, E., Oteo, J. *Inf. Ter. Sist. Nac. Salud* 30 (2006) 10.

En la Figura 7, puede observarse la evolución del uso de antibióticos en España por subgrupos.

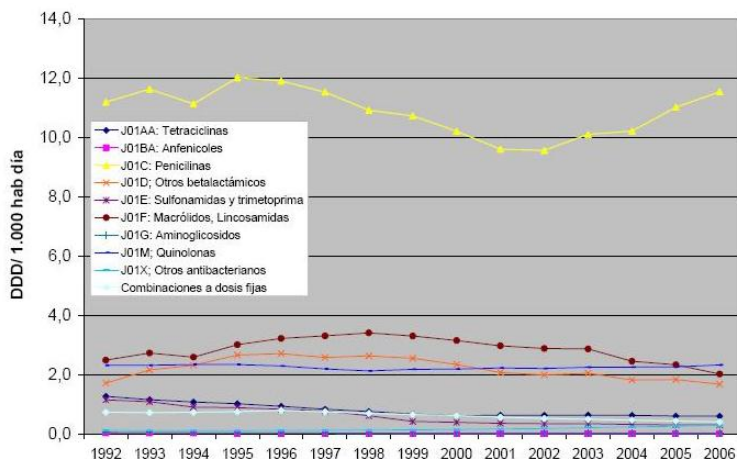


Figura 7. Evolución del uso de antibióticos en España por subgrupos (1992-2006)⁴⁴

España se encuentra entre los países europeos de mayor consumo de antibióticos. Dicho consumo no se explica por una mayor prevalencia de infecciones en nuestro país con respecto a otros de nuestro entorno, sino a que se utilizan también para tratar infecciones como las causadas por virus, que no requieren ni responden al tratamiento con antibióticos⁴⁵.

⁴⁴ Lázaro, E., de Abajo, F.J. Uso de antibióticos en España.

www.agemed.es/profHumana/observatorio/docs/uso-antibioticos-oct07.pdf

⁴⁵ Ministerio de Sanidad y Consumo.

<http://www.msc.es/campanas/campanas06/antibioticos3.htm>

1.5 Antimicrobianos y medio ambiente

Los residuos de productos farmacéuticos fueron detectados por primera vez en el medio ambiente hace más de 30 años^{46,47,48}.

Los antimicrobianos se encuentran entre los microcontaminantes emergentes en agua y presentan gran impacto al producir efectos adversos en los ecosistemas⁴⁹. Estos compuestos alcanzan el medio ambiente por distintas vías, dependiendo de su procedencia (uso humano o animal).

Las plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas son el principal foco de residuos de antimicrobianos de uso humano, debido a que las sustancias de origen farmacéutico no son eliminadas completamente durante el tratamiento de las aguas y, además, no son fácilmente biodegradables en el medio ambiente⁵⁰.

La concentración de antimicrobianos en efluentes de aguas residuales, o en aguas superficiales y subterráneas contaminadas por dichos efluentes, puede alcanzar niveles de hasta $1 \mu\text{g L}^{-1}$, aunque varían considerablemente^{51,52}.

⁴⁶ Garrison, A.W., Pope, J.D., Allen, F.R. "GC/MS análisis of organic compounds in domestic wastewater". En: *Identification and analysis of organic pollutants in water*. Keith, L.H. (Ed.), Ann Arbor Science, Minneapolis, (1976) 517.

⁴⁷ Hignite, C., Azarnoff, D.L. *Life Sci.* 20 (1977) 337.

⁴⁸ Waggot, A. "Trace organic substances in the River Lee (Great Britain)". En: *Chemistry in water reuse, vol 2*. Cooper, W.J. (Ed.), Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI, (1981) 55.

⁴⁹ Baquero, F., Martínez, J.L., Cantón, R. *Current opinión in Biotechnology* 19 (2008) 260.

⁵⁰ Le-Minh, N., Khan, S.J., Drewe, J.E., Stuetz, R.M. *Water Research* 44 (2010) 4295.

⁵¹ Díaz-Cruz, M. S., Barceló, D. "Input of Pharmaceuticals, Pesticides and Industrial Chemicals as a Consequence of Using Conventional and Non-conventional Sources of Water for Artificial Groundwater Recharge". En: *The handbook of environmental chemistry, Volumen 5*. D. Barceló, M. Petrovic (Eds.). Springer, Berlin, 2008, 219.

⁵² Díaz-Cruz, M.S., García-Galán, M.J., Guerra, P., Jelic, A., Postigo, C., Eljarrat, E., Farré, M., López de Alda, M.J., Petrovic, M., Barceló, D. *Trends in Analytical Chemistry* 28 (2009) 1263.

La presencia de productos farmacéuticos utilizados en medicina humana en el medio acuático también puede proceder de otras fuentes, como la lixiviación en los vertederos⁵³ o residuos procedentes de los procesos de fabricación⁵⁴. En el medio ambiente, la presencia de antimicrobianos de uso veterinario es debida, mayoritariamente, al aporte de enmiendas orgánicas (estiércol) y a la aplicación de purines⁵⁵.

En la Figura 8 se resumen las diferentes vías de acceso por las que los antimicrobianos utilizados como fármacos pueden acceder al medio ambiente. Así, se pone de relieve la conexión íntima, inseparable e inmediata entre las acciones, actividades y comportamientos de los ciudadanos y el medio ambiente en que viven. Estos compuestos son continuamente introducidos en el medio ambiente (principalmente a través de aguas superficiales y subterráneas) en gran medida a través de los sistemas de tratamiento de aguas residuales, fosas sépticas y fugas de la red sanitaria de aguas residuales urbanas, entre otros.

⁵³ Ahel, M., Jelicic, I. "Phenazone analgesics in soil and groundwater below a municipal solid waste landfill". En: *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues. Symposium Series 791*. C.G. Daughton, T. Jones-Lepp editors. American Chemical Society. Washington DC, 2001; 100.

⁵⁴ Reddersen, K., Heberer, T., Dunnbier, U. *Chemosphere* 49 (2002) 539.

⁵⁵ Kim, S-C., Carlson, K. *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 50.

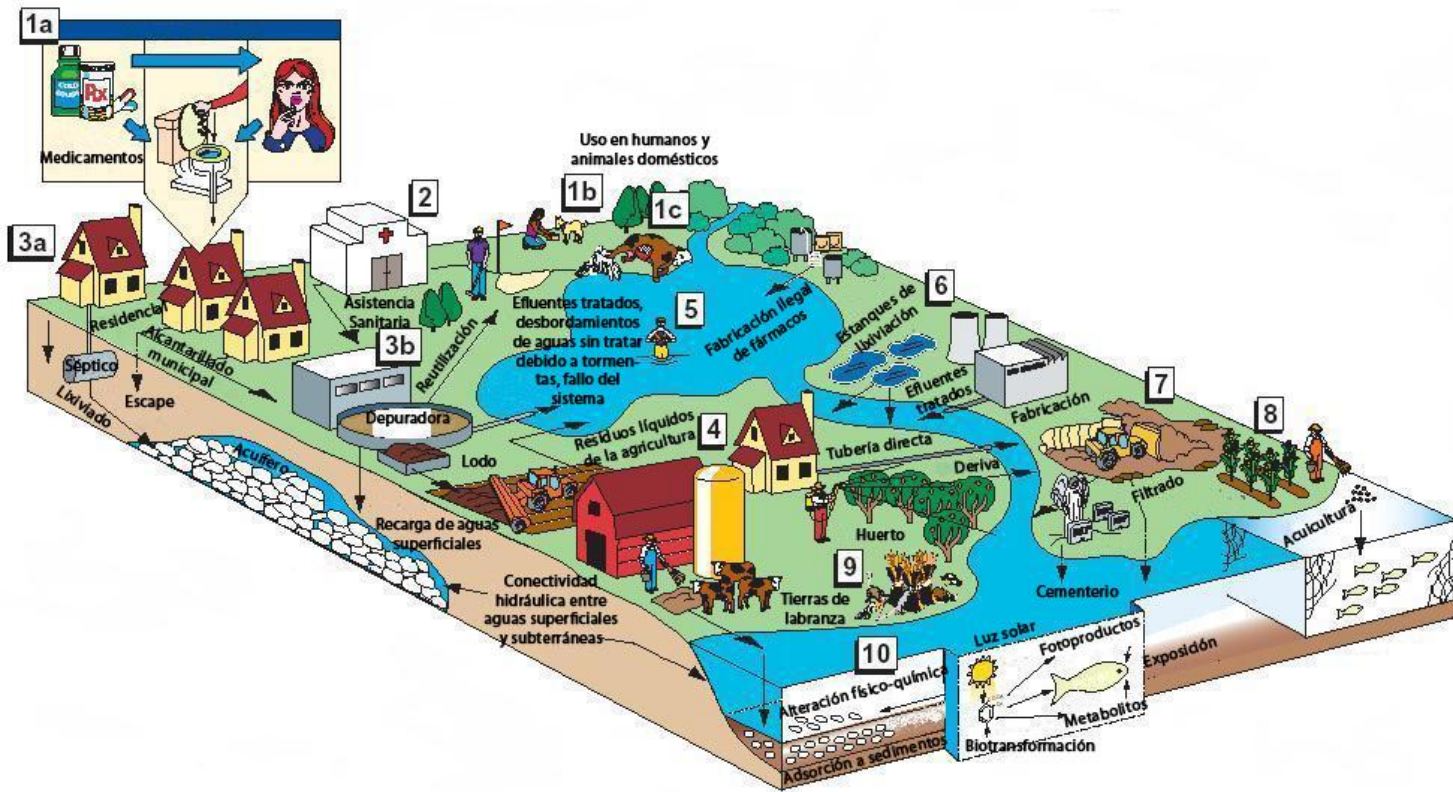


Figura 8. Origen y destino de los productos farmacéuticos en el medio ambiente.

(Fuente: US-EPA; <http://epa.gov/esd/bios/daughton/book.htm>)

2. Determinación de antimicrobianos

Para la determinación de residuos de antimicrobianos podemos distinguir dos grandes grupos de técnicas: los métodos de barrido o criba (*screening*), y los métodos de confirmación.

La función de un método de barrido es detectar con rapidez la presencia de una sustancia, o de un tipo de sustancias, al nivel de interés. El cribado permite analizar muchas muestras simultáneamente, en busca de posibles positivos, diseñando los experimentos para evitar falsos negativos (Decisión de la Comisión 2002/657/CE). De entre las diferentes técnicas de barrido disponibles para la detección de residuos de antimicrobianos, las más empleadas son las microbiológicas, las inmunológicas y la cromatografía en capa fina (TLC)⁵⁶.

Los métodos de confirmación, por el contrario, son aquellos que permiten obtener información adicional para la cuantificación e identificación inequívoca del analito (Decisión de la Comisión 2002/657/CE). El análisis se lleva a cabo, generalmente, mediante cromatografía líquida (HPLC) con detección fluorescente, UV o por espectrometría de masas (MS).

Sin embargo, los métodos cromatográficos no están exentos de inconvenientes, destacando la dificultad de analizar grandes volúmenes de muestras en tiempos reducidos –indispensable para llevar a cabo programas de vigilancia y control efectivos–, o el requerimiento de tratamientos de muestra laboriosos y equipos caros, por lo que es necesario desarrollar nuevos métodos más simples y rápidos.

⁵⁶ Toldrá, F., Reig, M. *Trends Food Sci. Technol.* 17 (2006) 482.

Los métodos de barrido resultan ser una alternativa muy interesante, ya que permiten la determinación de estos compuestos en concentraciones del orden de los límites máximos de residuos (LMRs) establecidos, de forma rápida y a precios muy competitivos. En general, los métodos de *screening* permiten procesar una gran cantidad de muestras de forma simultánea, con un tratamiento de muestra mínimo. Dentro de los métodos de barrido, destacan las técnicas microbiológicas, las inmunoquímicas y los biosensores.

En general, los métodos reportados se agrupan según el tipo de técnica analítica empleada (base de datos *Web of Knowledge*). Así, la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) es el método analítico más empleado, seguido de la cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (LC-UV) y los métodos ELISA, aunque cabe destacar que el desarrollo de métodos de *screening*, como por ejemplo los biosensores, está aumentando considerablemente en los últimos años⁵⁷.

2.1 Técnicas microbiológicas

Las técnicas microbiológicas se clasifican, en función del formato, en ensayos de inhibición bacteriana y ensayos de receptores.

⁵⁷ Cháfer-Pericás, C., Maquieira, A., Puchades, R., Miralles, J., Moreno, A. *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 911.

Los ensayos de inhibición bacteriana se han desarrollado y utilizado tradicionalmente para la detección de residuos de antibióticos o sustancias antimicrobianas en productos alimenticios, especialmente leche y tejidos animales⁵⁸. Estos métodos se basan en la inhibición del crecimiento microbiano producido por los fluidos o extractos tisulares. Requieren tiempos de incubación superiores a 12 horas (cultivos *overnight*), pero presentan la ventaja de poder procesar muchas muestras simultáneamente. Además, requieren pequeñas cantidades de muestra, un equipamiento mínimo, un pretratamiento de la muestra simple, y tienen un coste relativamente bajo. El principal inconveniente que presentan es su reducida capacidad de discriminación entre sustancias de una misma familia terapéutica, y su incapacidad para detectar metabolitos inactivos microbiológicamente^{59,60}.

Existen en el mercado kits microbiológicos para realizar determinaciones individuales, o para *screening* de un amplio número de compuestos antimicrobianos de uso frecuente. Así, el kit Premi-Test (DSM, Holanda), con detección colorimétrica, está diseñado para la determinación semicuantitativa de tetraciclinas, macrólidos, aminoglicósidos, sulfonamidas y β -lactámicos, en carne, pescado, miel y huevos. Este test se basa en la inhibición del crecimiento del *Bacillus stearothermophilus*, muy sensible a la mayoría de antibióticos, incluyendo las sulfonamidas. Sin embargo, la presentación de resultados es lenta y el límite de detección medio inferior a

⁵⁸ Aerts, M.M., Hogenboom, A.C., Brinkman, U.A. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 667 (1995) 1.

⁵⁹ Okerman, L., De Wasch, K., Van Hoof, J. *Analyst* 123 (1998) 2361.

⁶⁰ Dey, B.P., Reamer, R.P., Thaker, N.H., Thaler, A.M. *J. AOAC Int* 88 (2005) 440.

100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ⁶¹. En España, la empresa Microkit S.L. dispone de un kit cualitativo (Microkit antibiotic test) para la determinación de inhibidores en leche, carne, huevos, miel, pescado, etc. El ensayo utiliza también *Bacillus stearothermophilus*, var. Calidolactis, y un indicador de pH. Al germinar las esporas, la acidificación consecuente al metabolismo produce un viraje de color del violeta al amarillo. En presencia de inhibidores, la espora no germina y el color del medio no varía. La sensibilidad depende del antibiótico, y oscila entre 100, 200 y 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC) y clortetraciclina (CTC), respectivamente ⁶².

Así pues, los ensayos de inhibición microbiana pueden utilizarse para screening, aunque no son específicos y su precisión es variable. Además, la presencia de sustancias inhibidoras interferentes afecta a la exactitud del análisis. En este sentido, está demostrado que inhibidores como el agua oxigenada –sustancia presente naturalmente en mieles en determinados estados de maduración– interfieren negativamente en el resultado de los ensayos, invalidándolos como métodos de control.

Los kits microbiológicos requieren un buen control de la temperatura de incubación y tiempos de desarrollo del orden de tres a cuatro horas. Informan sobre la presencia de inhibidores del crecimiento del microorganismo base del ensayo, por lo que no son selectivos (muestras que contienen inhibidores diferentes a los antibióticos dan con frecuencia falsos negativos). Por otro lado, es frecuente tener que efectuar ensayos basados en diferentes cepas para detectar el tipo de compuesto deseado. Además, presentan falsos resultados cuando la muestra contiene microorganismos

⁶¹ Stead, S., Sharman M., Tarbin, J. A., Gibson, E., Richmond, S., Stark, J, Geijp, E. *Food Additives and Contaminants* 21 (2004) 216.

⁶² <http://www.laboratoriosmicrokit.com>

que compiten con el inóculo base del ensayo. A este respecto, los tests de inhibición microbiológicos son, en general, menos específicos y sensibles que los basados en técnicas inmunoquímicas; teóricamente, todo tipo de sustancia con carácter y actividad antibacteriana puede producir la inhibición del crecimiento de bacterias, dando lugar a falsos positivos.

En los últimos quince años, paralelamente a los ensayos tradicionales de inhibición microbiana, se ha producido un incremento notable en el desarrollo de métodos microbiológicos basados en la utilización de receptores proteicos. Estos ensayos se basan en la unión del antibiótico a una proteína específica, alojada en la matriz de una membrana o situada en células microbianas. Se trata de métodos más versátiles que los ensayos de inhibición y, en principio, se pueden aplicar a la determinación de diferentes residuos de antibióticos en diferentes de matrices. Existe una gran diversidad de kits comerciales basados en este tipo de reconocimiento como, por ejemplo, el SNAP Tetracycline Test (IDEXX Laboratories, Inc., Maine, USA), que permite detectar TC, CTC y OTC en leche de vaca por debajo del nivel de tolerancia establecido por la US.FDA ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$)⁶³.

⁶³ Kurittu, J., Lonnberg, S., Virta, M., Karp, M. *J. Food Prot.* 63 (2000) 953.

2.2 Técnicas cromatográficas

Entre las técnicas cromatográficas, la cromatografía en capa fina (TLC) es utilizada como técnica de barrido para el análisis de residuos de tetraciclinas en alimentos⁶⁴. En general, permite analizar simultáneamente varias muestras sobre la misma placa, con un coste relativamente bajo, y una selectividad y sensibilidad aceptables. En 2006, Petkovska *et al.*⁶⁵ desarrollaron un método de TLC para la determinación de TC, OTC, CTC en muestras de leche por debajo del LMR permitido. La TLC también se ha utilizado como método de barrido derivatizando las sulfonamidas con fluorescamina para su detección.

En el transcurso de los años, la TLC ha sido mejorada, pero sigue siendo una técnica poco precisa y de difícil cuantificación, por lo que se reserva como método de barrido. Además, esta metodología requiere laboriosas etapas de tratamiento de muestra y purificación con el fin de evitar interferencias, lo que incrementa el tiempo de análisis y su coste.

Como técnicas de confirmación se utilizan, generalmente, cromatografía de gases (GC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Cuando se emplea la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC/MS), sulfonamidas y tetraciclinas requieren una derivatización previa para aumentar su volatilidad y originar fragmentos de masa molecular adecuados para el análisis de trazas. Aún así, la GC/MS no es la técnica más adecuada para el análisis de estos compuestos, debido

⁶⁴ Oka, A., Ito, Y., Matsumoto, H. *J. Chromatogr. A* 882 (2000) 109.

⁶⁵ Petkovska, E., Slaveska-Raicki, R., Rafajlovska, V. *Chemia Analityczna* 51 (2006) 275.

al laborioso tratamiento de muestra previo al análisis y al coste de la instrumentación requerida (tanto de compra como de mantenimiento)⁶⁶.

Sin duda alguna, la técnica más utilizada como método de cuantificación y confirmación para el análisis de residuos de sulfonamidas y tetraciclinas, es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con distintos tipos de detección:

- **Ultravioleta (UV).** Utilizando esta técnica, Peng *et al.*⁶⁷ determinaron sulfonamidas, fluoroquinolonas, trimetoprim y cloramfenicol, con límites de cuantificación (LC) entre 0,035 y 0,1 ng mL⁻¹ en aguas de río, y entre 0,1 y 0,3 ng mL⁻¹ en aguas residuales. El compuesto más detectado fue sulfametoxazol, con una concentración máxima de 0,51 ng mL⁻¹ en un río de China. Asimismo, Khosrokhavar *et al.*⁶⁸ reportan un límite de detección (LD) de 50 ng mL⁻¹ para determinación de oxitetraciclina en leche, previa extracción.
- **Fluorimétrica.** En este campo, Spisso *et al.*⁶⁹ desarrollaron y validaron un método para determinar tetraciclinas en muestras de leche, con LD entre 5 y 35 ng mL⁻¹. Por otro lado, Schneidera *et al.*⁷⁰ llevaron a cabo la determinación multiresiduo de tetraciclinas y fluoroquinolonas en muestras de pescado (bagre), alcanzando límites de cuantificación entre 0,15 y 1,5 ng mL⁻¹.

⁶⁶ Niessen, W.M. *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 53.

⁶⁷ Peng, X., Tan, J., Tang, C., Yu, Y., Wang, Z. *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 73.

⁶⁸ Khosrokhavar, R., Hosseini, M.J., Amini, M., Pirali-Hamedani M., Ghazi-Khansari, M., Bakhtiarian, A. *Toxicology Mechanisms and Methods* 18 (2008) 351.

⁶⁹ Spisso, B.F., de Oliveira e Jesusa, A.L., Gonçalves de Araújo Júnior, M.A., Alves Monteiro, M. *Anal. Chim. Acta* 581 (2007) 108.

⁷⁰ Schneidera, M.J., Darwishb, A.M., Freemanb, D.W. *Anal. Chim. Acta* 586 (2007) 269.

- **Electroquímica.** La cromatografía de alta resolución con detección electroquímica fue empleada por Loetanantawong *et al.*⁷¹ para la determinación de tetraciclinas en gambas, obteniendo un LD de 1 ng mL⁻¹ para tetraciclina y oxitetraciclina, y 0,5 ng mL⁻¹ para clortetraciclina y doxiciclina. Asimismo, Tretepvijit *et al.*⁷², desarrollaron un método basado en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección amperométrica para la determinación de tetraciclinas, alcanzando un LD de 10 ng mL⁻¹ para tetraciclina y oxitetraciclina, y 50 ng mL⁻¹ para clortetraciclina y doxitetraciclina.
- **Espectrometría de masas.** La detección mediante espectrometría de masas es la más referenciada en la bibliografía. Con esta técnica, Lindsey *et al.*⁷³ desarrollaron un método para la determinación simultánea de 6 sulfonamidas y 5 tetraciclinas, en 141 muestras de aguas superficiales y 6 subterráneas. Encontraron residuos de estos antimicrobianos en 9 de las muestras analizadas, con concentraciones entre 0,07 y 15 ng mL⁻¹. Así, se encontraron residuos de sulfametoxazol (0,22-1,02 ng mL⁻¹), sulfatiazol (0,08 ng mL⁻¹), clortetraciclina (0,15 ng mL⁻¹) y oxitetraciclina (0,07-1,34 ng mL⁻¹), entre otros. Más información la proporcionó el trabajo de Koesukwiwat *et al.*⁷⁴,

⁷¹ Loetanantawong, B., Suracheep, C., Somasundrum, M., Surareungchai, W. *Anal. Chem.* 76 (2004) 2266.

⁷² Tretepvijit, S., Preechaworapun, A., Praphairaksit, N., Chuanuwatanakul, S., Einaga, Y., Chailapakul, O. *Talanta* 68 (2006) 1329.

⁷³ Lindsey, M.E., Meyer, M., Thurman, E.M. *Anal. Chem.* 73 (2001) 4640.

⁷⁴ Koesukwiwat, U., Jayantaa, S., Leepipatpiboon, N. *J. Chromatogr. A* 1140 (2007) 147.

centrado en la determinación de 10 antibióticos (entre los que se encuentran distintas sulfonamidas y tetraciclinas) en muestras de leche. Utilizando SPE seguida de LC-ESI-MS, obtuvieron límites de detección entre 0,5 y 3 ng mL⁻¹. Por otro lado, Ye *et al.*⁷⁵ reportaron un método para la determinación simultánea de 24 antibióticos (entre los que se encuentran 7 sulfonamidas y 6 tetraciclinas) en agua potable, con límites de cuantificación inferiores a 10 ng L⁻¹. En este estudio se hallaron concentraciones de sulfametoxazol entre 3 y 3,4 ng L⁻¹. Más recientemente, Blasco *et al.*⁷⁶ desarrollaron un método utilizando cromatografía líquida en *tándem* (HPLC-MS/MS), y una extracción líquida presurizada (PLE) previa, para determinar residuos de tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina y doxiciclina en tejidos musculares de vaca, cerdo, cordero y aves de corral. Los límites de cuantificación obtenidos oscilaron entre 0,5 y 1 mg kg⁻¹.

Sin embargo, estas técnicas, aunque imprescindibles para confirmación, presentan ciertos inconvenientes como métodos de barrido, derivados del elevado coste de la instrumentación, la necesidad de personal altamente cualificado y los dilatados tiempos de análisis, que incluyen

⁷⁵ Ye, Z. Q., Weinberg, H.S., Meyer, M.T. *Anal. Chem.* 79 (2007) 1135.

⁷⁶ Blasco, C., Di Corcia, A., picó, Y. *Food Chem.* 116 (2009) 729.

etapas de limpieza de la muestra y, en algunos casos, derivatización. Esto conlleva problemas de pérdida de analito y falta de reproducibilidad⁷⁷.

2.3 Técnicas inmunoquímicas

Los métodos basados en reacciones inmunológicas han demostrado ser una herramienta analítica muy útil para la determinación de distintos tipos de sustancias, y una buena alternativa a los métodos analíticos clásicos. Las técnicas inmunoquímicas son sensibles, selectivas, simples, rápidas y baratas. La utilización de los inmunoensayos está muy bien establecida en el área clínica, donde es posible cuantificar distintos compuestos a bajas concentraciones en sangre, orina, tejidos, etc.^{78,79}

En 1971, Peter Perlmann y Eva Engvall de la Universidad de Estocolmo⁸⁰, así como Anton Schuurs y Bauke van Weemen en Holanda⁸¹, publicaron -independientemente- trabajos que sentaban las bases para llevar a cabo ensayos ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Hoy en día, entre los métodos inmunoquímicos, el ensayo tipo ELISA ocupa una posición dominante, representando aproximadamente el 90%⁸².

Desde entonces, se han utilizado numerosos marcadores enzimáticos y se han ensayado numerosas fases sólidas, desde los tubos de cristal de los

⁷⁷ Goodrow, M.H., Sanborn, J.R., Soutamire, D.W., Gee, S.J., Hammock, B.D. En: *Immunoanalysis of Agrochemicals, Emerging Technologies*. Vol. 586, J.O. Nelson, A.E. Karu, R.B. Wong (Eds.). American Chemical Society, Washington, 1995, 119.

⁷⁸ Sherry, J. *Chemosphere* 34 (1997) 1011.

⁷⁹ Glick, B.R., Pasternak, J.J. *Molecular biotechnology*. Ed. American Society for Microbiology, Washington D.C. 1998.

⁸⁰ Engvall, E., Perlman, P. *Immunochemistry* 8 (1971) 871.

⁸¹ Van Weemen, B.K., Schuurs, A.H. *FEBS Letters* 15 (1971) 232.

⁸² Gabaldón, J.A., Maquieira, A., Puchades, R. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 39 (1999) 519.

orígenes a las actuales microplacas de poliestireno y chips con micromatrices impresas^{83,84}.

Estos métodos han tenido una enorme aplicación en química clínica para la detección de innumerables compuestos (como hormonas, drogas y virus) y, actualmente, los métodos inmunoquímicos son ampliamente usados en el área médica y química, así como en la microbiológica y alimentaria^{85,86,87}.

Los inmunoensayos se han convertido en un instrumento popular para el monitoreo rápido de componentes minoritarios, incluyendo residuos de antimicrobianos y otros contaminantes orgánicos, en el medio ambiente y alimentos, tal y como demuestran la gran cantidad de artículos y revisiones publicadas al respecto en los últimos años^{88,89,90,91,92}.

Los métodos inmunoquímicos se basan en el uso de anticuerpos, que se caracterizan por presentar sitios de reconocimiento que les permiten establecer interacciones altamente específicas con los antígenos, cuya extensión depende de la intensidad de la interacción antígeno/anticuerpo.

⁸³ Lequin, R.M. *Clinical Chemistry* 51 (2005) 2415.

⁸⁴ Gorkin, R., Park, J., Siegrist, J., Amasia, M., Lee, B.S., Park, J.M., Kim, J., Kim, H., Madou, M., Cho, Y.K. *Lab Chip* 10 (2010) 1758.

⁸⁵ Zhang, A., Long, W., Guo, Z., Liu, G., Hu, Z., Huang, Y., Li, Y., Grabinski, T.M., Yang, J., Zhao, P.X., Everett, A.D., Zhang, Y., Cao, B.B. *Journal of Immunological Methods* 355 (2010) 61.

⁸⁶ Ma, X., Sun, P., He, P., Han, P., Wang, J., Qiao, S., Li, D. *Food Chemistry* 121 (2010) 546.

⁸⁷ Reed, Z.H., Park, J.W. *Food Chemistry* 123 (2010) 196.

⁸⁸ Cháfer-Pericás, C., Maquieira, A., Puchades, R. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29 (2010) 1038.

⁸⁹ Altstein, M, Aziz, O.B., Skalka, N., Bronshtein, A., Chuang, J.C., Van Emon, J.M. *Analytica Chimica Acta* 675 (2010) 138.

⁹⁰ Li, J., Liu, J., Zhang, H.C., Li, H., Wang, J.P. *Analytica Chimica Acta* 678 (2010) 1.

⁹¹ Kidd, C.E., Kidd, M.R., Hofmann, H.A. *General and Comparative Endocrinology* 165 (2010) 277.

⁹² Meneely, J.P., Sulyok, M., Baumgartner, S., Krska, R., Elliott, C.T. *Talanta* 81 (2010) 630.

Las principales ventajas de los inmunoensayos son:

- Simplicidad y rapidez
- Alta sensibilidad y selectividad
- Elevada capacidad de trabajo
- Bajo coste⁹³
- Preparación de muestra simple
- Posibilidad de automatización y aplicabilidad a análisis de rutina en condiciones de campo^{94,95}

Sin embargo, la utilización de ensayos inmunoquímicos requiere considerar también sus limitaciones. Hay que tener en cuenta los posibles efectos de los factores medioambientales en los resultados⁹⁶, ya que los ensayos pueden estar afectados, entre otros, por la matriz de la muestra (materia orgánica, pH, sales, etc.) y, por tanto, se necesita encontrar las condiciones óptimas de trabajo^{97,98}. Además, la respuesta del método a compuestos análogos, metabolitos u otros componentes que puedan estar presentes en la muestra, es otro problema a tener en cuenta. Por último, cabe recordar que para desarrollar un inmunoensayo es necesario disponer de los

⁹³ Deng, A.P., Himmelsbach, M., Zhu, Q.Z., Frey, S., Sengl, M., Buchberger, W., Niessner, R., Knopp, D. *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 3422.

⁹⁴ Rubio, F., Veldhuis, L.J., Clegg, B.S., Fleeker, J.R., Hall, J.C. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 691.

⁹⁵ Dalvie, M.A., Sinanovic, E., London, L., Cairncross, E., Solomon, A., Adam, H. *Environ. Res.* 98 (2004) 143.

⁹⁶ Adams, C., Jiang, H., McGuire, M., Graziano, N., Roberson, A., Frey, M. *J. Am. Water Works Assoc.* 96 (2004) 126.

⁹⁷ Sanvicens, N., Pichon, V., Hennion, M.C., Marco, M.P. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 156.

⁹⁸ Nistor, C., Christensen, J., Ocio, N., Norgaard, L., Emmeus, J. *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 898.

inmunorreactivos adecuados, siendo quizá el factor más limitante para su empleo.

2.3.1. Obtención y características de anticuerpos

Los anticuerpos (también conocidos como inmunoglobulinas, Ig) son proteínas del tipo gamma globulina, producidas por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar sustancias extrañas potencialmente dañinas que puedan ser una amenaza para el organismo. Estas sustancias extrañas se denominan antígenos.

Las inmunoglobulinas están formadas por varias cadenas polipeptídicas; su masa molecular oscila entre 150-900 kDa, con un contenido en hidratos de carbono del 2 al 15%, y un punto isoeléctrico (pI) comprendido entre 4,4 y 9,5. En su forma soluble, se encuentran fundamentalmente en el suero sanguíneo, pero también están presentes en otros fluidos corporales, tejidos y células, como lágrimas, saliva, intestino, leche, huevos, etc.

Típicamente están constituidos por unidades estructurales básicas, cada una de ellas con dos grandes cadenas pesadas y dos cadenas ligeras de menor tamaño, que forman monómeros, dímeros o pentámeros. Existen diferentes tipos de cadenas pesadas de anticuerpo y distintos tipos de anticuerpos, que se agrupan en isotipos según el tipo de cadena pesada que poseen. En mamíferos placentados existen cinco isotipos de anticuerpos que desempeñan distintos papeles y contribuyen a dirigir la respuesta inmune adecuada para cada tipo de cuerpo extraño que encuentran. Se nombran

mediante el prefijo "Ig" que significa inmunoglobulina, y difieren en sus propiedades biológicas, localizaciones funcionales y capacidad para reconocer diferentes tipos de antígenos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. En mamíferos, las inmunoglobulinas G son las que se encuentran en mayor proporción (80% del total) y las más utilizadas en el análisis inmunoquímico⁹⁹.

La mayoría de anticuerpos, excepto los producidos por camélidos, tiburones y alguna otra especie animal, tienen una estructura básica similar formada por cuatro cadenas polipeptídicas, iguales dos a dos. En la figura 9 se esquematiza la estructura básica de un anticuerpo, en la que se diferencian dos cadenas proteicas pesadas y dos ligeras, unidas por puentes disulfuro.

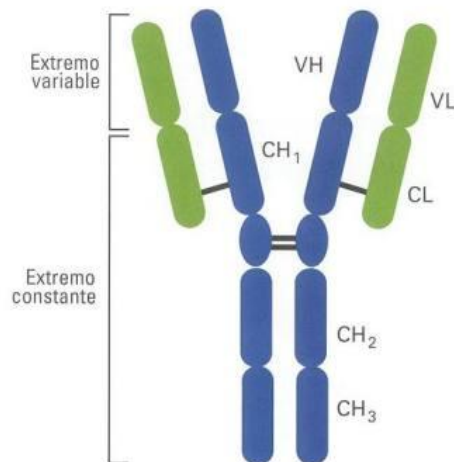


Figura 9. Estructura básica de una inmunoglobulina. Las cadenas pesadas (H) se representan en azul, las ligeras (L) en verde, y los enlaces disulfuro en negro.

⁹⁹ Market E., Papavasiliou F.N. V(D)J Recombination and the Evolution of the Adaptive Immune System. *PLoS Biol* 1(1): e16 Epub 2003

Toda molécula ajena a un determinado organismo se comporta frente a éste como un antígeno. Se pueden diferenciar dos características primordiales en un antígeno: por una parte la inmunogenicidad o capacidad que presenta una molécula para generar una respuesta inmune en un organismo dado y, por otra, la antigenicidad o particularidad del antígeno que hace que éste sea reconocido por un determinado anticuerpo. Ambas propiedades pueden o no estar presentes en un determinado antígeno.

Si el analito es macromolecular, con masa molecular del orden de 5.000 Da, la inyección directa del mismo es capaz de provocar la respuesta inmune. Sin embargo, las moléculas de pequeño tamaño son poco inmunogénicas y, por ello, se asocian a proteínas transportadoras de alto peso molecular o 'carriers' para provocar y hacer más reproducible la respuesta inmune (Figura 10).

En la terminología utilizada habitualmente, a los compuestos de baja masa molecular que se unen covalentemente a una sustancia transportadora (generalmente una proteína), se les denomina haptenos. Los conjugados hapteno-proteína utilizados para provocar la respuesta inmune son los inmunógenos.

La generación de anticuerpos para el reconocimiento de moléculas pequeñas requiere llevar a cabo las siguientes etapas:

1. Diseño de moléculas derivadas del analito que contengan un grupo funcional apropiado (hapteno) para su unión al transportador
2. Síntesis de haptenos
3. Conjugación covalente del hapteno al transportador
4. Purificación del inmunógeno

5. Inmunización del animal

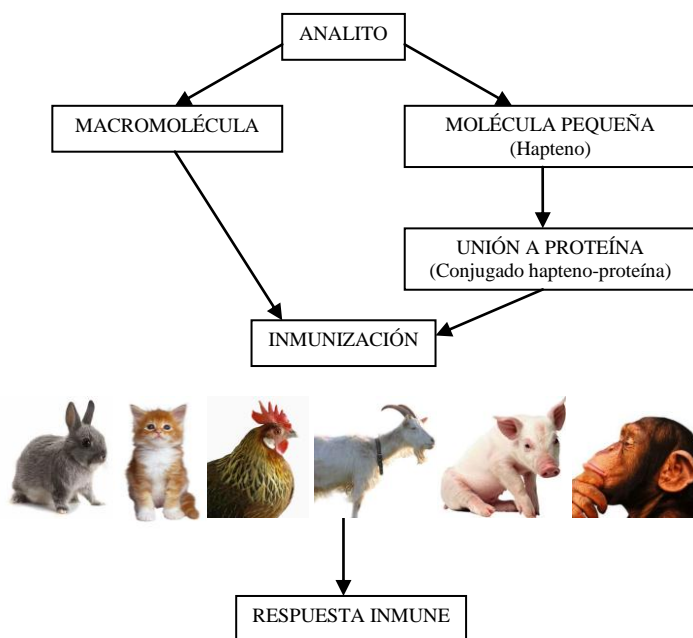


Figura 10. Esquema del proceso seguido para la obtención de anticuerpos

2.3.1.1 Desarrollo de haptenos

Los principios básicos para la obtención de haptenos han sido ampliamente descritos en la literatura^{100,101,102}. El hapteno ha de ser lo más similar posible al analito en estructura y geometría, distribución electrónica

¹⁰⁰ Rastrelli, L., Totaro, K., De Simone, F. *Food Chem.* 79 (2002) 303.

¹⁰¹ Russo, M.V., Campanella, L., Avino, P. *J. Chromatogr. B* 780 (2002) 431.

¹⁰² Liu, Y.H., Jin, M.J., Gui, W.J., Cheng, J.L., Guo, Y.R., Zhu, G.N. *Anal. Chim. Acta* 591 (2007) 173.

y capacidad de establecer puentes de hidrógeno, así como en sus propiedades hidrofóbicas¹⁰³.

Los brazos espaciadores presentan en su estructura una cadena carbonada y, a lo largo de ella, grupos funcionales útiles (como por ejemplo –COOH, –OH, –NH₂ y –SH) para la unión covalente con otras moléculas, en nuestro caso la proteína transportadora. Las moléculas pequeñas requieren la utilización de un brazo espaciador para favorecer la exposición del hapteno al sistema inmunitario. Este brazo debe estar posicionado lo más lejos posible de los sitios de reconocimiento del hapteno. Está generalmente aceptado que la longitud del brazo espaciador es un factor importante en la producción de anticuerpos con alta afinidad por el analito, y que la sensibilidad del inmunoensayo mejora al aumentar la longitud del mismo^{104,105}.

Así, un brazo espaciador largo puede evitar el enmascaramiento del hapteno por la proteína, pero si es demasiado largo puede conducir al plegamiento del hapteno y reducir su exposición al sistema inmunitario^{106,106}. Sin embargo, los resultados experimentales que soportan estas hipótesis son limitados y contradictorios. En algunos estudios, los haptenos con brazo espaciador de tamaño medio (3-6 átomos) dieron lugar a los ensayos más sensibles, comparados con aquellos que utilizaban un brazo

¹⁰³ Rastrelli, L., Totaro, K., De Simone, F. *Food Chem.* 79 (2002) 303.

¹⁰⁴ Marco, M.P., Gee, S., Hammock, B.D. *Trends Anal. Chem.* 14 (1995) 415.

¹⁰⁵ Szurdoki, F., Bekheit, H.K.M., Marco, M.P., Goodrow, M.H., Hammock, B.D., En: *New Frontiers in Agricultural Immunoassays*. D.A. Kurtz, J.H. Skerritt, L. Stanker (Eds.). AOAC, Arlington, VA, 1995, 39.

¹⁰⁶ Marco, M.P., Gee, S., Hammock, B.D. *Trends Anal. Chem.* 14 (1995) 415.

espaciador más corto^{107,108}, mientras que en otros ensayos se obtuvieron resultados contrarios^{109,110}.

Así, y para cada tipo de compuesto, deben sintetizarse moléculas que, manteniendo la estructura base, estén funcionalizadas para su unión directa a proteínas transportadoras (inmunógenos) o a los marcadores correspondientes (trazadores), con el fin de obtener los reactivos necesarios para efectuar los inmunoensayos.

Las proteínas más frecuentemente utilizadas como transportadoras en el ámbito agroalimentario y medioambiental son: seroalbúmina bovina (BSA), seroalbúmina humana (HSA), ovoalbúmina (OVA), hemocianina del molusco *Megathura crenulata* (KLH) o IgGs de diferentes especies. Los criterios de selección de una proteína u otra se basan en su poder inmunizante (cantidad de determinantes antigénicos), solubilidad y facilidad de conjugación.

La obtención de anticuerpos policlonales y monoclonales requiere inmunizar animales, siendo ratón, rata, conejo, cabra y gallina los más empleados. El proceso de inmunización consiste en inyectar reiteradamente al animal el inmunógeno, en dosis adecuada, junto con un adyuvante para conseguir una buena respuesta inmune¹¹¹.

Existen numerosos protocolos de inmunización, con una duración variable, aunque una fase de inmunización primaria suele durar de 1 a 3

¹⁰⁷ Guefuen, F., Boisdé, F., Queffelec, A.L., Haelters, J.P., Thouvenot, D., Corbel, B., Nodet, P. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 4492.

¹⁰⁸ Abad, A., Primo, J., Montoya, A. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 1486.

¹⁰⁹ Moreno, M.J., Abad, A., Montoya, A. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 72.

¹¹⁰ Manclús, J.J., Primo, J., Montoya, A.J. *J. Agric. Food Chem.* 40 (1996) 4052.

¹¹¹ Song, C. S., Yu, J. H., Bai, D. H., Hester, P. Y., Kim, K. H. *J. Immunol.* 135 (1985) 3354.

meses con inyecciones cada 15 días. El proceso completo puede durar de 3 a 6 meses.

Cuando un animal se inmuniza con un antígeno, se provoca una respuesta inmune. El suero de un animal inmunizado se ha producido por la acción de numerosos clones de linfocitos B; por ello, este tipo de respuesta se ha denominado policlonal, y al suero del animal, que contiene una mezcla de anticuerpos frente a un inmunógeno, antisuero policlonal.

Un antisuero policlonal es una mezcla heterogénea de anticuerpos de diferentes clases en proporciones arbitrarias, y con distintas afinidades y selectividades hacia el analito para el que se ha obtenido. La producción de anticuerpos policlonales (PAbs) es sencilla, y no requiere equipamiento sofisticado o productos especiales. Su principal inconveniente radica en la diferente respuesta entre animales.

Los anticuerpos monoclonales (MAbs) se producen *in vitro*, y son la consecuencia de la actividad de síntesis de un único clon celular de linfocitos B que se ha aislado y se mantiene en cultivo en el laboratorio. Así pues, los MAbs son una mezcla homogénea de inmunoglobulinas generadas por un grupo de células genéticamente idénticas (clon), de modo que todas tienen exactamente las mismas propiedades.

Las principales propiedades de los anticuerpos -tanto policlonales como monoclonales- se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Principales características de los anticuerpos monoclonales y policlonales

<i>Policlonales</i>	<i>Monoclonales</i>
Mezcla heterogénea de IGs	Mezcla homogénea IGs
Suministro limitado	Suministro ilimitado
Propiedades variables	Propiedades idénticas
Bajos costes de producción	Altos costes de producción
Obtención en 3 meses	Obtención en 6 meses

2.3.2. Tipos de inmunoensayos

Dada la amplitud del concepto de inmunoensayo, el número de posibles configuraciones que puede adoptar un inmunoanálisis es enorme, hasta el punto de que su clasificación y terminología puede llegar a ser confusa¹¹².

Basándonos en conceptos generales, los inmunoensayos se pueden clasificar atendiendo a distintos factores (Tabla 4).

Según el desarrollo de la interacción antígeno-anticuerpo, pueden ser homogéneos o heterogéneos. Los inmunoensayos **homogéneos** se desarrollan en una sola fase y no requieren la separación física entre el analito y el resto de componentes de la matriz, de ahí que sean más rápidos y más fáciles de llevar a cabo que los inmunoensayos heterogéneos (Figura 11). Las técnicas homogéneas generalmente se han aplicado a la medición de pequeños analitos como, por ejemplo, drogas de abuso y terapéuticas.

¹¹² Gosling, J.P. *Clin. Chem.* 36 (1990) 1408.

Tabla 4. Clasificación de distintos tipos de inmunoensayos

Separación Ab libre y enlazado	Sí	Heterogéneo
	No	Homogéneo
Reactivo limitante	Sí	Competitivo Desplazamiento
	No	No competitivo
Especie inmovilizada	Ab	Directo
	Conjugado hapteno-proteína	Indirecto
Marcador	Enzima	EIA
	Isótopo radiactivo	RIA
	Fluoróforo o luminiscente	FIA

Los inmunoensayos **heterogéneos** requieren la separación del analito del resto de la matriz, ya que la interacción tiene lugar en la interfase entre un soporte sólido y una disolución. Como soporte puede emplearse vidrio, silicio y materiales plásticos (PMMA, PS, etc.), en diferentes presentaciones (placas, láminas, membranas, partículas, tubos, etc.). De todos ellos, las placas de poliestireno de 96 pocillos (placa ELISA) son las más empleadas. Debido a que la absorción directa de un antígeno de masa molecular reducida en la superficie de las placas de poliestireno es difícil, la inmovilización (tapizado) se lleva a cabo utilizando un conjugado proteína-hapteno similar al utilizado para la inmunización, el cual se adsorbe en la superficie sólida. Con el fin de disminuir las interacciones inespecíficas, el conjugado de tapizado debe usar una proteína y un agente de unión diferente al empleado en la síntesis del inmunógeno (por ejemplo, BSA para el inmunógeno y OVA para el tapizado). En la Tabla 5 se muestra una comparación entre ambos tipos de ensayos.

Tabla 5. Comparación entre las características de los inmunoensayos homogéneos y heterogéneos

<i>Homogéneo</i>	<i>Heterogéneo</i>
Más precisos	Menos interferencias, más específicos y sensibles
Más costosos en cantidad de reactivos	Instrumentación menos costosa
Menos utilizados, en muchos casos se aplica sólo a ciertos tipos de analitos (p. ej. drogas de abuso, fármacos)	Muy utilizados
Más rápidos	Tiempo de análisis mayor
Más sencillos	Incluyen una etapa de separación del analito del resto de la matriz
Admiten menor tamaño de muestra	Admiten mayor tamaño de muestra

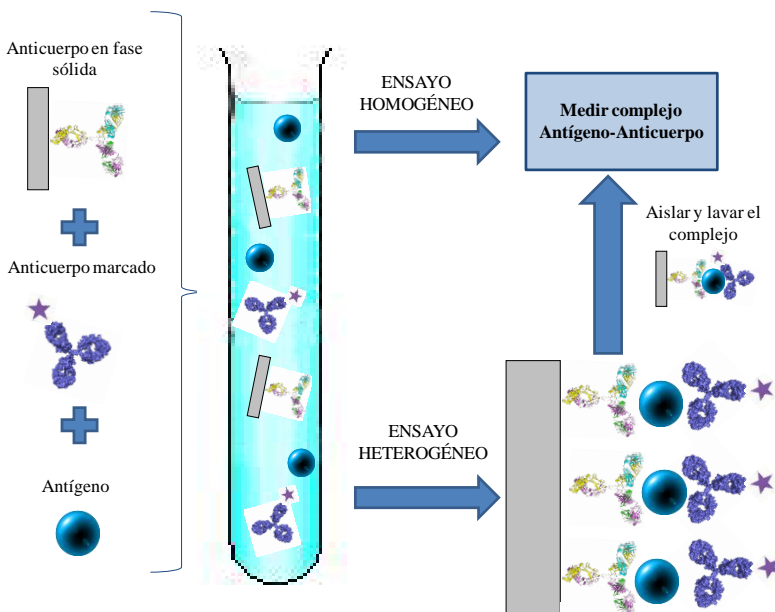


Figura 11. Esquema de inmunoensayos homogéneos y heterogéneos

En función del diseño, los inmunoensayos pueden ser de reactivo limitado o competitivos, en un solo paso o en dos pasos, por desplazamiento, o bien de reactivo en exceso o no competitivos (ensayos inmunométricos).

Los inmunoensayos **no competitivos** se basan en la medida de los sitios ocupados al usar un exceso de anticuerpo. Los anticuerpos no marcados se inmovilizan, para facilitar la separación de la fracción ligada, mientras que los anticuerpos marcados se añaden al medio. Esta configuración sólo puede utilizarse cuando el analito de interés posee al menos dos sitios de unión y, por tanto, no es apropiado para moléculas de baja masa molecular. Generalmente, los formatos no competitivos proporcionan el nivel más alto de sensibilidad y especificidad del ensayo, y se aplican a la medición de analitos como los marcadores cardíacos y de hepatitis. Este formato se denomina ensayo “sándwich”, ya que el analito está emparedado entre dos anticuerpos específicos (Figura 12).

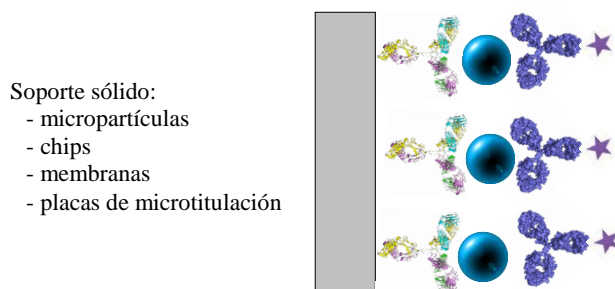


Figura 12. Esquema de un inmunoensayo sándwich

En los inmunoensayos **competitivos** en un solo paso (Figura 13) se utiliza el marcaje del antígeno, pero se suministra una cantidad limitante de anticuerpos. Así, el antígeno marcado (Ag^*) compite con el antígeno sin marcar (Ag) por los anticuerpos (Ab). La cantidad de analito se determina a partir de la regresión correspondiente.

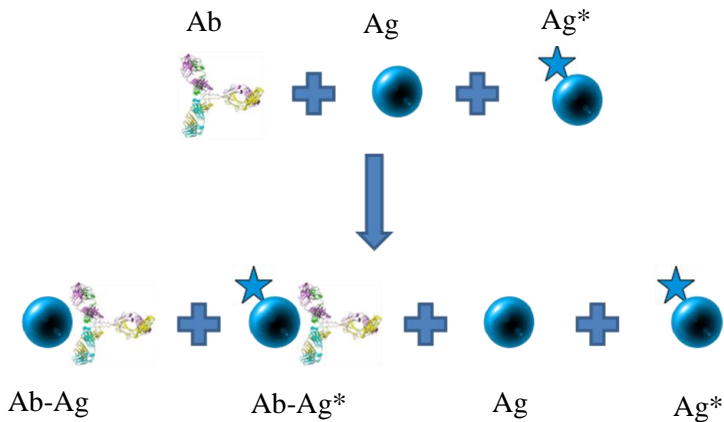


Figura 13. Esquema de un inmunoensayo competitivo de una sola etapa

Se denomina inmunoensayo competitivo en dos etapas cuando el anticuerpo en exceso se incuba con el antígeno de interés (reactivo limitante) y después se añade el antígeno marcado, que se une al anticuerpo libre (Figura 14).

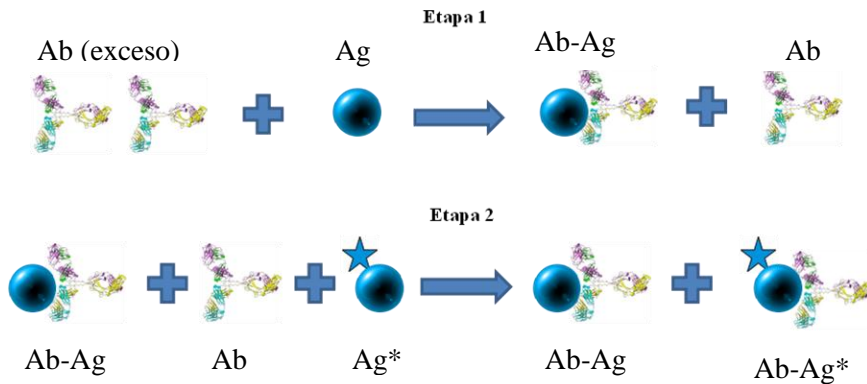


Figura 14. Esquema de un inmunoensayo competitivo en dos etapas

Los formatos de ensayos competitivos en dos etapas proporcionan una mejor sensibilidad, en comparación con los formatos de ensayo de una sola etapa.

También pueden realizarse inmunoensayos por desplazamiento - cuando el antígeno marcado se incuba con el anticuerpo (reactivo limitante) y después se añade el antígeno libre, que desplaza al antígeno marcado del complejo.

Según el desarrollo del formato competitivo, los inmunoensayos pueden ser **directos** (Figura 15A) -cuando el analito y un hapteno marcado de estructura similar se encuentran en disolución y compiten por unirse al anticuerpo, que se encuentra inmovilizado en un soporte sólido-, o **indirectos** (Figura 15B) -cuando el conjugado hapteno-proteína se encuentra inmovilizado, y se añade a la disolución el analito y el anticuerpo-

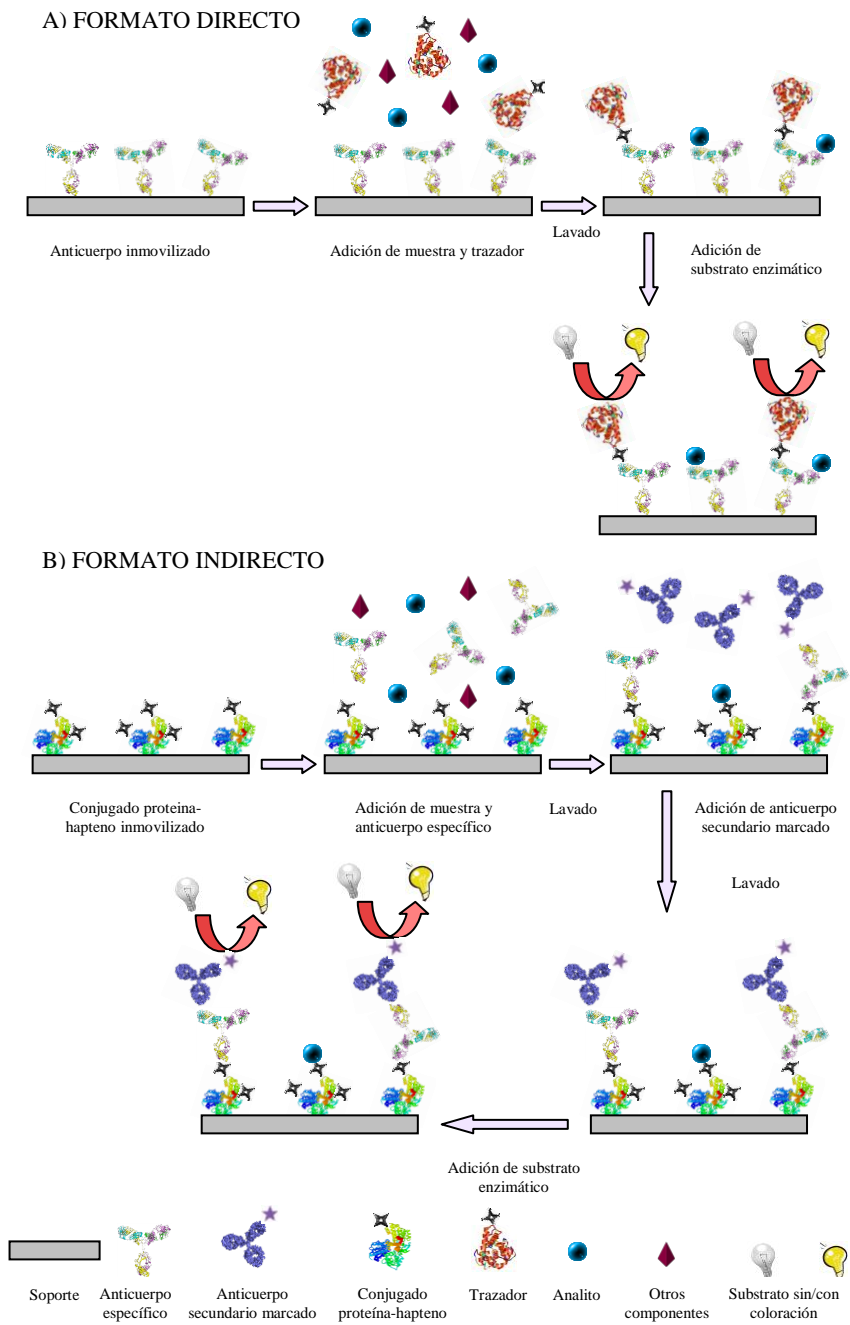


Figura 15. Esquema de inmunoensayo heterogéneo competitivo en formato directo (A) e indirecto (B).

Según el tipo de marcaje se denominan **inmunoensayos enzimáticos** (EIAs) cuando utilizan un enzima (fosfatasa alcalina, peroxidasa del rábano picante (HRP), β -galactosidasa, ureasa, etc.); **radioinmunoensayos** (RIAs), si se utilizan radioisótopos que requieren medidas radioquímicas, como por ejemplo ^{125}I , ^3H , ^{32}P , ^{57}Co o ^{14}C ; e **inmunoensayos luminiscentes**, si el marcador es un fluoróforo, por ejemplo fluoresceína, umbeliferonas, rodamina o quelatos de tierras raras, o una molécula quimioluminiscente (como luminol y sus derivados)¹¹³. Como se ha comentado anteriormente, el inmunoensayo enzimático en fase heterogénea (**ELISA**) ha sido el más utilizado para la realización de diversos tipos de análisis^{114,115}.

En los inmunoensayos competitivos, la cuantificación se lleva a cabo mediante una curva patrón del analito de interés¹¹⁶. Las curvas de calibrado dosis-respuesta están basadas en la representación de las medidas de absorbancia frente al logaritmo de la concentración de analito; son curvas sigmoidales, presentando una zona lineal próxima a la IC_{50} (concentración que provoca un 50% de la disminución de la señal respecto al blanco)¹¹⁶. Otros puntos importantes de la curva son el límite de detección (LD, concentración de analito que origina una disminución de la señal respecto al blanco del 10%) y el de cuantificación (LC, concentración del analito a partir de la cual es fiable realizar determinaciones cuantitativas y que corresponde con la concentración que produce una señal respecto al blanco del 80%). Los límites de detección y cuantificación de los ensayos más

¹¹³ Stead, D.A. *J. Chromatogr. B* 747 (2000) 69.

¹¹⁴ Shelver, W.L., Kamp, L.M., Church, J.L., Rubio, F.M. *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 3758.

¹¹⁵ Ballesteros, B., Barceló, D., Dankwardt, A., Schneider, P., Marco, M.P. *Anal. Chim. Acta* 475 (2003) 105.

¹¹⁶ Diamandis, E.P., Christopoulos, T.K., *Immunoassay*, Academic Press, San Diego, 1996, 57.

mL⁻¹, en función del MAb utilizado. Los inmunoensayos fueron evaluados en la determinación de muestras de hígado de cerdo dopadas con STZ, obteniéndose una buena correlación.

Asimismo, se han desarrollado ensayos que utilizan MAbs para la determinación específica de SMX. En el estudio llevado a cabo por Shen *et al.*¹¹⁹, el SMX fue diazotizado y acoplado a albúmina humana con el fin de llevar a cabo la inmunización animal. Los hibridomas anti-SMX fueron preparados mediante fusión celular, utilizando el método ELISA para encontrar hibridomas positivos. Así, se obtuvo un MAb capaz de detectar SMX con una IC₅₀ de 0,82 ng mL⁻¹, de manera específica, ya que no se observó reactividad cruzada con compuestos análogos al SMX.

Para desarrollar un inmunoensayo genérico frente a sulfonamidas utilizando MAbs, Muldoon *et al.*¹²⁰ emplearon como inmunógeno el ácido N-sulfanil-4-aminobenzoico conjugado a una proteína. La mayoría de los anticuerpos generados por los ratones inmunizados no mostró reconocimiento del fármaco libre. Sin embargo, al realizar un *screening* de un gran número de hibridomas, se aislaron líneas celulares (sucesivas generaciones de células procedentes de una o unas células iniciales) capaces de producir anticuerpos que reconocieran al analito libre. Dicho MAb mostró capacidad de reconocimiento de 8 sulfonamidas a niveles inferiores a 10 µg mL⁻¹ (valores de IC₅₀).

¹¹⁹ Shen, W., Wu, G.-J., Li, H.-R., Guo, Z.-Q., Cui, S. *Food Agric. Immunol.* 16 (2005) 273.

¹²⁰ Muldoon, M.T., Font, I.A., Beier, R.C., Holtzapple, C.K., Young, C.R., Stanker, L.H. *Food Agric. Immunol.* 11 (1999) 117

Por otro lado, Haasnoot *et al.*¹²¹ utilizaron el grupo amino aromático, común a todas las sulfonamidas, para unir distintas proteínas (BSA, KLH y HRP) y obtener PAbs. Los ELISAs competitivos, en formato directo, desarrollados con estos PAbs y los correspondientes conjugados HRP, mostraron alta sensibilidad ($IC_{50} = 0,2 - 8,0 \text{ ng mL}^{-1}$) y especificidad. Los ELISAs competitivos en formato indirecto mostraron reconocimiento de varias sulfonamidas. Los PAbs provenientes de ratones inmunizados con TS-BSA (TS: N^1 -[4-(carboximetil)-2-tiazolil]sulfanilamida) reconocieron a las sulfonamidas que contienen grupos tiazolil, tiadiazolil, piridazinil e isoxazil; mientras que los PABs obtenidos de ratones inmunizados con PS-KLH (PS: N^1 -[4-metil-5-[2-(4-carboxietil-1-hidroxifenil)]-azo-2-piridil]sulfanilamida) reconocieron a sulfonamidas con grupos pirimidinil, piridazinil, quinoxalinil y piridinil.

A continuación, se llevó a cabo la producción de MAbs utilizando un ratón inmunizado con TS-BSA. Con los mejores MAbs se desarrolló un ELISA competitivo en formato indirecto, capaz de reconocer ocho sulfonamidas con valores de IC_{50} entre 0,3 y 40 ng mL^{-1} .

El equipo de Cliquet¹²² utilizó como conjugados distintos compuestos que mantenían inalterada la parte común de las sulfonamidas. Así, tres derivados de sulfonamidas (S, TS y PS, previamente descritos en la literatura) conteniendo un grupo carboxilo en su cadena lateral, fueron unidos a proteínas mediante reacción con carbodiimida, consiguiendo reconocimiento genérico al utilizar los conjugados PS- y TS-. Los

¹²¹ Haasnoot, W., Cazemier, G., Du Pre, J., Kemmers-Voncken, A., Bienenmann-Ploun, M., Verheijen, R. *Food Agric. Immunol.* 12 (2000) 15.

¹²² Cliquet, P., Cox, E., Haasnoot, W., Schacht, E., Goddeeris, B.M. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 5835.

conjugados PS- mostraron reconocimiento de cuatro sulfonamidas (sulfametazina, sulfamerazina, sulfadiazina y sulfadimetoxina), que no fueron reconocidos por los anticuerpos obtenidos tras la inmunización con el conjugado TS-. Con el mejor MAb, se pusieron a punto dos ELISAs competitivos: uno tapizado con antígeno y otro con el MAb, capaces de reconocer cinco sulfonamidas, con valores de IC_{50} entre 9 y 100 $ng\ mL^{-1}$.

En el caso de inmunoensayos para tetraciclinas, Peng *et al.*¹²³ desarrollaron un ELISA capaz de detectar TC con un IC_{50} de 0,293 $ng\ mL^{-1}$ utilizando MAb, aunque presentando una reactividad cruzada del 60% con CTC. Otro ejemplo reciente es el trabajo realizado por Le *et al.*¹²⁴, que obtuvieron un valor de IC_{50} de 0,66 $ng\ mL^{-1}$ para CTC, empleando un MAb obtenido tras la inmunización con conjugado CTC-BSA.

3. Microinmunoanálisis sobre discos compactos (CDs)

3.1 Microarrays

Los primeros analizadores automáticos fueron introducidos en los laboratorios hace aproximadamente 40 años¹²⁵ y, desde entonces, se han producido grandes avances en la miniaturización y automatización de

¹²³ Peng, W.-J., Guo, Z.-B., Liu, J. *Food Science* 32 (2011) 333.

¹²⁴ Le, T., Yi, S.H., Zhao, Z.W., Wei, W., *Food Additives & Contaminants* 28 (2011) 1516.

¹²⁵ Alpert, N.L, *Clin. Chem.* 15 (1969) 1198.

métodos analíticos^{126,127}. Uno de los ejemplos más prominentes es el que incorpora la tecnología de *microarrays* (micromatrices) que, actualmente, es una herramienta muy popular, y presenta numerosas aplicaciones en genómica, proteómica, diseño de fármacos, agroalimentaria y en ciencias de la vida^{128,129,130}.

Podríamos decir que la técnica de micromatrices permite depositar miles de puntos sobre un portaobjetos para su estudio en paralelo. Así, un *microarray* consiste en una matriz bidimensional de depósitos (generalmente biomoléculas) ordenados sobre un substrato sólido, en posiciones determinadas¹³¹. Se trata de un sistema de análisis masivo que ofrece una superficie de reacción generalmente plana, mejorando las etapas de lavado e incubación, a la vez que proporciona una mayor densidad de muestra¹³²; ello permite ensayar en un solo experimento miles de muestras o diferentes sustancias en una misma muestra¹³³ (Figura 17).

Este concepto es muy interesante cuando se quieren llevar a cabo cientos de ensayos de manera rápida y económica, reduciendo la cantidad de reactivos utilizados y aumentando extraordinariamente la capacidad de trabajo.

¹²⁶ Kricka, L.J., Wilding, P., En: *Handbook of Clinical Automation, Robotics and Optimization*. G.J. Kost, J. Welsh, M. Kost (Eds.). Wiley, New York, 1996, 45.

¹²⁷ Van den Berg, A., Berveld, P., Micro Total Analysis Systems Proceedings of the μ TAS'94 Workshop held at MESA Research Institute, 21-22 November 1994, university of Twente, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, Dordecht, 1995.

¹²⁸ Lamartine, J. *Mater. Sci. Eng.*, 26 (2006) 354.

¹²⁹ Scarselli, M., Giulani, M. M, Adu-Bobie, J., Pizza, M., Rappuoli, R. *Trends Biotech.* 23 (2005) 84.

¹³⁰ Hoeben, A., Landuyt, B., Botrus, G., de Boeck, G., Guetens, G., Highly, M., van Oosterom, A. T., de Bruijn, E. A. *Anal. Chim. Acta*, 564 (2006) 19.

¹³¹ López, M., Mallorquín, P., Vega, M. *Microarrays y biochips de ADN*, Informe de Vigilancia Tecnológica, Genoma España-CIBT-FGUAM, 2002.

¹³² Uttamchandani, M., Wang, J., Yao, S.Q. *Mol. BioSyst.* 2 (2006) 58.

¹³³ Cigudosa, J. C. *An. Sist. Sanit. Navar.* 27 (2004) 11.

Inicialmente, los *microarrays* se utilizaron para la miniaturización de ensayos de ADN en chips, pero la diversidad en el desarrollo de técnicas de inmovilización llevadas a cabo para diferentes sondas ha permitido que hoy en día se pueda inmovilizar casi cualquier tipo de sustancia, como es el caso de moléculas pequeñas¹³⁴, proteínas¹³⁵, receptores celulares¹³⁶, hidratos de carbono¹³⁷ y péptidos¹³⁸, así como materiales más complejos como tejidos¹³⁹ e incluso células¹⁴⁰.



Figura 17. Imagen de diversos *microarrays*

¹³⁴ MacBeath, G., Koehler, A.N., Schreiber, S.L. *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 7967.

¹³⁵ MacBeath, G., Scheriber, S.L., *Science* 289 (2000) 1760.

¹³⁶ Fang, Y., Frutos, A.G., Lahiri, J. *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 2394.

¹³⁷ Ko, K.S., Jaipuri, F.A., Pohl, N.L. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 13162.

¹³⁸ Min, D.H., Mrksich, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8 (2004) 554.

¹³⁹ Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Barlund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhost, J., Mihatsch, M.J., Sauter, G., Kallioniemi, O.P. *Nat. Med.* 4 (1998) 844.

¹⁴⁰ Ziauddin, J., Sabatini, D.M. *Nature* 411 (2001) 107.

3.2 Tipos de soporte

El soporte y el tipo de unión para la inmovilización del reactivo están íntimamente relacionados, ya que la metodología y el modo de anclaje dependen de las características de la superficie sobre la cual se van a realizar los ensayos. Se pueden distinguir dos grandes grupos: soportes porosos y no porosos.

Los chips **porosos** están formados por materiales con una superficie activa en los que las interacciones entre el material a inmovilizar y el soporte no tienen, por lo general, carácter covalente¹⁴¹. Los soportes más comúnmente empleados son geles y membranas porosas de nylon o nitrocelulosa, dispuestos sobre portaobjetos de cristal. Aunque el uso de materiales porosos presenta la ventaja de ofrecer mayor superficie activa que los soportes no porosos, las membranas han sido sustituidas en la mayoría de los casos por sustratos que proporcionan una mayor resolución de los puntos¹⁴². Un modo muy común de operar es el que se basa en el confinamiento de los inmunorreactivos en un gel, en el que se retienen por interacciones débiles o por *cross-linking*. Así, se pueden emplear distintos geles en función de la especie a inmovilizar, como, por ejemplo, geles de agarosa o poliméricos, derivatizados con distintos grupos que permitan la inmovilización covalente y orientada.

En los materiales **no porosos**, los inmunorreactivos se encuentran, por lo general, inmovilizados covalentemente a la superficie sólida que les

¹⁴¹ Hoheisel, J.D., Diehl, F., Scheideler, M., Hauser, N., Aign, V., Matysiak, S., Beier, M. Improving DNA-chip Technology. Chemical Aspects (2001).

¹⁴² López, M., Mallorquín, P., Vega, M. Microarrays y Biochips de ADN, Informe de Vigilancia Tecnológica. GENOMA ESPAÑA / CIBT-FGUAM (2002).

sirve de soporte, y que puede ser vidrio, silicio, carbono, materiales mixtos (composites), metales o plásticos. Este tipo de soportes son inertes y presentan una serie de ventajas frente a los porosos: mínimo volumen de hibridación, gran capacidad de miniaturización y alta resolución¹⁴³. Los primeros microchips utilizaban vidrio como soporte debido a su alta disponibilidad, baja fluorescencia de fondo, transparencia, resistencia térmica, y a la variedad de vías de inmovilización posibles¹⁴⁴. Posteriormente se desarrollaron los chips de silicio, que combinan sofisticadas técnicas de inmovilización litográfica (utilizadas en la industria de fabricación de semiconductores), con la síntesis *in situ* de oligonucleótidos. En general, estos chips tienen un tamaño aproximado de 1,5 x 1,5 cm y unos pocos milímetros de espesor, alcanzando una densidad entre 10.000 y 100.000 puntos/cm²^{145,146,147}. Otra forma de fabricar *arrays* es mediante la impresión robótica de alta velocidad sobre portaobjetos de vidrio. Esta es una alternativa menos costosa y más práctica que la fotolitografía, ya que utiliza puntas capilares para la deposición de los reactivos. La densidad alcanzada con este procedimiento varía entre 100 y 2.500 puntos/cm²¹⁴⁸.

¹⁴³ López, M., Mallorquín, P., Vega, M., Microarrays y Biochips de ADN, Informe de Vigilancia Tecnológica. GENOMA ESPAÑA / CIBT-FGUAM (2002).

¹⁴⁴ MacBeath, G., Koehler, A. N., Schreiber, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 7967.

¹⁴⁵ Rozsnyai, L.F., Benson, D.R., Fodor, S.P.A., Schultz, P.G. *Angew. Chem. Int. Ed.* 31 (1992) 759.

¹⁴⁶ Homes, C.P., Adams, C.L., Fodor, S.P.A., Yu-Yang, P., "Perspectives in medicinal chemistry". En: *Helvetica Chim. Acta*. B. Testa, E. Kyburz, W. Fuhrer, R. Giger (Eds.), John Wiley and Sons Inc., Basel, Switzerland, 1993, 489.

¹⁴⁷ Colmes, C.P., Fodor, S.P.A., Innovation and perspectives in solid phase synthesis: peptides, proteins and nucleic acids, biological and biomedical applications, en: Epton, R., (Ed.), collected papers 3rd International Symposium, Mayflower Worldwide Ltd., Birmingham, UK, 1994, 221.

¹⁴⁸ Schena, M., Salón, D., Davis, R.W., Brown, P.O. *Science* 270 (1995) 467.

Más recientemente, se han empleado materiales poliméricos sintéticos que ofrecen propiedades mecánicas y químicas atractivas, son más baratos, y su fabricación es más sencilla y flexible. Las aplicaciones analíticas que actualmente utilizan discos de plástico como soporte pueden dividirse en dos grupos: aquellas que utilizan la propulsión fluídica y las que utilizan la fuerza centrífuga.

Los chips con **plataformas microfluídicas** son dispositivos que permiten manejar cantidades muy pequeñas de líquidos, controlando en cada momento el flujo y el recorrido de la muestra en el chip. Estos sistemas permiten la reducción de costes en el análisis de muestras, ya que requieren cantidades muy pequeñas de reactivos y permiten llevar a cabo determinaciones en tiempos muy cortos. El rendimiento de muchas técnicas, como por ejemplo la técnica ELISA, puede mejorarse adaptándolas a este tipo de dispositivos.

Los sistemas *Lab-on-a-chip* o LOAC emplean las tecnologías de microfluídica y miniaturización, y tratan de integrar múltiples procesos, incluyendo el tratamiento de muestra, amplificación y detección, en una única plataforma microfluídica, presentando ventajas significativas en cuanto a velocidad, costes, ahorro de muestra y reactivos, eficiencia y automatización del análisis^{149,150,151}.

¹⁴⁹ Liu, Y., Rauch, C. B. *Anal. Biochem.* 317 (2003) 76.

¹⁵⁰ Liu, Y., Rauch, C. B., Stevens, R. L., Lenigk, R., Yang, J., Rhine, D. B., Grodzinski, P. *Anal. Chem.* 74 (2002) 3063.

¹⁵¹ Weston, D. F., Smekal, T., Rhine, D. B., Blackwell, J. J. *Vac. Sci. Technol.* 19 (2001) 2846.

Las plataformas microfluidicas se presentan en distintos formatos, tamaños y materiales (cristal, plástico, silicio o cuarzo)^{152,153}, pero todas tienen un diseño común consistente en canales y cámaras de dimensiones microscópicas donde tiene lugar el análisis de la muestra (Figura 18). Reactivos y muestras son introducidos en el LOAC y transportados de una sección a otra mientras se realiza el mezclado, la reacción y la monitorización¹⁵⁴.

El factor más crítico en el diseño de estos sistemas es la manipulación de los fluidos, con lo que la habilidad para transportarlos de un modo controlado es de gran importancia.

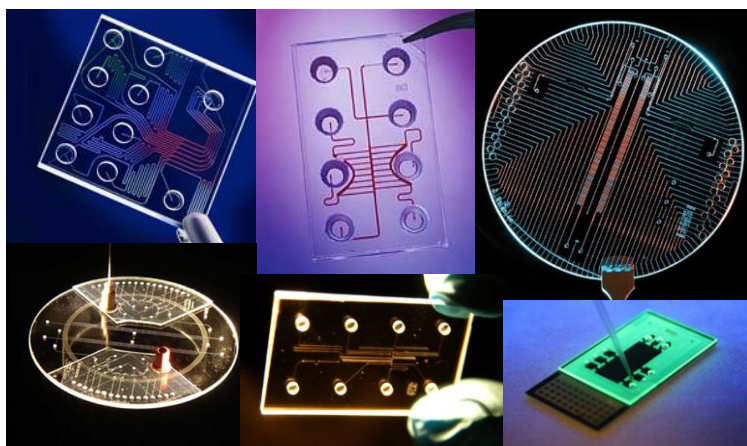


Figura 18. Imagen de diferentes dispositivos Lab-on-a-chip (LOAC)

¹⁵² Manz, A., Fettingner, J.C., Verpoorte, E., Ludi, H., Widmer, H.M., Harrison, D.J. *Trends Anal. Chem.* 10 (1991) 144.

¹⁵³ Shi, Y., Simpson, P.C., Scherer, J.R., Wexler, D., Skibola, C., Smith, M.T., Mathies, R.A. *Anal. Chem.* 71 (1999) 5354.

¹⁵⁴ Honda, N., Lindberg, U., Andersson, P., Hoffman, S., Takei, H. *Clin. Chem.* 51 (2005) 1955.

Los detectores más utilizados son los ópticos, densitómetros, fotómetros o fluorímetros, adaptados a la geometría del dispositivo, y los electroquímicos, aunque también se emplean otros modos de detección particulares^{155,156,157,158,159}.

Los discos de plástico que utilizan la **fuerza centrífuga** (Figura 19) son una alternativa muy interesante a los dispositivos LOAC. Dichos sistemas bombean los fluidos utilizando la fuerza centrífuga que se genera cuando el disco gira, eliminando así la necesidad de utilizar partes internas móviles o aplicar potenciales eléctricos como los que necesitan muchos sistemas LOAC. El control de la fuerza centrífuga es mucho más simple, ya que tan sólo depende de la viscosidad del fluido y de la velocidad de rotación del disco, con lo que se pueden manejar mayores cantidades de muestra. Estos discos están formados por numerosos canales que van desde el centro hasta el exterior del disco, de modo que se consigue la misma fuerza centrífuga en todos los canales, lo cual permite la realización de muchos análisis en paralelo¹⁶⁰. Estos equipos, comercializados desde hace muchos años, se han utilizado en química clínica y permiten efectuar diferentes operaciones, incluyendo la detección. Actualmente existen otras alternativas mucho más avanzadas que van desde equipos utilizados en

¹⁵⁵ Honda, N., Lindberg, U., Andersson, P., Hoffman, S., Takei, H. *Clin. Chem.* 51 (2005) 1955.

¹⁵⁶ Gustafsson, M., Hirschberg, D., Palmberg, C., Jörnvall, H., Bergman, T. *J. Anal. Chem.* 76 (2004) 345.

¹⁵⁷ Tecan (home page). Disponible via internet en: <http://www.tecan.com>

¹⁵⁸ Lai, S., Wang, S., Luo, J., Yang, S.-T., Madou, M., *J. Anal. Chem.* 76 (2004) 1832.

¹⁵⁹ Puckett, L., Dikici, e., Lai, S., Madou, M., Bachas, L.G., Daunert, S. *Anal. Chem.* 76 (2004) 7263.

¹⁶⁰ Felton, M.J. *Anal. Chem.* (2003) 302.

grandes laboratorios de hospitales, a tecnologías innovadoras basadas en sistemas microelectromecánicos (MEMs)¹⁶¹.

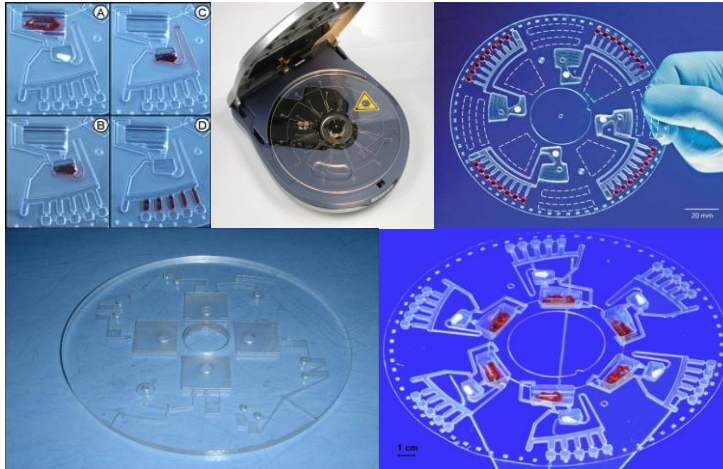


Figura 19. Discos de plástico que utilizan la fuerza centrífuga

3.2.1 Discos Compactos

Los Micro Sistemas Electro Mecánicos (MEMs) son dispositivos muy pequeños que, o bien crean una señal eléctrica debido al cambio de una propiedad física (sensores), o causan un efecto físico cuando son sometidos a una señal eléctrica (actuadores).

Entre las metodologías basadas en el uso de discos de plástico como soporte que emplean la fuerza centrífuga, están las caracterizadas por el uso de la tecnología de disco compacto de audio-video (CD) para la obtención

¹⁶¹ Madou, M., "From MEMS to Bio-MEMS and Bio-NEMS: Manufacturing Techniques and Applications". En: *Fundamentals of microfabrication and nanotechnology*. Taylor and Francis (Eds.), CRC Press, Irvine, CA, 2011

de resultados analíticos. Los CDs se han venido aplicando en el contexto bioanalítico desde hace algunos años¹⁶², ya que son un medio globalmente accesible, barato y fiable.

La utilización de la tecnología de disco compacto con fines analíticos presenta importantes ventajas, que pueden resumirse en:

- Gran área analítica ($\sim 94 \text{ cm}^2$) donde depositar miles de biomoléculas sonda.
- Resistencia a los impactos y estabilidad térmica.
- Fabricación a gran escala de productos de alta calidad a muy bajo precio.
- Uso de la fuerza centrífuga para manejar reactivos y muestras.
- Gran eficiencia en la adsorción de proteínas.
- Posibilidad de integrar tanto información numérica como bioquímica (identificando cada punto de cada matriz y almacenando los resultados del ensayo en la misma plataforma física en la que se desarrolla el análisis).
- Uso del lector/grabador de CDs como detector químico, lo que supone una ventaja en cuanto al bajo precio al que se comercializa, la robustez de su funcionamiento, su facilidad de uso y su ubicuidad.
- Presentación en varios tamaños utilizando diferentes formatos de disco: CD, DVD o Blu-ray.

¹⁶² Kido, H., Maquieira, A. Hammock, B.D., *Anal. Chim. Acta* 411 (2000) 1.

3.3 Tecnología de CDs

3.3.1 Estructura de los CDs

El diseño del CD fue originalmente concebido como una evolución del disco de vinilo antes que como un medio de almacenamiento de datos. Sólo más tarde surgió el concepto “archivo de audio” y su generalización a cualquier archivo de datos. Así, el disco compacto es un soporte digital óptico utilizado para almacenar cualquier tipo de información (audio, video, documentos...).

Tal y como se describe en el estándar industrial ISO 9660, los CDs convencionales están compuestos por un sustrato de policarbonato (PC) donde son estampados los datos, una capa metalizada reflectante de aluminio, oro, níquel, cobre, etc. que, como su propio nombre indica, refleja el haz láser enviándolo de vuelta al lector para que los datos puedan ser leídos, y un lacado (normalmente de polimetilmetacrilato de metilo, PMMA) que protege de la oxidación y del ambiente. Los CDs comerciales pueden presentar, además, una etiqueta como elemento de identificación y protección, o con fines comerciales (Figura 20)¹⁶³.

Los CDs grabables o regrabables (CD-R, CD-RW) presentan, además, una capa de colorante orgánico entre el sustrato de carbonato y la capa metálica (Figura 21).

¹⁶³ La Clair, J.J., Burkart, M.D. *Org. Biomol. Chem.* 1 (2003) 3244.

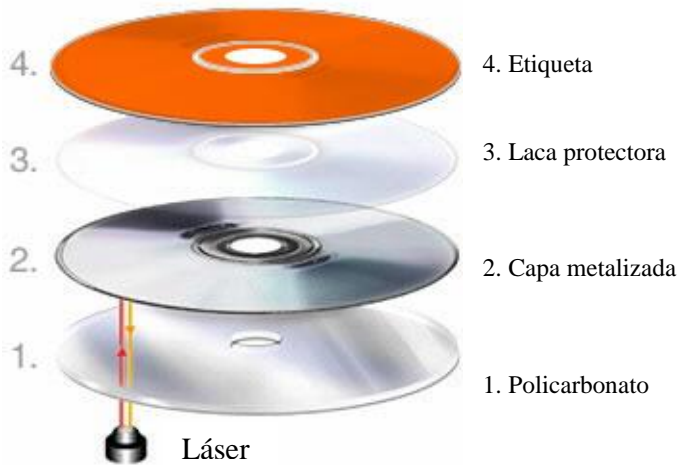


Figura 20. Capas de un CD¹⁶⁴

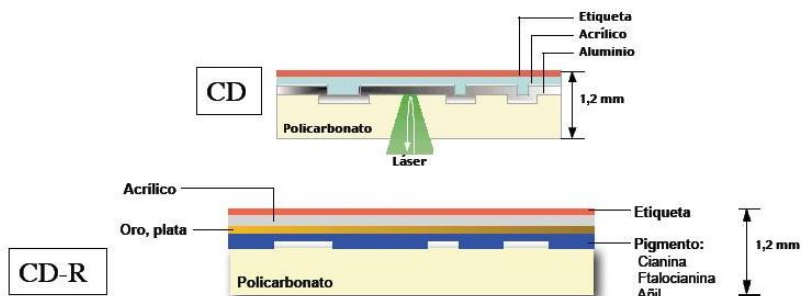


Figura 21. Estructura de un CD y un CD-R.

En un CD la información se almacena en formato digital, es decir, utiliza un sistema binario para guardar los datos. Estos datos se graban en una única espiral que comienza desde el interior del disco (próximo al

¹⁶⁴ <http://rubberdisc.com/faq-how-a-disc-works.html>

centro), y finaliza en la parte externa. Los datos binarios se almacenan en forma *pits* y *lands*. Los *pits* tienen un ancho de 0,5 micras, mientras que su altura (respecto a los *lands*) se reduce a 0,125 micras (Figuras 22 A y B). La longitud de los *pits* y los *lands* oscila entre 0,9 y 3,3 micras. Entre una revolución de la espiral y las adyacentes hay una distancia aproximada de 1,6 micras (lo que hace aproximadamente 45.000 pistas por cm)¹⁶⁵.

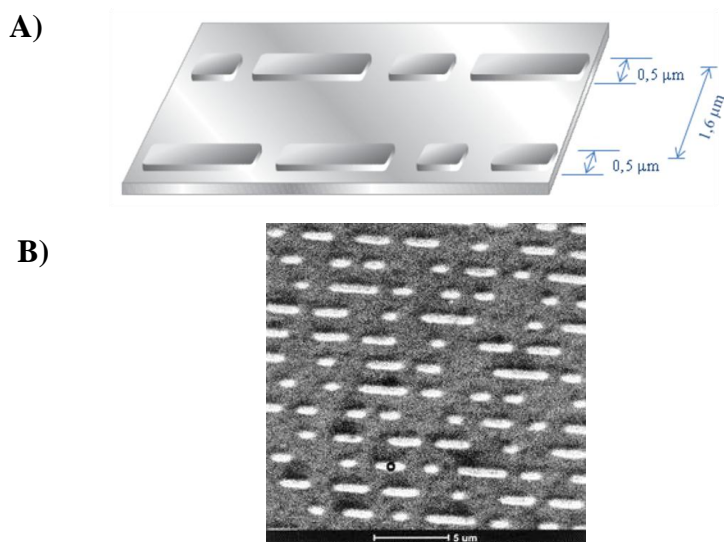


Figura 22. A) Representación de los *pits* y *lands* de un CD, B) Microfotografía de la superficie de un CD

3.3.2 Funcionamiento de un lector de CDs

Un lector de CDs tiene la misión de localizar y leer los datos almacenados como *pits* y *lands* en el disco. Considerando las dimensiones

¹⁶⁵ Tamarit-López, J., Morais, S., Puchades, R., Maquieira, A. *Anal. Chim. Acta* 609 (2008) 120.

extremadamente pequeñas de los *pits*, el lector es un dispositivo extremadamente preciso. En la Figura 23 (A y B) pueden apreciarse las distintas partes de un lector de CDs, que básicamente son:

- Motor de arrastre del disco, *Disc Drive Motor*. Este motor se controla de forma precisa para que gire entre 200 y 500 rpm en función de la pista que esté siendo leída¹⁶⁶.

- Ensamblaje del cabezal del láser, *Laser Pickup Assembly*. Sistema compuesto por un láser que emite a 780 nm (o 640 nm en el caso de discos DVD) y una lente que lo focaliza a fin de ajustar la distancia donde se encuentra la pista de datos. Lleva incorporado un sensor opto-electrónico que detecta la luz reflejada en la película metálica del disco.

- Mecanismo rastreador, *Tracking Mechanism*. Sistema compuesto por un motor que mueve el dispositivo láser a lo largo de un eje radial fijo, de modo que el haz de luz puede seguir la pista de datos en espiral mientras gira el disco. El sistema tiene una resolución de micrómetros.

Un CD se lee por la medida del cambio en la reflexión de un láser polarizado infrarrojo ($\lambda=780\text{nm}$). A medida que el haz barre el CD, se va generando una señal binaria por modulación de la reflexión de la luz (Figura 24).

¹⁶⁶ <http://electronics.howstuffworks.com/dvd6.htm>

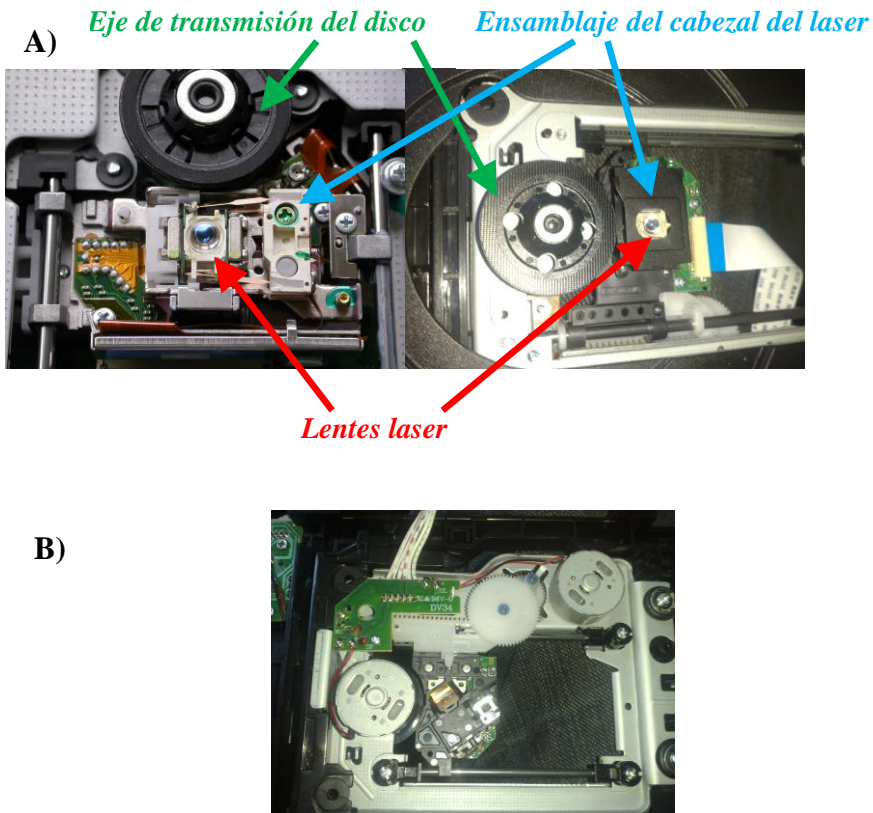


Figura 23. Vista de un lector de CDs. A) Detalle del “*pickup*”, B) Fondo del lector de CDs.

El haz láser atraviesa la capa de policarbonato, se refleja en el metal y alcanza el sensor opto-electrónico. Aunque el haz láser tiene una longitud de onda de 780 nm en el aire, en el PC se transforma en un haz de 503 nm, debido a los diferentes índices de refracción del aire (1,00) y del polímero (1,55). Precisamente, la profundidad de los *pits* con respecto a los *lands* (125 nm) está escogida para que se corresponda exactamente con la cuarta

parte de esta longitud de onda. El resultado es que la luz reflejada desde un *land*, al llegar al sensor recorre una distancia mayor que la reflejada desde un *pit*, siendo la diferencia exactamente $\lambda/2$. En las transiciones de *pit* a *land* se produce, por tanto, una interferencia destructiva, puesto que llegan dos haces desfasados justamente $\lambda/2$, de manera que se anulan el uno al otro (oscuridad). Esta característica permite leer la información almacenada en forma de sistema binario: una transición de *pit* a *land* y viceversa (interferencia destructiva) determina un 1 binario, mientras que la longitud de un *pit* o de un *land* indica el número consecutivo de 0 binarios.

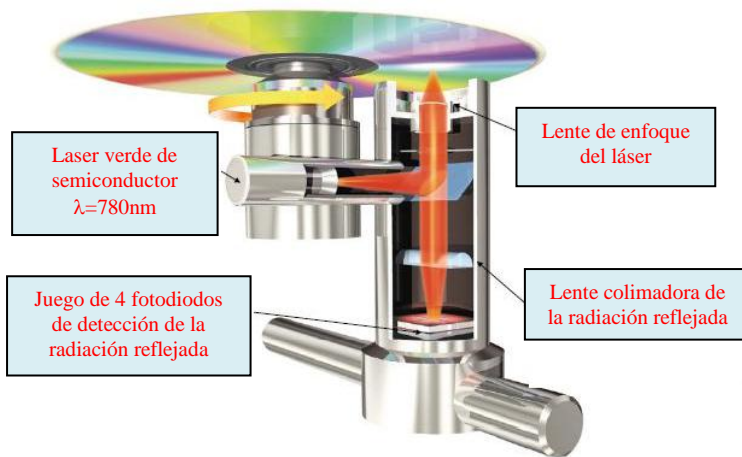


Figura 24. Sistema de lectura de un CD¹⁶⁷

En cuanto a la detección, el lector óptico incorpora un sofisticado conjunto de servo-sistemas que hace que el rayo láser enfoque con precisión

¹⁶⁷ http://www.osvic.com.ar/funcionamiento_de_los_sistemas_d.htm

la superficie y recorra las pistas a lo largo del CD cuando este gira. Un lector de CDs es un aparato electrónico de fabricación a gran escala y consumo masivo, lo que explica su bajo coste, con un precio de mercado que oscila entre los 50 y 300€. Esto los hace muy competitivos frente a la tecnología habitual de lectura de *microarrays* basada en la utilización de escáneres de fluorescencia (con una superficie de escaneo estándar de 18,75 cm²), cuyo coste se encuentra entre 30.000 y 100.000€. Además, el lector de CD proporciona mayor portabilidad y frecuencia de muestreo a tiempo real e *in situ*.

3.4 Antecedentes de los *microarrays* sobre CD

En un artículo pionero publicado en el año 2000, Kido *et al.*¹⁶⁸ trabajaron en la adsorción de anticuerpos en la cara de policarbonato de discos compactos convencionales, investigando así los principios de *microarrays* de inmunoensayos basados en CDs para el análisis cuantitativo de residuos de plaguicidas en aguas. Tras este trabajo, algunos ejemplos del uso de CDs para el análisis de muestras químicas y biológicas han sido recogidos en diferentes artículos científicos y patentes^{169,170,171}.

¹⁶⁸ Kido, H., Maquieira, A., Hammock, B.D. *Anal. Chim. Acta* 411 (2000) 1.

¹⁶⁹ Virtanen, J. U.S patent No. 6,030,581 (2000)

¹⁷⁰ Hammock, B.D., Kido, H., Maquieira, A., US patent No. 6,342,395B1 (2002).

¹⁷¹ S. Iimura y H. Ogawa, US2003/0169677A1 (2003).

En los últimos años se han realizado distintas aproximaciones a la tecnología de CDs. Lange *et al.*¹⁷² desarrollaron un sistema para la detección indirecta de proteína C-reactiva utilizando el *pickup* de un lector de CDs, fijado en la plataforma de un microscopio óptico. En 2009, Lee *et al.*¹⁷³ desarrollaron un ELISA en disco para la determinación de biomarcadores del virus de la hepatitis B. El plasma sanguíneo era introducido en una cámara de reacción que contenía un lecho de partículas de poliestireno funcionalizadas con antígenos, además de antígenos marcados con una enzima. La disolución se mezcla por rotación y, tras el lavado y la adición de sustrato, el fluido se transfiere a una cámara de detección, donde las medidas de absorbancia se realizan con una unidad de construcción propia. Sin embargo, estas interesantes aproximaciones no aprovechan la simplicidad y alta velocidad de lectura del lector de CDs. Así, en ninguno de estos trabajos se realizó la detección mediante un lector específico de CDs.

Entre los investigadores que han utilizado lectores de CD como escáneres, están Barathur *et al.*¹⁷⁴ quienes modificaron un lector de CDs para usarlo como microscopio de barrido. Los ensayos se llevan a cabo en cámaras microfluidicas situadas sobre un CD que estos autores denominan "Biocompact disc", donde los análisis se llevan a cabo en cámaras microfluídicas sobre el CD. Para generar una señal óptica emplearon moléculas marcadas con micropartículas, que dispersan la luz que de otro modo habría sido reflejada hacia el fotodetector.

¹⁷² Lange, S.S., Roth, G., Wittermann, S., Lacoste, T., Vetter, A., Grassle, J., Kopta, S., Kolleck, M., Breiting, B., Wick, M., Horber, J.K.H., Dubel, S., Bernard, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (2006) 270.

¹⁷³ Lee, S.B., Lee, J.N., Park, J.M., Lee, J.G., Kim, S., Cho, Y.K., Ko, C. *Lab Chip* 9 (2009) 1548.

¹⁷⁴ Barathur, R., Bookout, J., Sreevatsan, S., Gordon, J., Werner, M., Thor, G., Worthington, M. *Psych. Genetics* 12 (2002) 193.

El equipo de Remacle¹⁷⁵ ha llevado a cabo análisis de matrices de ADN sobre soportes similares a los CDs, pero en los que la mitad anular más externa es transparente, desprovista de la película metálica. Esta parte externa se reserva para llevar a cabo el ensayo (por tanto, el área analítica es limitada) y la detección se realiza mediante un segundo haz láser adicional. En estos ensayos, el sistema óptico estándar del lector de CDs se utiliza para trabajar con información numérica en la parte interna de los discos.

La Clair (2003)¹⁷⁶, y más tarde Jones (2005)^{177,178}, utilizaron la rutina de detección de errores del propio mecanismo de lectura de CDs para detectar la presencia de biomoléculas y bacterias sobre la superficie de los discos. Sin embargo, como es común que cada fabricante de lectores/grabadores tenga sus propias microinstrucciones (*firmware*) para la corrección de errores, cada dispositivo proporciona una sensibilidad distinta, generando resultados no comparables^{179,180}.

Tal y como demuestran la gran cantidad de artículos y revisiones publicadas al respecto en los últimos años, los *microarrays* sobre CDs (o sistemas *Lab-on-a-CD*) se han convertido en una tecnología de vanguardia muy popular, que es el foco de una intensa investigación^{181,182,183,184}.

¹⁷⁵ Alexandre, I., Houbion, Y., Collet, J., Demartean, J., Gala, J.L., Remacle, J. *Biotechniques*, 33 (2002) 435.

¹⁷⁶ La Clair, J.J., Burkart, M.D. *Org. Biomol. Chem.* 1 (2003) 3244.

¹⁷⁷ Jones, C.L., Thigpen, S.A., en Australian Society for Microbiology 2005 Natl Conf. 25-29, National Convention Centre, Canberra, Australia, 2005.

¹⁷⁸ Jones, C.L. *Probl. Nonlinear Anal. Eng. Syst.* 11 (2005) 17.

¹⁷⁹ Reber, W.L., Perttunen, C.D., US patent No. 6,110,748 (2000).

¹⁸⁰ Reber, W.L., Perttunen, C.D., US patent No. 6,727,103 (2004).

¹⁸¹ Gorkin, R., Park, J., Siegrist, J., Amasia, M., Lee, B.S., Park, J.M., Kim, J., Kim, H., Madou, M., Cho, Y.K. *Lab Chip* 10 (2010) 1758.

¹⁸² Alphonsus, H. C. Ng., Uddayasankar, U., Wheeler, A.R. *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 991.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado, por primera vez, que un dispositivo de lectura/grabación óptico (lector/grabador de CDs) integrado en un ordenador personal convencional puede tener un alto potencial analítico, utilizando el diodo de luz del lector de CDs como fuente láser de barrido. Se ha demostrado, a su vez, la aplicación de la tecnología de CDs para la generación de una señal inmunoquímica *in situ* sin interrumpir la lectura normal del disco^{185,186}. Más recientemente se ha desarrollado el primer microinmunoensayo multiplexado (es decir, capaz de determinar varias especies simultáneamente de una misma muestra) sobre DVDs, comparando dos estrategias de lectura: la primera diseñada para la adquisición de señales analógicas atenuadas, y la segunda basada en el análisis de los errores de lectura. Los resultados indicaron que la primera alcanza mayor sensibilidad¹⁸⁷.

¹⁸³ Mao, X., Huangand, T.J., Ho, C.M. *Techniques and Applications for the Clinical Laboratory* (2010) 21.

¹⁸⁴ Lin, C.C., Wang, J.H., Wu, H.W., Gwo-Bin Lee, G.B. *Journal of the Association for Laboratory Automation* 15 (2010) 253.

¹⁸⁵ Morais, S., Carrascosa, J., Mira, D., Puchades, R., Maquieira, A. *Anal. Chem.* 79 (2007) 7628.

¹⁸⁶ Morais, S., Tamarit-López, J., Puchades, R., Maquieira, A. *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 2837.

¹⁸⁷ Morais, S., Tortajada-Genaro, L.A., Arnandis-Chover, T., Puchades, R., Maquieira, A. *Anal. Chem.* 81 (2009) 5646.

3.5 Desarrollo de microinmunoensayos sobre CDs

3.5.1 Elección de la plataforma analítica

Para trabajar con la tecnología de discos compactos, la plataforma analítica debería ser un CD estándar, de modo que éste pudiera ser leído utilizando lectores de CD convencionales. Al mismo tiempo, el CD debe permitir la transmisión de la radiación láser incidente, con lo que la variación en la transmitancia pueda relacionarse con la concentración. Así, la utilización de discos parcialmente transparentes es la clave para conseguir ambos objetivos, ya que con este principio de detección, la reflectancia de la plataforma analítica asegura que el rayo láser del lector de CDs siga las pistas grabadas en el disco, lo cual es esencial para poder rotar simultáneamente el disco y detectar los resultados de los ensayos químicos.

La bibliografía recoge el empleo de discos de baja reflectancia (*low reflectivity compact discs: L-CDs*), constituidos por policarbonato y una fina capa de oro, de modo que un 70% de la luz láser del lector de CDs es transmitida; el haz atenuado es detectado mediante un fotodiodo plano anexionado en la cara opuesta del lector de CDs¹⁸⁸.

A la hora de seleccionar la superficie de trabajo, es más sencillo llevar a cabo los ensayos sobre policarbonato y no sobre oro, debido a que permite la inmovilización de biomoléculas por adsorción física directa, lo que no sucede de manera tan generalizada y satisfactoria sobre oro. Además, la película de oro se puede deteriorar fácilmente por manipulación¹⁸⁹.

¹⁸⁸ Morais, S., Carrascosa, J., Mira, D., Puchades, R., Maquieira, A. *Anal. Chem.* 79 (2007) 7628.

¹⁸⁹ Tilton, R.D., Robertson, C.R., Gast, A., P. *Langmuir* 7 (1991) 2710.

3.5.2 Amplificación de la señal

En lo referente al modo de detección, el lector de CDs (trabajando con el diodo láser estándar, $\lambda=780$ nm) puede detectar un amplio espectro de productos de reacción, siempre que estos productos absorban, reflejen o dispersen la radiación incidente. En este sentido, se han utilizado enzimas, como peroxidasa del rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP) o β -galactosidasa, que al reaccionar con un substrato enzimático adecuado (por ejemplo 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB), 3,3' diaminobenzidina (DAB), 4-cloro-1-naftol para HRP o bromocloroindolil fosfato / nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT), Naftol-AS-MX fosfato / Fast red (NAMP/FR) o naftol-AS-BI-fosfato / Fast Red TR (NABP/FR) para AP) dan productos insolubles capaces de modificar el perfil de luz transmitida. Por otro lado, como método de amplificación de la señal, el basado en la precipitación de plata catalizada por nanopartículas de oro ha demostrado ser uno de los más sensibles, y comparable a la detección basada en marcadores enzimáticos¹⁹⁰.

¹⁹⁰ Morais, S., Carrascosa, J., Mira, D., Puchades, R., Maquieira, A. *Anal. Chem.* 79 (2007) 7628.

OBJETIVOS

El presente trabajo se enmarca dentro de una de las líneas que el Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) de la Universidad Politécnica de Valencia viene desarrollando para la determinación de residuos de antimicrobianos y fitosanitarios mediante métodos inmunoquímicos, tanto en el sector agroalimentario como medioambiental.

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el marco del proyecto Feder BQU2003-02677, financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia.

El objetivo general es el desarrollo de sistemas inmunoquímicos para la determinación de residuos de distintos tipos de antibióticos, en concreto sulfonamidas y tetraciclinas, tanto mediante el formato tradicional en microplaca ELISA, como mediante el uso de microarrays utilizando CDs como plataformas analíticas. Ello permitirá desarrollar metodologías con gran capacidad de trabajo para la realización de ensayos rápidos, aplicados a la monitorización *in situ* de gran número de muestras.

Con este fin se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Selección de inmunorreactivos.
2. Desarrollo y puesta a punto de inmunoensayos en placa ELISA: estudio de formatos, optimización del ensayo, tolerancia a disolventes.
3. Aplicación de los inmunoensayos en placa ELISA a muestras reales.
4. Desarrollo y puesta a punto de inmunoensayos en CD.
5. Demostración del potencial analítico de la tecnología de CDs

MATERIALES Y MÉTODOS

4. Productos y reactivos

4.1 Sulfonamidas y tetraciclinas

Los patrones de las sulfonamidas y tetraciclinas objeto de estudio, así como de los compuestos relacionados utilizados para evaluar la selectividad, fueron adquiridos a Fluka-Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Las disoluciones estándar se prepararon en NaOH 0,5 mol L⁻¹ o dimetilsulfóxido, y se almacenaron a -20 °C.

4.2 Reactivos

Los reactivos albúmina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina (OVA), peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), caseína, adyuvante de Freund's completo e incompleto, *o*-fenilendiamina (OPD), Tween 20, anticuerpos de cabra anti-conejo marcados con HRP (GAR-HRP), disoluciones de amplificación con plata, anticuerpos de cabra anti-conejo marcados con AP (GAR-AP), substrato líquido de fosfatasa alcalina BCIP/NBT (bromocloroindolil fosfato / nitroblue tetrazolium), substrato líquido de peroxidasa 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), tributilamina (TBA), cloroformiato de isobutilo (CFI), carbonildiimidazol (CDI), *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Los anticuerpos de cabra anti-conejo marcados con oro (GAR-Gold) fueron suministrados por Nanoprobes, Inc. (Yaphank, NY, EE.UU.).

Los reactivos *N*-hidroxisuccinimida (NHS) y *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) usados para las conjugaciones, fueron suministrados por Boehringer (Mannheim, Alemania), y la hemocianina del molusco *Megathura crenulata* (KLH) y el reactivo sulfo-NHS por Pierce (Rockford, IL, EE.UU.).

Todos los disolventes orgánicos y las sales para preparar los tampones fueron suministrados por Scharlau (Barcelona, España). El reactivo de Bradford utilizado para la determinación de proteína fue adquirido a Bio-Rad (Barcelona, España).

4.3 Tampones

- Tampón carbonato (CB): Na_2CO_3 15 mM y NaHCO_3 35 mM, pH 9,6
- Tampón fosfato salino (PBS): Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 2 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM, pH 7,5
- Tampón PBS-T: PBS conteniendo 0,05% de Tween 20
- Tampón de revelado: citrato sódico 25 mM y fosfato sódico 62 mM, pH 5,5
- Tampón de impresión en CDs (PPB): PBS conteniendo 0,02% de Tween 20 y 10% de glicerol.

4.4 Haptenos

Los haptenos para sulfonamidas y tetraciclinas fueron diseñados y sintetizados por personal del grupo de investigación, siguiendo los protocolos descritos en las publicaciones asociadas a esta Tesis^{191,192,193,194}.

Haptenos para sulfonamidas:

Hapteno S2: Ácido 4-(4-aminofenilsulfonamido)benzoico

Hapteno S3: Ácido [2-(4-aminofenilsulfonamido)-1,3-tiazol-4-il]acético

Hapteno S4: Ácido 6-(4-aminofenilsulfonamido)nicotínico

Hapteno S5: Sulfasalazina (ácido 5-[4-(2-pirimidilsulfamoil)fenilazo]-2-hidroxibenzoico) (SSZ)

Hapteno S6: N⁴-Ftalilsulfatiazol (ácido 2-[4-(1,3-tiazol-2-ilsulfamoil)fenilcarbamoil]benzoico) (PSTZ)

Hapteno S7: Ácido 3-{4-hidroxi-3-[4-(tiazol-2-ilsulfamoil)fenilazo]fenil} propanoico

Hapteno S8: Ácido 3-{4-hidroxi-3-[4-(2-pirimidilsulfamoil)fenilazo]fenil} propanoico

Hapteno S9: Ácido [4-(4-aminofenilsulfonamido)fenil]acético

Hapteno S10: Ácido (4-aminofenilsulfonamido)acético

Hapteno S11: Ácido 6-(4-aminofenilsulfonamido)hexanoico

¹⁹¹ Pastor-Navarro, N., García-Bover, C., Maquieira, A., Puchades, R. *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 1088.

¹⁹² Pastor-Navarro, N., Gallego-Iglesias, E., Maquieira, A., Puchades, R., *Talanta* 71 (2007) 923.

¹⁹³ Pastor-Navarro, N., Gallego-Iglesias, E., Maquieira, A., Puchades, R. *Anal. Chim. Acta* 583 (2007) 377.

¹⁹⁴ Pastor-Navarro, N., Brun, E.M., Gallego-Iglesias, E., Maquieira, A., Puchades, R., *Journal of Environmental Monitoring* 11 (2009) 1094.

Hapteno S12: 4-Amino-N-(3-hidroxipropil)fenilsulfonamido

Hapteno S13: Ácido 4-(4-aminofenilsulfonamido)butírico

Hapteno S14: Ácido 4-[4-(4-aminofenilsulfonamido)fenilsulfonamido]
benzoico

Haptenos para tetraciclinas:

Hapteno CTC-1: Monohidrocloruro de 7-clortetraciclina

Hapteno CTC-2: Glicilmetilclortetraciclina

Hapteno CTC-3: Hidrocloruro de (9-(4'-carboxifenilazo)clortetraciclina

Hapteno OTC-1: Oxitetraciclina dihidrato

Hapteno OTC-2: Hidrocloruro de hidroximetiloxitetraciclina

Hapteno OTC-3: Hidrocloruro de 7 o 9-(4'carboxifenilazo)oxitetraciclina

Hapteno TC-1: Tetraciclina hidrato

Hapteno TC-3: 2-N-Lisinometiltetraciclina; tetralisal, comercial

Hapteno TC-4: Hidrocloruro de 7 o 9-(4'-carboxifenilazo)tetraciclina

4.5 Otros materiales

Las placas ELISA de poliestireno (96 y 384 pocillos) fueron adquiridas a Costar Corporation (Cambridge, MA, EE.UU.).

Los cartuchos de extracción en fase sólida Strata C18-E (3 mL, 500 mg) y Strata X-C (1 mL, 30 mg) fueron suministrados por Phenomenex (Torrance, CA, EE.UU.)

Las columnas de exclusión molecular D-Salt Dextran fueron adquiridas a Bio-Rad (Barcelona, España).

Los discos compactos estándar, recubiertos de oro y con una reflectividad del 30% ($\lambda = 780$ nm) fueron adquiridos a Media Corp. (Tau-Yuan Shien, China).

5. Equipos instrumentales

Lavador de placas Nunc-Immuno Wash 12 suministrado por Nunc Maxisorp (Roskilde, Dinamarca).

Los espectros UV-Vis fueron obtenidos utilizando un espectrofotómetro de fila de diodos marca Hewlett-Packard, modelo 8452 (Palo Alto, CA).

Las medidas de absorbancia y fluorescencia se realizaron con un lector de placas Wallac, modelo Víctor 1420 multilabel counter (Turku, Finlandia).

Las curvas de competición de los inmunoensayos se analizaron matemáticamente con los paquetes informáticos SoftmaxPro v1.2.0 (Molecular Devices, Berkshire, Reino Unido) y Sigmaplot (Jandel Scientific, Erkrath, Alemania).

El microimpresor de CDs VP478ACD con agujas de impresión de 457 μm de diámetro fue suministrado por V & P Scientific, Inc. (San Diego, CA).

El lector de CDs utilizado fue un equipo comercial (Premium, Plector America, Fremont, CA), al que se incorporó un fotodiodo plano (SLSD-71N6, Silonex, Montreal, Canada), un fotosensor reflector (EE-

SY125, Omron) y una placa electrónica de adquisición de datos de fabricación propia.

6. Técnicas generales

6.1 Conjugación de haptenos a proteínas

Los haptenos se conjugaron por sus grupos carboxilo o hidroxilo a diferentes proteínas -KLH o albúmina de suero bovino (BSA)- utilizando el método del éster activo¹⁹⁵. Para ello, 100 μ moles del hapteno se disolvieron en 200 μ L de *N,N'*-dimetilformamida (DMF) anhidra. Por otro lado, 100 μ moles de NHS y 100 μ moles de DCC se disolvieron en 300 μ L de DMF anhidra y se añadieron gota a gota sobre la disolución de hapteno. La mezcla de reacción permaneció en agitación a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 5 horas. Tras este tiempo, se centrifugó durante 15 min a 7.500 rpm con el fin de eliminar el precipitado de dicitclohexilurea. A continuación, se disolvieron 30 mg de BSA o 10 mg de KLH en 1,8 mL de tampón carbonato o tampón fosfato, respectivamente. Se añadieron 200 μ L de DMF anhidra y, posteriormente, 600 μ L del hapteno activado, en alícuotas de 50 μ L cada 5 min. La mezcla se dejó reaccionar 4 h a temperatura ambiente, en agitación y protegida de la luz. Finalmente, el conjugado se purificó por cromatografía de exclusión molecular y las

¹⁹⁵ Langone, J.J., Van Vunakis, H. *Methods Enzymol.* 84 (1982) 628.

fracciones obtenidas se cuantificaron por el método de Bradford¹⁹⁶. La Figura 25 muestra un esquema del método de conjugación.

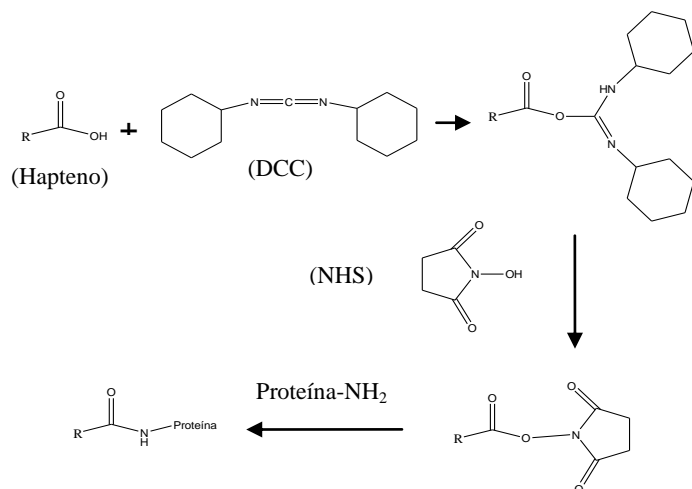


Figura 25. Método del éster activo

La síntesis de los conjugados de tapizado OVA-hapteno y de los marcadores HRP-hapteno, se llevó a cabo (Figura 26) utilizando el método del anhídrido mixto¹⁹⁷. Para ello, 45 μ moles de hapteno disuelto en 300 μ L de DMF anhidra se añadieron poco a poco, y en constante agitación, a 50 μ moles de TBA y 50 μ moles de CFI. La mezcla se dejó en agitación y protegida de la luz, durante 1 h a temperatura ambiente. Por otro lado, se pesaron 20 mg de OVA y 3 mg de HRP en dos viales separados, y se disolvieron en 1,5 mL de tampón carbonato. A cada vial se añadieron 150 μ L del hapteno activado (alícuotas de 10 μ L y agitación constante), dejando reaccionar durante 3 h a temperatura ambiente y, posteriormente, toda la noche a 4 °C.

¹⁹⁶ Bradford, M. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 245.

¹⁹⁷ Erlanger, B.F. *Methods Enzymol.* 70 (1980) 85.

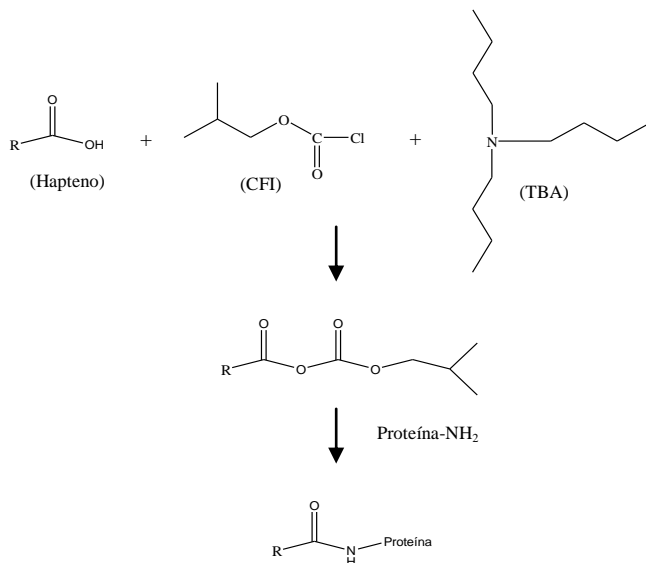


Figura 26. Método del anhídrido mixto

Los conjugados obtenidos se purificaron por cromatografía de exclusión molecular y las fracciones obtenidas se cuantificaron por Bradford¹⁹⁶.

Los haptenos con grupos hidroxilo en su estructura se conjugaron a proteínas (BSA, OVA y HRP) por el alcohol, siguiendo el método descrito por Beasley *et al*¹⁹⁸. Así, 0,21 mmoles de hapteno se mezclaron con 0,25 mmoles de CDI en 2 mL de acetonitrilo anhidro. La reacción se mantuvo en agitación durante 48 h a 0 °C y bajo atmósfera de argón. A continuación, 16 mg mL⁻¹ de hapteno activado en DMF se añadieron a 4 mg mL⁻¹ de proteína

¹⁹⁸ Beasley, H.L., McAdam, D.P., Larkin, K.A., Ferguson, B.S., Bushway, R.J., Skerritt, J.H. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59 (1997) 375.

en tampón fosfato pH 9,1, dejando reaccionar la mezcla en agitación constante durante 48 h a 4 °C (Figura 27).

Los conjugados obtenidos se purificaron por cromatografía de exclusión molecular y en las fracciones obtenidas se cuantificó el contenido en proteína mediante Bradford¹⁹⁶.

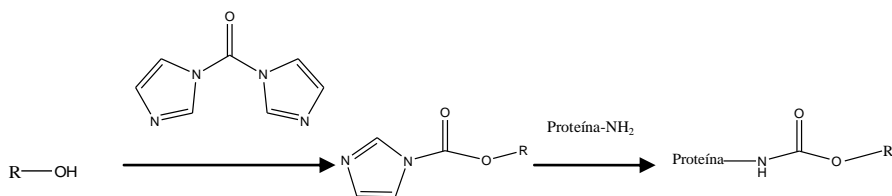


Figura 27. Método de conjugación para alcoholes

6.2 Purificación de conjugados

Los conjugados se purificaron mediante cromatografía de exclusión molecular en alícuotas de 1 mL utilizando columnas D-Salt Dextran (Pierce) y tampón fosfato como eluyente. Para la cuantificación de proteína se utilizaron las diez primeras fracciones de 1 mL.

La cantidad de proteína en los diferentes conjugados se determinó mediante el método de Bradford, utilizando curvas patrón (0,25-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de cada proteína (BSA, OVA, KLH) disuelta en tampón fosfato. Para ello, los patrones y las muestras (diluciones seriadas) se colocaron en una placa ELISA (20 $\mu\text{L/pocillo}$), se añadieron 200 $\mu\text{L/pocillo}$ del reactivo de Bradford -diluido 1:5 en agua MilliQ- y, tras 5 min en oscuridad, se leyó la absorbancia a 595 nm¹⁹⁶.

La proteína HRP se cuantificó por medida directa de la absorbancia a 404 nm.

6.3 Obtención de anticuerpos policlonales

Para la obtención de anticuerpos policlonales (PABs) se utilizaron conejos de la raza Nueva Zelanda. Para la primera inmunización se suspendieron 0,5 mL del conjugado BSA-hapteno o KLH-hapteno ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) en 0,5 mL de adyuvante completo de Freund y se inyectaron intramuscularmente en las conejas (por duplicado, I y II). Los animales se inmunizaron cada 21 días con el mismo inmunógeno, suspendido en 0,5 mL de adyuvante incompleto de Freund. Diez días después de cada inmunización, se llevaron a cabo sangrías con el fin de conocer el título y las propiedades del suero de cada animal. La Figura 28 presenta un esquema del ciclo de inmunización/titulación. Cuando dejó de observarse una mejora del título de los sueros, se sacrificó al animal, y la sangre se dejó coagular durante una noche a 4 °C. El suero se separó por centrifugación, y tras añadir azida sódica (0,02%) como conservante, se almacenó a -80 °C.

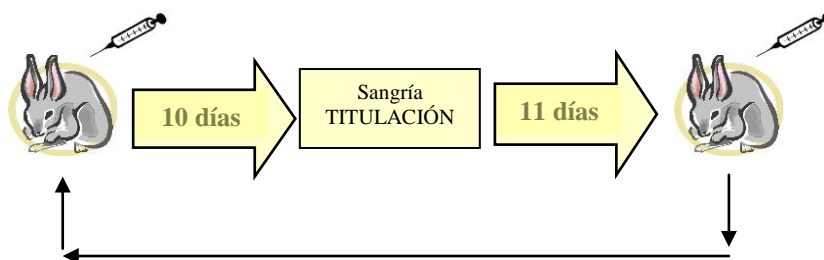


Figura 28. Ciclo de inmunización/titulación

6.4 Enzimoimmunoanálisis en fase sólida (ELISA) sobre placas de poliestireno

6.4.1 Ensayos de titulación y competición

Para conocer el título de los sueros se llevaron a cabo ensayos tipo ELISA no competitivos, tanto en formato directo como indirecto, siguiendo los protocolos usuales de titulación¹⁹⁹.

A. Ensayo de titulación en formato directo

- 1- Tapizar la placa ELISA de poliestireno con el suero (100 μL /pocillo, diversas concentraciones) disuelto en tampón carbonato (CB). Incubar durante 16 h a 4 °C.
- 2- Lavar la placa seis veces con PBS-T

¹⁹⁹ Tijssen, P. En: *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 15*, R.H. Burdon, P.H. Knippenberg (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 1987, 221.

- 3- Añadir el trazador hapteno-HRP (100 μL /pocillo a diferentes concentraciones) e incubar en oscuridad durante 1 h a temperatura ambiente.
- 4- Lavar la placa seis veces con PBS-T.
- 5- Revelar utilizando 100 μL /pocillo de la disolución de substrato que contiene 2 mg/mL OPD y 0,012% H_2O_2 en tampón de revelado. Pasados diez minutos, detener la reacción enzimática añadiendo 50 μL /pocillo de ácido sulfúrico 2,5 M.
- 6- Leer la absorbancia a 490 nm en el lector de placas.

B. Ensayo de titulación en formato indirecto

- 1- Tapizar la placa con el conjugado OVA-hapteno (100 μL /pocillo, diferentes concentraciones) en tampón CB. Incubar durante 16 h a 4 $^{\circ}\text{C}$.
- 2- Lavar la placa seis veces con PBS-T.
- 3- Añadir el suero (100 μL /pocillo a diferentes concentraciones) e incubar 1 h a temperatura ambiente.
- 4- Lavar la placa seis veces con PBS-T.
- 5- Añadir anticuerpo cabra-anticonejo-HRP (100 μL /pocillo, dilución 1:4.000 en PBS-T) e incubar en oscuridad durante 1 h a temperatura ambiente.
- 6- Lavar la placa seis veces con PBS-T.
- 7- Revelar y leer tal y como se describe en los puntos 5 y 6 del apartado A.

Los ensayos competitivos (indirectos y directos) se realizaron con aquellas concentraciones de inmunorreactivos que dieron señales de absorbancia entre 0,5 y 1,2 unidades. A continuación se detallan los protocolos utilizados en ambos casos.

C. Ensayo de competición en formato directo

- 1- Tapizar la placa con el suero (100 μL /pocillo a la concentración seleccionada en el ensayo de titulación) disuelto en tampón CB. Incubar durante 16 h a 4 °C.
- 2- Lavar la placa seis veces con PBS-T.
- 3- Añadir el analito (50 μL /pocillo). El analito puede estar contenido en las muestras o ser el patrón necesario para establecer la curva de calibrado. En este último caso, añadir el analito (a diferentes concentraciones) y el trazador hapteno-HRP (50 μL /pocillo a la concentración seleccionada en el ensayo de titulación), e incubar en oscuridad durante 1 h a temperatura ambiente.
- 4- Lavar la placa seis veces con PBS-T.
- 5- Revelar y leer tal y como se describe en los puntos 5 y 6 del apartado A.

D. Ensayo de competición en formato indirecto

- 1- Tapizar la placa con el conjugado OVA-hapteno (100 μL /pocillo a la concentración seleccionada en el ensayo de titulación) en tampón CB. Incubar durante 16 h a 4 °C.
- 2- Lavar la placa seis veces con PBS-T.

- 3- Añadir 50 μL /pocillo de analito patrón o muestra. Mezclar con suero (50 μL /pocillo a la concentración seleccionada en el ensayo de titulación) e incubar durante 1 h a temperatura ambiente.
- 4- Lavar la placa seis veces con PBS-T.
- 5- Añadir anticuerpo cabra-anticonejo-HRP (100 μL /pocillo, dilución 1:4.000 en PBS-T) e incubar en oscuridad durante 1 h a temperatura ambiente.
- 6- Lavar la placa seis veces con PBS-T .
- 7- Revelar y leer tal y como se describe en los puntos 5 y 6 del apartado A.

6.4.2 Optimización de los ensayos ELISA

Una vez seleccionados los inmunorreactivos y las concentraciones que dieron lugar a los ELISAs más sensibles, se procedió a la optimización de los inmunoensayos. Para ello se estudió la influencia de diferentes variables experimentales: fuerza iónica, pH, concentración de tensoactivo y tiempo de incubación en la etapa competitiva.

Los analitos se prepararon en agua desionizada, mientras que el medio de dilución de los sueros dependió de la variable estudiada. Con el fin de conocer el efecto de cada variable, los ensayos se llevaron a cabo simultáneamente en una misma placa ELISA.

En primer lugar, se estudió el efecto de la fuerza iónica, utilizando disoluciones de PBS-T con diferentes molaridades (0, 5, 10, 20, 30 y 50

mmol L⁻¹), pH 7,5 y 0,1% (v/v) de Tween 20. A continuación, se evaluó el efecto del pH del medio, para lo que se utilizaron disoluciones de tampón PBS a distintos pHs (entre 4 y 9,5) con 0,1% (v/v) de Tween 20 y fuerza iónica óptima. El porcentaje de tensoactivo se estudió con disoluciones de tampón PBS al pH y fuerza iónica óptimas, conteniendo concentraciones de Tween 20 comprendidas entre 0 y 0,25% v/v.

Por último, se examinó la influencia del tiempo de incubación en la etapa competitiva (entre 15 y 60 min), utilizando las condiciones óptimas previamente seleccionadas.

6.4.3 Estudios de selectividad

Para evaluar la selectividad de los ensayos, se prepararon una serie de patrones de diversas sustancias estructuralmente relacionadas con los analitos de interés, es decir, compuestos de la familia de las sulfonamidas y de las tetraciclinas. Se determinó la IC₅₀ para cada una de ellas y se calculó el valor de la reactividad cruzada mediante la siguiente ecuación:

$$RC (\%) = [IC_{50} (\text{analito}) / IC_{50} (\text{interferente})] \times 100$$

Los resultados se expresaron como porcentaje de reactividad cruzada para cada compuesto interferente respecto al de referencia.

6.4.4 Efecto de los disolventes orgánicos

En el tratamiento de muestras tanto alimentarias como medioambientales se requiere, en muchos casos, extraer los analitos con disolventes orgánicos, por lo que es necesario comprobar cómo se comporta cada inmunoensayo en dichos disolventes. Por ello, se llevaron a cabo ensayos de competición, tanto en tampón acuoso como en tampón conteniendo distintos porcentajes -entre 1 y 20% (v/v)- de los disolventes orgánicos más utilizados como extractantes o eluyentes de muestra (metanol, acetonitrilo, acetona, DMSO e isopropanol), estudiando su influencia en la señal obtenida (A_0) y en la sensibilidad del ensayo (IC_{50}).

6.5 Micro-enzimoinmunoanálisis en fase sólida (microinmunoensayo) sobre disco compacto

Para la realización de los microinmunoensayos sobre CDs se empleó un microimpresor de CDs con agujas de impresión de 457 μm de diámetro. El microimpresor posee una matriz de 4 x 6 agujas de impresión (Figura 29). Cada aguja toma 6 nL de la disolución reactivo y deposita 3 nL en el CD.

En cada disco se pueden imprimir hasta 8 matrices de 324 puntos cada una, lo que resulta un total de 2.560 puntos por disco. Cada punto posee 500 μm de diámetro de un máximo de 9 (3x3) puntos, y cada matriz corresponde a una combinación suero/analito diferente.

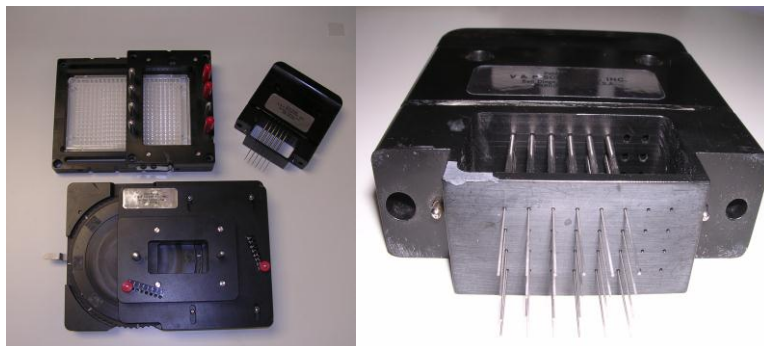


Figura 29. Microimpresor de CDs

En la Figura 30 se muestra un L-CD de 8 zonas, con 16 matrices de 4x4 por zona, listo para ser leído. Cada zona puede ser previamente tapizada con una concentración de conjugado distinta.

Como puede verse, los microinmunoensayos sobre CDs ofrecen numerosas ventajas frente a las placas ELISA, entre las que destacan la alta capacidad analítica y el considerable ahorro de inmunorreactivos²⁰⁰.

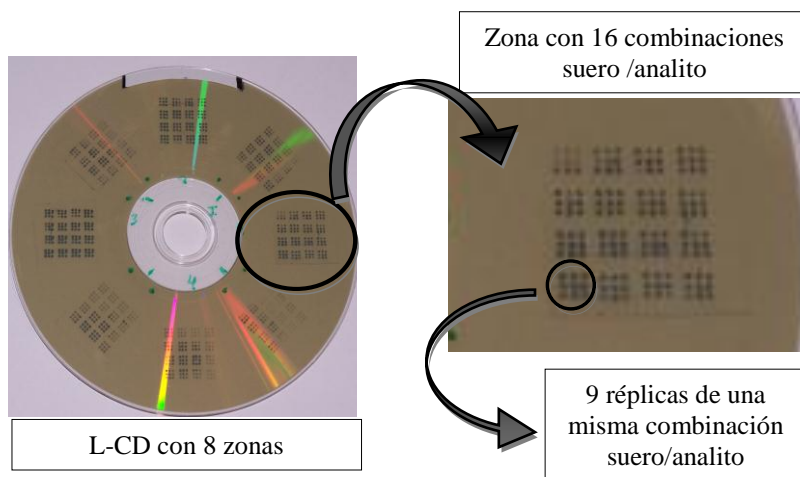


Figura 30. L-CD listo para ser leído

²⁰⁰ Tamarit-López, J., Morais, S., Puchades, R., Maquieira, A. *Analytica Chimica Acta* 609 (2008) 120.

6.5.1 Ensayos de titulación y competición

Los microinmunoensayos sobre CDs se desarrollaron únicamente en formato indirecto, dado que todos los ELISAs optimizados en placa ELISA se habían desarrollado en este formato.

A. Ensayo de titulación

1- Acondicionamiento del CD. Lavar el CD con etanol y, seguidamente, con agua desionizada. Secar en centrifuga.

2- Tapizar la cara de policarbonato (PC) del CD con conjugado OVA-hapteno (30 μL). Tapizar cuatro zonas del CD con cuatro diluciones distintas (10, 5, 1, 0.5 mg L^{-1}).

3- Diseño de cada matriz (*array*). Se utilizan cuatro concentraciones diferentes de suero (1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000) fortificado con analito a dos niveles (1 mg L^{-1} y 0 mg L^{-1}). Esto se realiza por duplicado, según el siguiente esquema:

1/250 1 mg L^{-1}	1/500 1 mg L^{-1}	1/1000 1 mg L^{-1}	1/2000 1 mg L^{-1}	}	Repetición 1
1/250 0 mg L^{-1}	1/500 0 mg L^{-1}	1/1000 0 mg L^{-1}	1/2000 0 mg L^{-1}		
1/250 1 mg L^{-1}	1/500 1 mg L^{-1}	1/1000 1 mg L^{-1}	1/2000 1 mg L^{-1}	}	Repetición 2
1/250 0 mg L^{-1}	1/500 0 mg L^{-1}	1/1000 0 mg L^{-1}	1/2000 0 mg L^{-1}		

4- Preparar el suero en tampón PPB

- 5- Preparar la disolución de analito en agua desionizada
- 6- Mezclar analito y suero (1:1, v/v)
- 7- Trasladar las disoluciones a la placa de 384 micropocillos (20 μL)
- 8- Imprimir sobre el CD utilizando el microimpresor
- 9- Incubar durante 20 min
- 10- Lavar por inmersión en PBS-T y, a continuación en agua desionizada. Secar en centrífuga
- 11- *Revelado I*
 - * Preparar una disolución conteniendo GAR-Gold 1/500 en PBS-T 10 mmol L⁻¹, pH 7,5, 0,1% Tween 20
 - * Depositar 75 μL /zona y colocar cubreobjetos
 - * Incubar durante 60 min
- 12- Lavar y secar tal y como se describe en el punto 10
- 13- *Revelado II*
 - * Mezclar 1:1 (v/v) las disoluciones de revelado A y B (preparar justo antes de usarla y proteger de la luz)
 - * Depositar 75 μL /zona y cubrir con un cubreobjetos
 - * Incubar durante 10 min
- 14- Lavar y secar tal y como se describe en el punto 10
- 15- Leer en el lector de CDs

B. Ensayo de competición

- 1- Acondicionamiento del CD. Lavar el CD con etanol y, seguidamente, con agua desionizada. Secar en centrífuga

- 2- Tapizar la cara de PC del CD con conjugado OVA-hapteno (2 mL) a la concentración seleccionada
- 3- Preparar el suero a la concentración seleccionada, en tampón PPB
- 4- Preparar el analito, en agua desionizada
- 5- Mezclar analito y suero (1:1, v/v)
- 6- Seguir el protocolo descrito en el apartado A, a partir del punto 7

6.5.2 Sistema de detección

El detector utilizado fue, como ya se ha comentado, un lector de CDs comercial (Premium, Plextor, America, Fremont, CA). Dicho lector posee un sistema óptico con un láser (λ 780 nm) para leer CD estándar, y un *tracking system* para centrar y enfocar el láser en la pista de datos espiral a lo largo de toda la superficie del CD. Así, el sistema detector desarrollado posee la ventaja del lector de CDs óptico, que permite iluminar con el láser la cara inferior del disco. Los parámetros controlados por el lector de CDs incluyen el posicionamiento del láser a través del disco, el escaneo de toda su superficie controlando la resolución espacial y la velocidad de rotación lineal del disco.

Para detectar la luz láser transmitida y convertirla en señal eléctrica, se empleó un fotodiodo plano (SLSD-71N6, Silonex, Montreal, Canada) de 25,4 mm de largo y 5,04 mm de ancho, con una sensibilidad espectral de 0,55 A/W a 940 nm, rango espectral entre 400 y 1.100 nm, y ángulo medio

de 60°. En ausencia de biointeracción (sin producto de inmunoreacción), el haz láser del lector de CDs es transmitido a través del L-CD, y la intensidad es detectada por el fotodiodo como señal de fondo. Por el contrario, cuando el láser escanea el disco, los puntos positivos (con producto de inmunoreacción) atenúan la intensidad del haz láser que alcanza el fotodiodo, lo que resulta en una señal diferente a la de fondo. En este proceso, la variación de intensidad de la luz está relacionada con la concentración de la muestra.

Asimismo, el sistema de detección incluye un fotosensor reflector (EE-SY125, Omron) utilizado para determinar las áreas analíticas a leer. Incluye un led infrarrojo de 950 nm y un fototransistor, con una distancia de percepción entre 0,5 y 2 mm. El principio operacional del fotosensor está basado en la detección de la diferencia de reflectividad entre el objeto sensor y el disco. Por ello, las áreas analíticas se indican en la parte exterior del disco con una marca de disparo o arranque (*trigger*) de 3,5 cm. El fotosensor detecta estas áreas (ya que el perímetro sin marcar presenta mayor reflectividad) y envía una señal a la placa de adquisición de datos con la orden de comenzar a capturar los datos de esas zonas (Figura 31).

El software empleado fue diseñado por el grupo de investigación en Visual C++ (BioDisk). Dicho programa proporciona control al lector de CDs para escanear la superficie del disco, modular la velocidad lineal de rotación del disco para una determinada resolución espacial y escribir los datos en el CD. Además, el software BioDisk proporciona control a la placa de adquisición de datos para configurar la frecuencia de muestreo según la rotación del disco y la resolución angular deseada.



Las líneas rojas indican el área de detección delimitada por el *trigger*

Figura 31. Imagen de un disco con la matriz de resultados y el “*trigger*”

Para escanear completamente la superficie del L-CD, el programa simula un proceso de escritura de un archivo de 700 MBytes, controlando así la velocidad de rotación del disco. El escaneo comienza en las pistas interiores del disco, siguiendo la espiral continua hacia el exterior en sentido contrario a las manecillas del reloj (Figura 32).



Figura 32. Pista de datos de un CD

Los datos capturados de cada área de detección, se representan en un sector formado por un conjunto de arcos centrados en la dirección radial, desde el interior hacia el exterior. El software recoge los datos de cada área y los dispone en forma rectangular; además, los almacena en archivos independientes en formato binario no comprimido y los muestra como una imagen gráfica. Debido a la diferencia espacial entre muestras tomadas horizontalmente (cada 13 μm) y verticalmente (cada 1,6 μm), se realiza un ajuste gráfico para mostrar una imagen proporcional X-Y. Además, el software permite exportar la imagen a un código de escala de grises para poder comprimirla en formato *tif* o *bitmap*, para su posterior cuantificación (Figura 33).

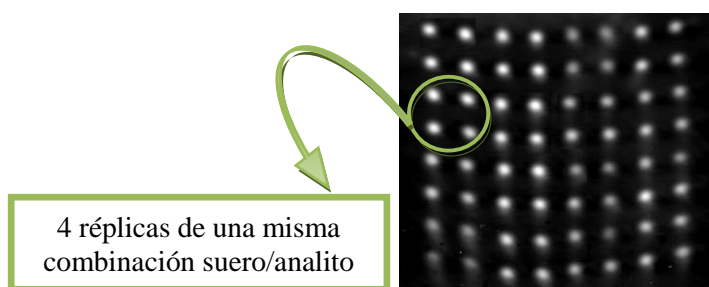


Figura 33. Imagen de los puntos obtenidos, vista con el software BioDisk

A continuación, las imágenes se procesan con el paquete informático Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, EE.UU.) para trazar el mapa de los píxeles más claros y más oscuros, en blanco y negro, antes de la cuantificación con el programa Genepix (Axon Inst., Union City, CA, EE.UU.). La intensidad de señal de cada punto se calcula mediante sustracción del fondo. Las curvas de inhibición se calculan

matemáticamente mediante ajuste de los datos experimentales a una ecuación sigmoideal de cuatro parámetros (Figura 34).

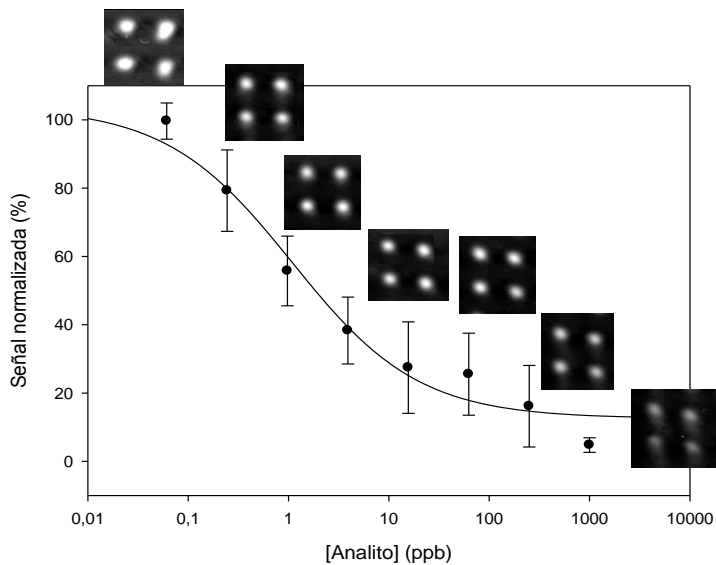


Figura 34. Correspondencia entre los puntos obtenidos experimentalmente y los datos matemáticos de la curva de calibrado.

RESULTADOS

7. Diseño de haptenos

El diseño y la síntesis del hapteno apropiado, así como del posterior conjugado hapteno-proteína transportadora, son etapas claves en la obtención de anticuerpos y en el posterior desarrollo de un método inmunoquímico. El diseño del hapteno y el punto de enlace al portador afectan en gran medida a las características del ensayo resultante (sensibilidad y selectividad).

El hapteno ha de ser tan similar al analito como sea posible, manteniendo sus principales características estructurales y grupos químicos, así como su distribución electrónica. Por tanto, es aconsejable no modificar los grupos inmunogénicos de la molécula de analito ni introducir otros nuevos, ya que puede suponer una alteración de sus propiedades. Como ya se ha comentado, se recomienda la utilización de un brazo espaciador para evitar que la proteína transportadora bloquee los lugares de reconocimiento del hapteno.

El brazo espaciador es un compuesto químico que generalmente presenta en su estructura una cadena alifática con un grupo funcional que permite su posterior unión al transportador (por ejemplo -COOH, -OH, -SH, -NH₂). Debe sustituir una unión carbono-hidrógeno y no un grupo funcional de la molécula. La presencia de otros grupos funcionales o heteroátomos en el brazo espaciador puede inducir la producción de anticuerpos contra el propio espaciador, lo que no es deseable²⁰¹.

²⁰¹ <http://dspace.upv.es/xmlui/bitstream/handle/10251/2930/tesisUPV2832.pdf?sequence=1>

Por otro lado, los anticuerpos presentan una fuerte afinidad hacia el propio brazo espaciador, dando lugar a ensayos con baja afinidad o baja sensibilidad. Esto sucede frecuentemente en el caso de ELISAs competitivos indirectos. Para subsanar este problema, se suelen utilizar trazadores o haptenos de tapizado heterólogos, es decir, distintos a los haptenos de inmunización. La heterología origina un menor reconocimiento de los haptenos utilizados en los conjugados de tapizado o en el trazador, en comparación con el analito. De este modo se produce una mejor competición entre el analito y el trazador o el conjugado de tapizado, dando lugar a ensayos con mayor sensibilidad.

No se puede predecir con seguridad qué estructuras químicas darán lugar a la mejor pareja de competidores, por lo que es importante disponer de un amplio conjunto de haptenos con distintas estructuras y brazos espaciadores. De este modo se pueden seleccionar aquellos que proporcionen los resultados deseados. Para llevar a cabo esta investigación se partió de un conjunto de haptenos, sintetizados previamente por miembros del grupo de investigación, utilizando distintas aproximaciones.

7.1 Haptenos para sulfonamidas

En total, se disponía de trece haptenos que permitieron obtener un conjunto de anticuerpos policlonales y otros inmunorreactivos, necesarios para el desarrollo de diferentes ELISAs. Los haptenos se han clasificado en tipo I y tipo II, dependiendo del lugar de unión del brazo espaciador (Figura 35).

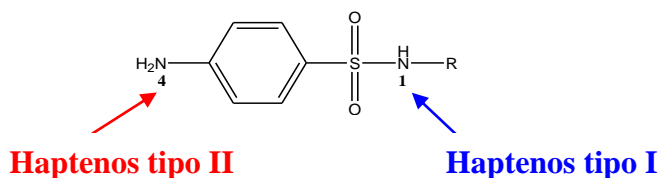


Figura 35. Tipo de hapteno en función del sitio de unión del brazo espaciador.

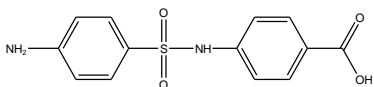
Los haptenos de tipo I (S2, S3, S4, S9, S10, S11, S12, S13 y S14) se prepararon por unión del brazo espaciador al grupo amida (N1), manteniendo inalterada la estructura común de las sulfonamidas (Figura 36).

Otra estrategia para insertar el brazo espaciador es unirlo a través del grupo amino aromático (N4), lo que dió lugar a los haptenos de tipo II (S5, S6, S7, S8) (Figura 37).

Todos los haptenos sintetizados se conjugaron a BSA o KLH, y se utilizaron como inmunógenos en conejos para la producción de anticuerpos (ver sección 4.3.1), obteniéndose veintiséis sueros. Los sueros obtenidos se denominaron en función de la proteína transportadora y del hapteno. Los números romanos (I, II) hacen referencia a sueros obtenidos con el mismo inmunógeno en animales diferentes. También se conjugaron a OVA, disponiendo así de trece conjugados de tapizado.

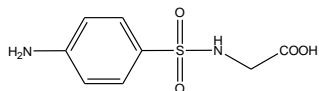
hapteno S2

Ácido 4-(4-aminofenilsulfonamido)benzoico



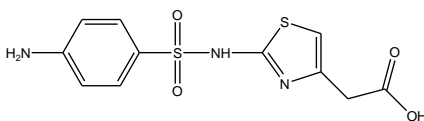
hapteno S10

Ácido (4-aminofenilsulfonamido)acético



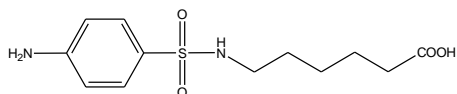
hapteno S3

Ácido [2-(4-aminofenilsulfonamido)-1,3-tiazol-4-il]acético



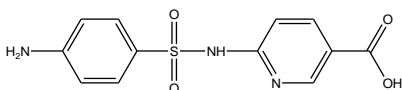
hapteno S11

Ácido 6-(4-aminofenilsulfonamido)hexanoico



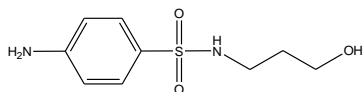
hapteno S4

Ácido 6-(4-aminofenilsulfonamido)nicotínico



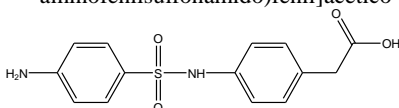
hapteno S12

4-Amino-N-(3-hidroxiopropil)fenilsulfonamido



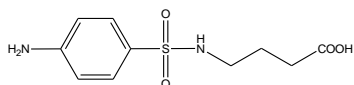
hapteno S9

Ácido [4-(4-aminofenilsulfonamido)fenil]acético



hapteno S13

Ácido 4-(4-aminofenilsulfonamido)butírico



hapteno S14

Ácido 4-[4-(4-aminofenilsulfonamido)fenilsulfonamido]benzoico

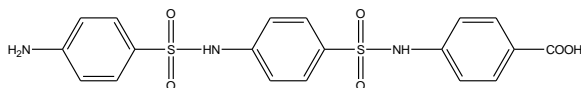
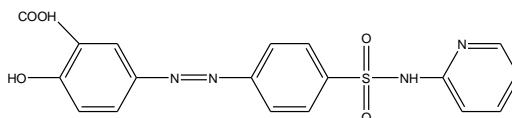
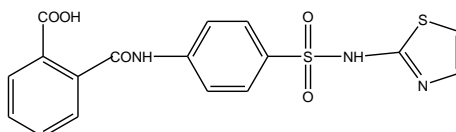


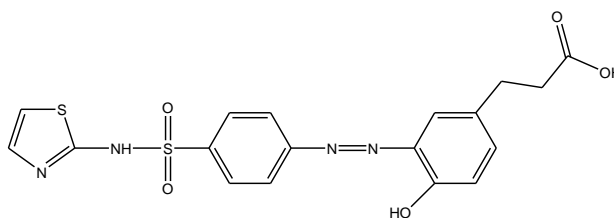
Figura 36. Estructura de los haptenos tipo I para sulfonamidas

hapteno S5

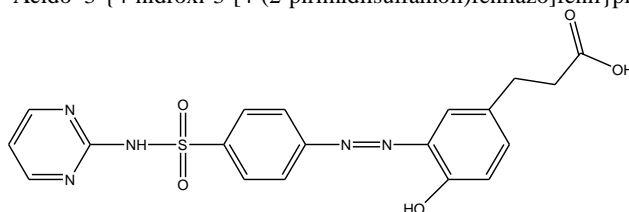
Sulfasalazina (ácido 5-[4-(2-pirimidilsulfamoil)fenilazo]-2-hidroxibenzoico) (SSZ)

**hapteno S6***N*⁴-Ftalilsulfatiazol (ácido 2-[4-(1,3-tiazol-2-ilsulfamoil)fenilcarbamoil]benzoico) (PSTZ)**hapteno S7**

Ácido 3-{4-hidroxi-3-[4-(tiazol-2-ilsulfamoil)fenilazo]fenil}propanoico

**hapteno S8**

Ácido 3-{4-hidroxi-3-[4-(2-pirimidilsulfamoil)fenilazo]fenil}propanoico

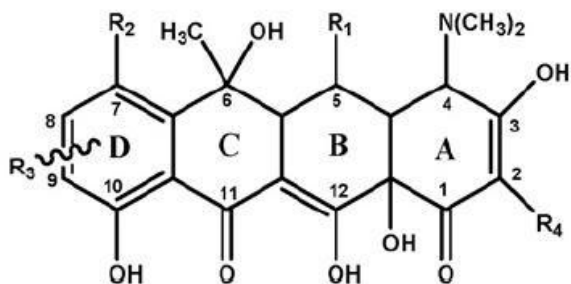
**Figura 37.** Estructura de los haptenos tipo II para sulfonamidas

7.2 Haptenos para tetraciclinas

En el caso de las tetraciclinas, se dispuso de trece haptenos sintetizados por un miembro del grupo de investigación, que permitieron obtener un conjunto de anticuerpos policlonales y otros inmunorreactivos, necesarios para el desarrollo de diferentes ELISAs.

En primer lugar se utilizaron como haptenos los compuestos comerciales de la familia de las tetraciclinas TC, CTC y OTC (haptenos de tipo I), que fueron directamente unidos a diversas proteínas (KLH, BSA y OVA).

Otros haptenos fueron obtenidos con estrategias no descritas previamente en la bibliografía, basadas en la unión del brazo espaciador en el anillo A (haptenos de tipo II: CTC-2 y OTC-2) o en el anillo D (tipo III: CTC-3, OTC-3 y TC-4) de las tetraciclinas. El hapteno TC-3 puede considerarse un hapteno de tipo II, ya que presenta sustitución en el anillo A; se trata del compuesto comercial *Tetralysal*, que fue utilizado directamente sin derivatización. En la Figura 38 se muestran las estructuras de los distintos haptenos. Todos los haptenos se conjugaron a BSA y KLH para obtener inmunógenos para la producción de anticuerpos (ver sección 6.1), y a OVA para obtener los conjugados de tapizado. En total se obtuvieron dieciocho sueros y nueve conjugados de tapizado. Al igual que en el caso de las sulfonamidas, los sueros se denominaron según la proteína transportadora y el hapteno utilizado, siendo I y II sueros obtenidos con el mismo inmunógeno en animales diferentes.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Tipo I				
CTC-1	-H	-Cl	-NH-proteína	-CONH ₂
OTC-1	-OH	-H	-NH-proteína	-CONH ₂
TC-1	-H	-H	-NH-proteína	-CONH ₂
Tipo II				
CTC-2	-H	-Cl	#	-CONHCH ₂ NHCH ₂ COOH
OTC-2	-OH	-H	#	-CONHCH ₂ NHCH ₂ COOH
TC-3	-H	-H	#	-CONHCH ₂ NHCH(CH ₂) ₄ NH ₂ COOH
Tipo III				
CTC-3	-H	-Cl	-N=NC ₆ H ₄ COOH	-CONH ₂
OTC-3	-OH	-H	-N=NC ₆ H ₄ COOH	-CONH ₂
TC-4	-H	-H	-N=NC ₆ H ₄ COOH	-CONH ₂

Figura 38. Estructura de los haptenos para tetraciclinas

8. Desarrollo y puesta a punto de inmunoensayos en placa ELISA

Los sueros obtenidos se titularon y ensayaron en formato directo e indirecto (ver sección 6.5.1), con todos los trazadores y conjugados de tapizado, tanto en modo homólogo como heterólogo, con el fin de seleccionar el formato y las concentraciones de reactivos más adecuadas para desarrollar inmunoensayos en placa.

Para el desarrollo de inmunoensayos competitivos para las sulfonamidas y tetraciclinas objeto de estudio, se ensayaron todas aquellas combinaciones suero/competidor que -en los ensayos de titulación- proporcionaron señales de absorbancia entre 0,5 y 1,2 unidades, utilizando formato indirecto, dados los resultados obtenidos. Recordemos que, en formato indirecto, el conjugado de tapizado es inmovilizado en la placa y el analito presente en la muestra compete por el anticuerpo específico en disolución. Posteriormente, la concentración de analito se mide de forma indirecta mediante la adición de un anticuerpo secundario (anti-IgG) unido covalentemente a la enzima marcadora.

En el conjugado de tapizado se utiliza una proteína diferente a la usada para inmunizar, con el fin de evitar que el anticuerpo reconozca a la proteína de tapizado. Dado que los sueros fueron obtenidos al inmunizar con BSA, se ensayaron frente a conjugados con OVA.

A continuación, se realizaron ensayos de competición para seleccionar aquellos inmunorreactivos y concentraciones que proporcionaron mayor sensibilidad. Finalmente, una vez establecidas las condiciones del inmunoensayo, se procedió a su optimización.

8.1 Sulfonamidas

8.1.1 ELISAs competitivos para sulfonamidas

Una vez realizados los ensayos de titulación (ver Anexo 1), aquellas combinaciones suero/conjugado de tapizado que mostraron reconocimiento específico fueron utilizadas para llevar a cabo ensayos competitivos contra STZ. Los resultados pueden observarse en la Tabla 6.

De los resultados obtenidos con todas las combinaciones, cabe mencionar que los sueros S6 y S12 (I y II) no presentaron competición con ninguna de las combinaciones, y que otros sueros, como S9 y S14 (I y II), sólo compitieron con una de las combinaciones, mostrando además valores muy elevados de IC_{50} . Sin embargo, setenta y seis ensayos mostraron valores de IC_{50} inferiores a 1 mg L^{-1} , siendo 48 de ellos inferiores a 100 ng mL^{-1} .

Por otro lado, los sueros obtenidos a partir de haptenos que mantienen la estructura común de las sulfonamidas y presentan un anillo heterocíclico/aromático unido al brazo espaciador (tipo I, sueros S2, S3 y S4), dieron lugar a ensayos con menor IC_{50} (mayor sensibilidad) que los obtenidos con haptenos tipo II (S5-S8) y aquellos del tipo I que carecen de este anillo (S10-S13).

Se pudo desarrollar un ensayo ELISA sensible y muy específico para STZ, que permite determinar esta sulfonamida en miel con buenas recuperaciones (OVA S2/S3-I, IC_{50} previa a la optimización 3 ng mL^{-1})²⁰².

²⁰² Pastor-Navarro, N., García-Bover, C., Maquieira, A., Puchades, R. *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 1088.

Tabla 6. Valores de IC₅₀ (ng mL⁻¹) para sulfatiazol

<i>suero conjugado</i>	OVA S2	OVA S3	OVA S4	OVA S5	OVA S6	OVA S7	OVA S8
S2-I	>10.000	8	8.000	-	>10.000	-	>10.000
S2-II	>10.000	24	900	-	>10.000	-	>10.000
S3-I	3	21	6	-	>10.000	100	2
S3-II	15	41	12	-	300	-	150
S4-I	195	83	818	-	9	-	270
S4-II	55	-	100	-	2	-	100
S5-I	900	1.000	300	200	30	20	2,5
S5-II	>10.000	-	900	>10.000	>10.000	250	100
S6-I	-	-	-	-	-	-	-
S6-II	-	-	-	-	-	-	-
S7-I	-	-	>10.000	-	324	450	876
S7-II	-	-	-	-	450	-	968
S8-I	-	-	-	-	32	-	>10.000
S8-II	-	-	-	-	91	36	>10.000
S9-I	>1.000	-	-	-	-	-	-
S9-II	1.000	-	-	-	-	-	-
S10-I	493	-	214	-	-	-	-
S10-II	1.724	-	-	-	-	-	-
S11-I	-	-	741	-	-	-	-
S11-II	4.260	16	124	-	-	-	-
S12-I	-	-	-	-	-	-	-
S12-II	-	-	-	-	-	-	-
S13-I	-	-	-	-	-	-	-
S13-II	216.000	-	18.384.000	-	-	-	6.889
S14-I	-	-	-	-	-	-	-
S14-II	-	-	-	-	-	-	-

- = Ensayo sin competición

Tabla 6 (cont.)

<i>suero conjugado</i>	OVA S9	OVA S10	OVA S11	OVA S12	OVA S13	OVA S14
S2-I	>10.000	279	138	617	27	-
S2-II	>10.000	-	3.993	136	17	-
S3-I	>10.000	13	48	11	67	13
S3-II	7,8	-	28	11	60	92
S4-I	-	52	143	22	29	134
S4-II	2,8	8	3	-	4	38
S5-I	-	-	29	4	-	-
S5-II	>10.000	-	470	-	-	1.150
S6-I	-	-	-	-	-	-
S6-II	-	-	-	-	-	-
S7-I	-	-	-	-	-	-
S7-II	-	-	-	-	-	-
S8-I	-	-	-	-	-	-
S8-II	-	-	-	-	-	7
S9-I	>10.000	-	-	-	-	-
S9-II	>10.000	-	-	-	-	-
S10-I	-	-	5.043	-	98	118
S10-II	-	-	-	-	-	-
S11-I	-	-	-	-	-	1.169
S11-II	74	6.630	604	-	-	-
S12-I	-	-	-	-	-	-
S12-II	-	-	-	-	-	-
S13-I	-	-	-	-	-	-
S13-II	1.675	35.252	-	4.964	-	61.299
S14-I	-	-	9.272	-	-	-
S14-II	-	-	-	-	-	-

- = Ensayo sin competición

Sin embargo, en este trabajo se pretende un doble objetivo respecto a la determinación de sulfonamidas. Por un lado, se desea desarrollar y optimizar un ensayo genérico, capaz de determinar simultáneamente el mayor número de sulfonamidas, y por otro, poner a punto inmunoensayos sensibles capaces de detectar otras sulfonamidas de modo específico, con el fin de aplicar dichos ensayos a la detección de residuos de esta familia de compuestos en diferentes matrices.

Por tanto, los pares de inmunorreactivos más prometedores (Tabla 7) se ensayaron también frente al conjunto de las 14 sulfonamidas patrón (Figura 39).

Tabla 7. Características de los ensayos seleccionados

<i>Ensayo</i>	<i>Inmunorreactivos [conjugado tapizado] (mg L⁻¹)</i>	<i>[suero]</i>	<i>Analito</i>	<i>IC₅₀ inicial (ng mL⁻¹)</i>	
A	OVA S8/S3-I	1/16	1:8.000	STZ	2
B	OVA S6/S4-II	1/3	1:32.000	STZ	2
C	OVA S12/ 10-I	1/8	1:2.000	STZ	500
D	OVA S8/S5-I	1/16	1:32.000	SSZ	0,8
E	OVA S8/ 12-II	1	1:1.000	SMX	7,42

Así pues, se buscaron aquellas combinaciones suero/conjugado de tapizado que presentaran alta sensibilidad y capacidad de determinar sulfonamidas de modo genérico. Tres de los sistemas cumplían con estas características: por un lado, las combinaciones OVA S8/S3-I (1/16 mg L⁻¹/ 1:8.000, ensayo A) y OVA S6/S4-II (1/3 mg L⁻¹/ 1:32.000, ensayo B), capaces de reconocer seis sulfonamidas distintas con gran sensibilidad (IC₅₀ del orden de 2 ng mL⁻¹), y por otro, el par OVA S2/S10-I (1/8 mg L⁻¹/ 1:2.000, ensayo C), que presentaba mayor reconocimiento (9 sulfonamidas) aunque con menor sensibilidad (IC₅₀ del orden de 500 ng mL⁻¹).

Finalmente, cabe destacar que dos de los sistemas ensayados presentaron una sensibilidad muy elevada para la determinación específica de dos sulfonamidas: OVA S8/S5-I (1/16 mg L⁻¹/ 1:32.000, ensayo D), capaz de determinar SSZ con una IC₅₀ = 0,8 ng mL⁻¹ y OVA S8/S12-II (1 mg L⁻¹/ 1:1.000, ensayo E), que presentó una IC₅₀ = 7,42 ng mL⁻¹ frente a SMX. Por tanto, también se procedió a la optimización de los mismos.

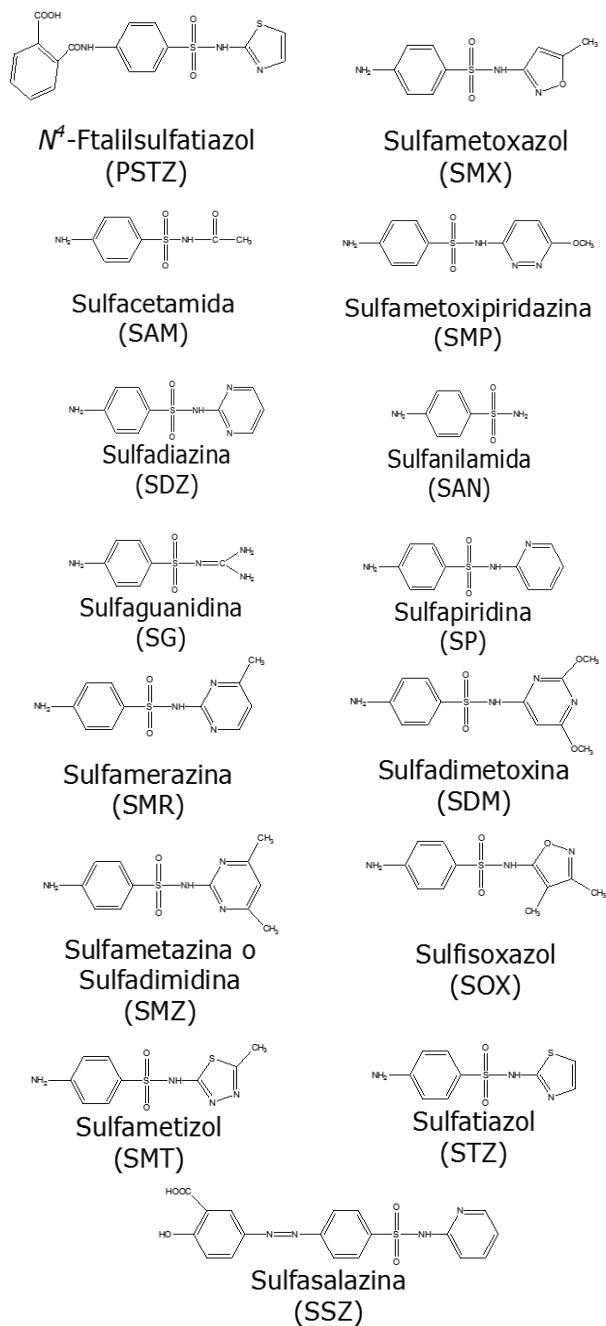


Figura 39. Estructura de las sulfonamidas objeto de estudio

8.1.2 Optimización y características de los ELISA para sulfonamidas

Es conocido que las características de un inmunoensayo pueden verse afectadas al variar las propiedades fisicoquímicas del medio o las condiciones experimentales. Por ello, y con todas las combinaciones seleccionadas en los ensayos competitivos, se llevaron a cabo ensayos de optimización para establecer las condiciones de pH, fuerza iónica, concentración de tensoactivo y tiempo de incubación en la etapa competitiva, que dieran lugar a los inmunoensayos con mejores prestaciones

8.1.2.1 Efecto de la fuerza iónica

Para estudiar el efecto de la fuerza iónica se ensayaron diferentes concentraciones de PBS-T entre 5 mmol L⁻¹ y 50 mmol L⁻¹ de fosfato (Figura 40). Al evaluar el efecto de la fuerza iónica del medio en las prestaciones de los ensayos, se observó que, en líneas generales, la sensibilidad mejoraba gradualmente a medida que aumentaba la concentración del tampón.

Estableciendo un compromiso entre señal y sensibilidad, se seleccionó 30 mmol L⁻¹ como concentración óptima de PBS-T para los ensayos A y B. En el ensayo C, tanto la señal como la IC₅₀ aumentaban hasta una concentración 5 mmol L⁻¹ de PBS-T para, a continuación, disminuir progresivamente a medida que la concentración aumenta (Figura 40). Así pues, la concentración óptima de PBS-T en placa se estableció en 20 mmol L⁻¹ para dicho ensayo. En el caso del ensayo D, se observó que la

fuerza iónica no influía de modo notable en la sensibilidad a partir de 5 mmol L⁻¹, pero sí ejercía una influencia apreciable en la señal obtenida, produciéndose una rápida disminución de la misma a medida que aumentaba la concentración de PBS del medio. Así, la concentración elegida para el ensayo D fue 10 mmol L⁻¹, obteniéndose una buena sensibilidad y valores de señal elevados. Finalmente, en el ensayo E (SMX), se observó que la sensibilidad aumenta con la fuerza iónica hasta 20 mmol L⁻¹, disminuyendo después al aumentar ésta. Por tanto, se seleccionó 20 mmol L⁻¹ como óptima.

8.1.2.2 Efecto del pH

La Figura 41 muestra el efecto del pH (entre 4 y 9,5) en dos de los principales parámetros de los inmunoensayos, señal máxima (A_0) y sensibilidad (IC_{50}). En los ensayos A, B y C, se observa que tanto la señal como la IC_{50} aumentan con el pH a partir de pH 5. Así, las mejores relaciones A_0 / IC_{50} se obtuvieron a pH 6, seleccionando este pH para los tres ensayos. En el caso de la SSZ (ensayo D), se observó que la sensibilidad y la señal mejoraban al aumentar el pH del medio, especialmente a partir de pH 7,5, por lo que se seleccionó 8,5 como pH más apropiado. En el inmunoensayo para SMX se pudo observar que la IC_{50} aumentaba con el pH, mientras que en el intervalo pH 5,5-6,5 las señales eran elevadas. Así, la mejor relación A_0 / IC_{50} se obtuvo a pH 5,5, estableciendo éste como óptimo.

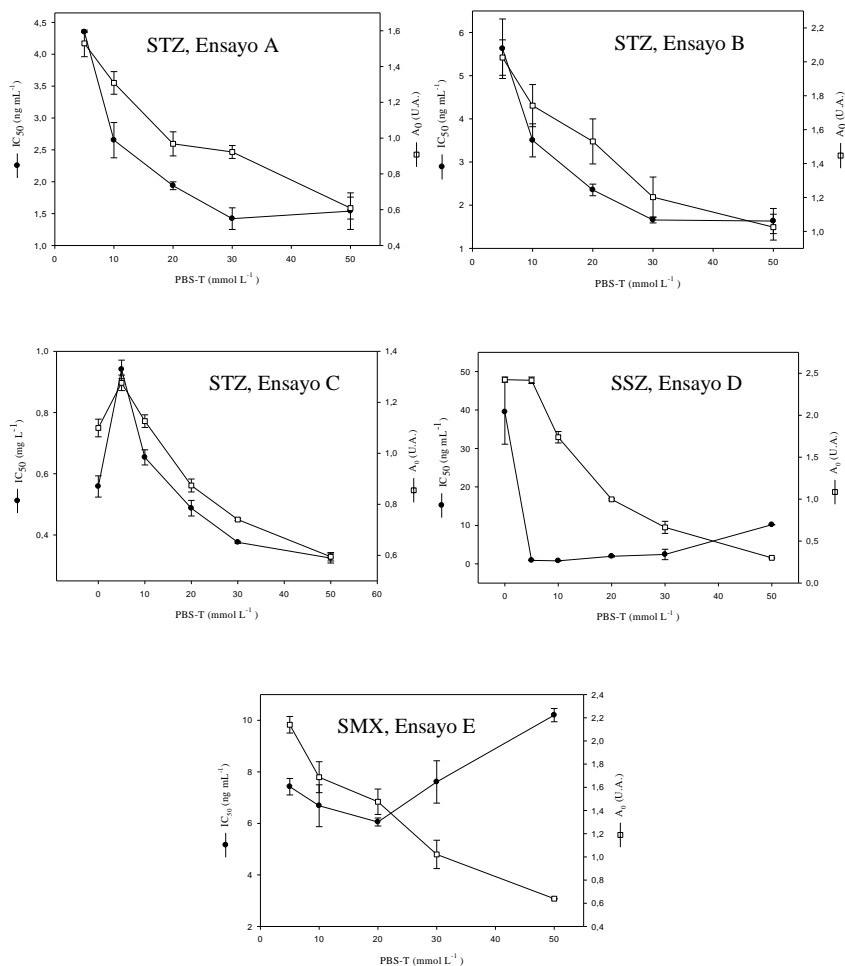


Figura 40. Efecto de la fuerza iónica en las características de los ELISAs para sulfonamidas

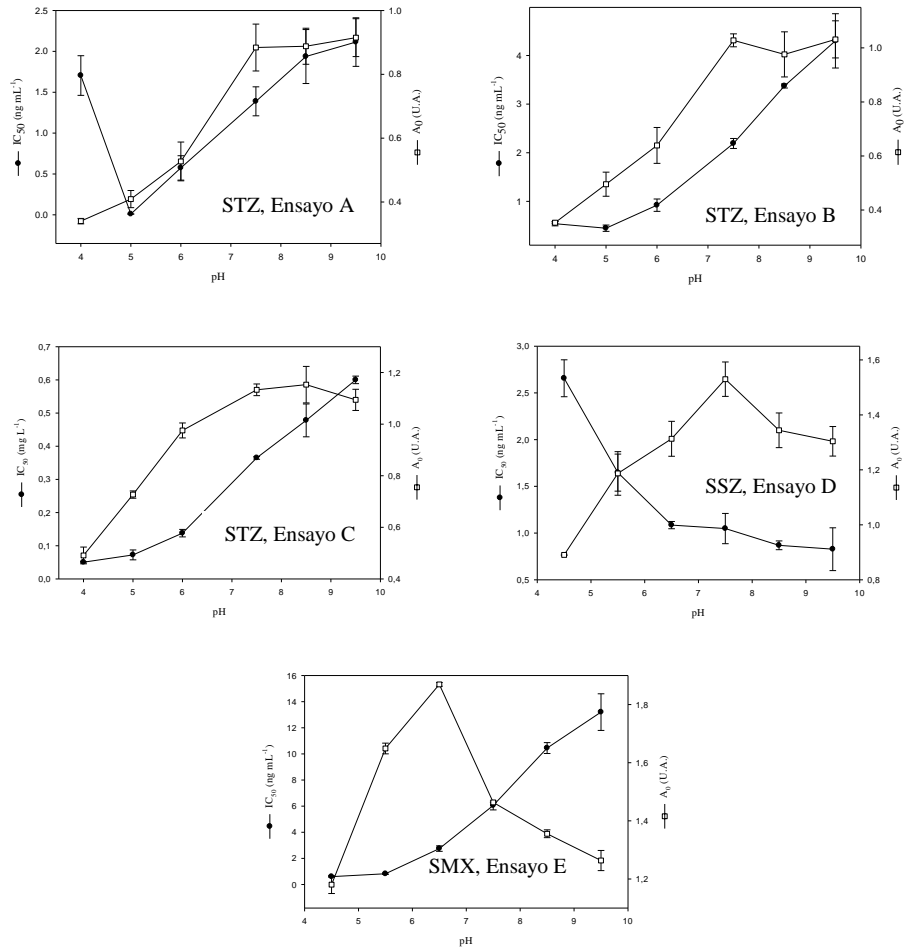


Figura 41. Efecto del pH en las características de los ELISAs para sulfonamidas

8.1.2.3 Efecto de la concentración de tensoactivo

El Tween 20 es un tensoactivo no iónico, comúnmente usado en los protocolos de inmunoensayo para evitar interacciones inespecíficas o ruido de fondo, siendo 0,05% (en placa) la concentración más utilizada. Sin embargo, dependiendo del analito, la concentración de detergente puede influir de modo diverso en las características del ELISA.

Así, con las condiciones seleccionadas previamente, se procedió a estudiar el efecto de la concentración de Tween 20, observando que se alcanzaba peor señal y sensibilidad a medida que ésta aumentaba; dicho efecto era particularmente notable para concentraciones de Tween 20 superiores a 0,05% (Figura 42).

La ausencia de Tween 20 dio lugar a la IC_{50} más baja y la A_0 más alta para los ensayos con STZ; sin embargo, los ensayos A y B presentaban una gran señal inespecífica bajo estas condiciones, por lo que se optó por seleccionar un porcentaje de Tween 0,01% para ambos ensayos. Para el ensayo C los resultados más favorables se obtuvieron en ausencia de surfactante. En cuanto al efecto del Tween 20 en el ensayo D (SSZ), se observó que la sensibilidad era mayor a medida que aumentaba la concentración de tensoactivo hasta porcentajes del 0,1%; a partir de este nivel la sensibilidad no mejoraba. Por otro lado, la señal no presentó una tendencia clara en todo el intervalo de trabajo. Se seleccionó como óptimo un nivel de 0,1% en placa, ya que presentaba la mejor sensibilidad con un valor de señal más que aceptable. Para el ensayo de SMX (ensayo E), se observó un aumento en la sensibilidad entre 0 y 0,25% de Tween 20; posteriormente, tanto la sensibilidad como la señal disminuían a medida que

Se aumentaba el porcentaje de surfactante. Por ello, se seleccionó como óptima una concentración de 0,025% de Tween 20.

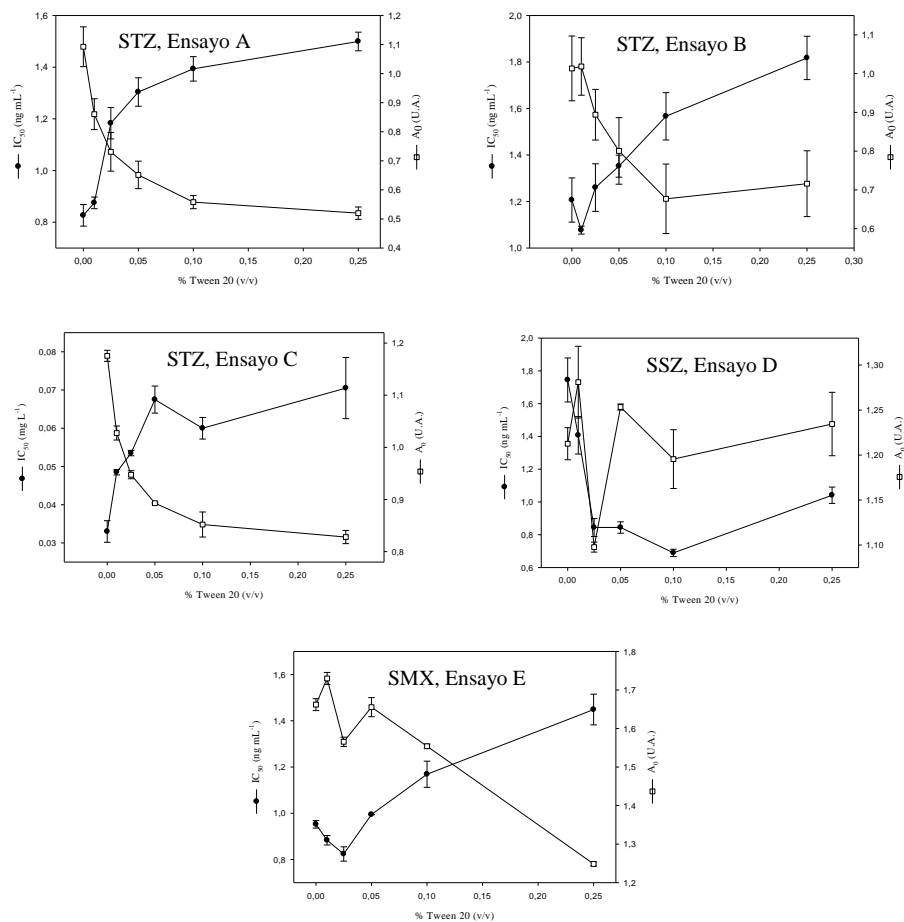


Figura 42. Efecto de la concentración de tensoactivo en las características de los ELISAs para sulfonamidas

8.1.2.4 Efecto del tiempo de incubación en la etapa competitiva

Bajo las condiciones previamente seleccionadas, se procedió a realizar la optimización del tiempo de competición con el objetivo de acortar la duración del ensayo. Para ello, se ensayaron tiempos de incubación de 15, 30, 45 y 60 min (Figura 43).

En general, se observa que al aumentar el tiempo de incubación disminuye la sensibilidad y mejora la señal, en particular para los ensayos de STZ, en los que tanto IC_{50} como A_0 aumentan gradualmente con el tiempo de incubación hasta 45 min. Para tiempos mayores, se observa una mejora de la sensibilidad. Por tanto, se optó por un periodo de incubación de 60 min como un compromiso entre la sensibilidad y la señal del ensayo. En el caso de SSZ (ensayo D) y SMX (ensayo E), también se observó un aumento de IC_{50} y A_0 a tiempos mayores; sin embargo, pudo establecerse una buena relación señal/sensibilidad para un tiempo de competición de 45 min para SSZ y 30 min para SMX.

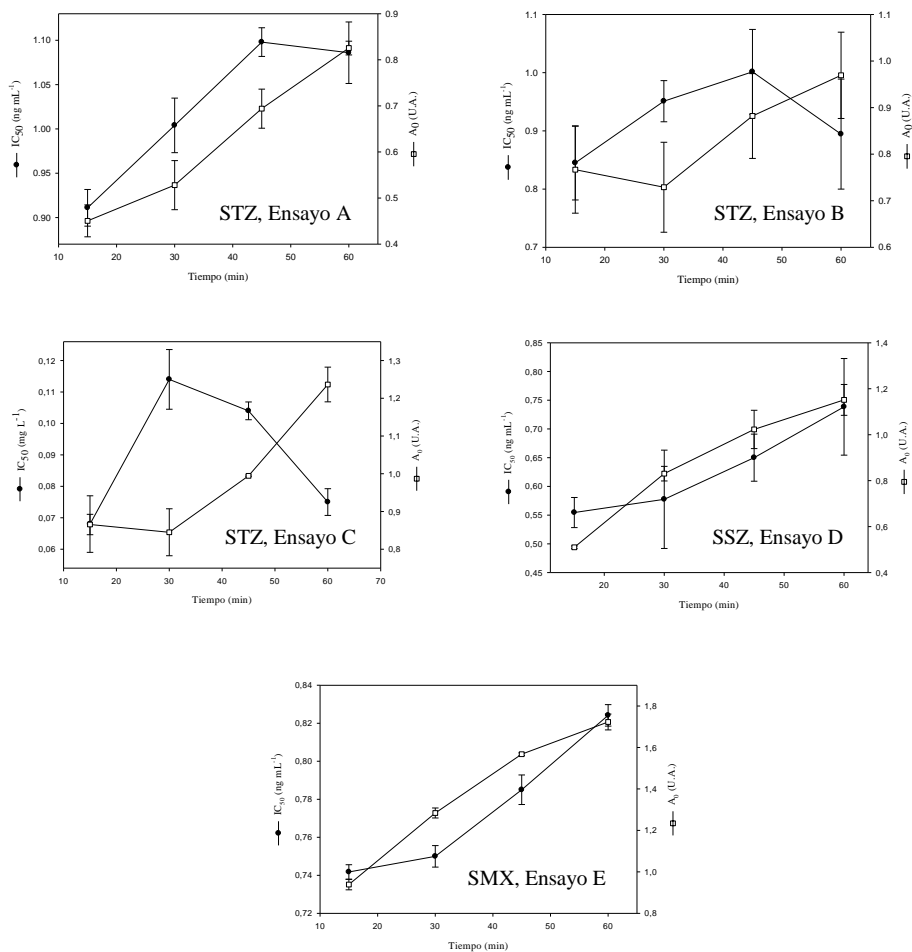


Figura 43. Influencia del tiempo de incubación de la etapa competitiva en las características de los ELISAs para sulfonamidas

8.1.2.5 Prestaciones analíticas de los ELISAs optimizados

Tras el proceso de optimización, se produjo una mejora de las prestaciones de los ELISAs, especialmente para SMX (ensayo E) y STZ (ensayo C), tal como puede observarse en la Figura 44.

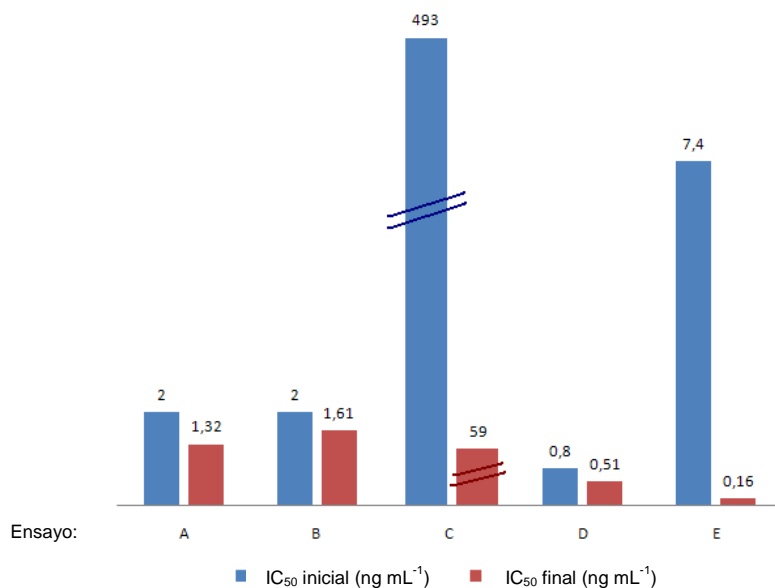


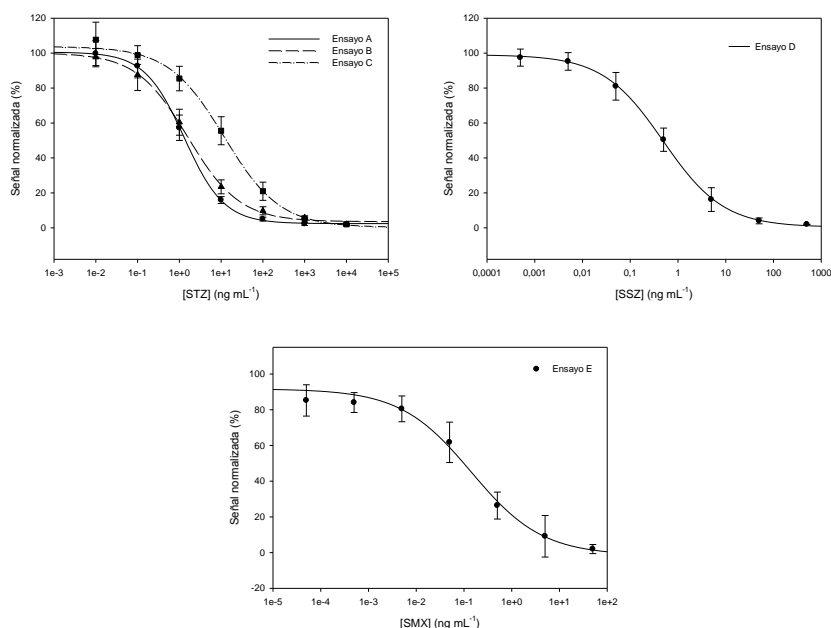
Figura 44. Representación gráfica de la mejora de la sensibilidad de los ELISAs tras la optimización

La Tabla 8 recoge las condiciones de trabajo seleccionadas como óptimas en los ELISAs desarrollados para las sulfonamidas estudiadas. Se observa que los inmunoensayos para STZ requieren condiciones de trabajo muy similares, mientras que los ensayos frente a otras sulfonamidas difieren en mayor medida, especialmente en lo que respecta a pH, concentración de Tween 20 y tiempo de competición.

Tabla 8. Condiciones óptimas de trabajo de los ELISAs para sulfonamidas

<i>Ensayo</i>	<i>Conjugado Tapizado/ suero</i>	<i>Analito</i>	<i>PBS (mmol L⁻¹)</i>	<i>pH</i>	<i>Tween 20 (%)</i>	<i>Duración etapa de competición (min)</i>
A	OVA S8 / S3-I	STZ	30	6	0,01	60
B	OVA S6 / S4-II	STZ	30	6	0,01	60
C	OVA S12 / S10-I	STZ	20	6	0	60
D	OVA S8 / S5-I	SSZ	10	8,5	0,1	45
E	OVA S8 / S12-II	SMX	20	5,5	0,025	30

Una vez desarrollados los ensayos ELISA, se obtuvieron las curvas de calibrado para todas las sulfonamidas (Figura 45). Así, se puede observar que es posible cuantificar hasta pocos ng mL⁻¹ de estos compuestos con una buena reproducibilidad, con valores medios de desviación estándar relativa entre 4% (ensayos A, B, C y D) y 6% (ensayo E).

**Figura 45.** Curvas patrón de los ELISAs para las tres sulfonamidas objeto de estudio (media y desviación de tres réplicas)

En la Tabla 9 se resumen las principales características analíticas de los inmunoensayos optimizados.

Tabla 9. Parámetros analíticos de los ELISAs desarrollados para sulfonamidas

<i>Ensayo</i>	<i>Inmunorreactivos</i>	<i>Analito</i>	<i>IC₅₀ (ng mL⁻¹)</i>	<i>LD (ng mL⁻¹)</i>	<i>RD (ng mL⁻¹)</i>
A	OVA S8 / S3-I	STZ	1,32	0,13	0,29 - 7,00
B	OVA S6 / S4-II	STZ	1,61	0,07	0,24 - 15,00
C	OVA S12 / S10-I	STZ	59,00	3,35	9,29-549,92
D	OVA S8 / S5-I	SSZ	0,51	0,01	0,06 - 3,58
E	OVA S8 / S12-II	SMX	0,16	1,20x10 ⁻⁴	5,56x10 ⁻³ - 1,07

LD (límite de detección): concentración que inhibe un 10% de la señal máxima

IC₅₀: concentración de analito que inhibe un 50% la señal máxima

RD (intervalo de trabajo o rango dinámico): concentraciones que inhiben la señal máxima entre 20% y 80%

8.1.2.6 Ensayos de selectividad

Tras la optimización, se estudió la selectividad de los ELISAs desarrollados para sulfonamidas frente a catorce compuestos pertenecientes a dicha familia. Los resultados se muestran en las Tablas 10 y 11.

Como puede observarse en la Tabla 10, los ensayos A y B mostraron un buen reconocimiento (RC >10%) hacia seis sulfonamidas: STZ, SSZ, PSTZ, SMP, SP y SMT para el ensayo A, y STZ, PSTZ, SMP, SP, SMT y SMX para el ensayo B. Además, el ensayo B es capaz de cuantificar otras sulfonamidas como SDM y SMZ a bajas concentraciones (IC₅₀ de 23,47 y 21,34 ng mL⁻¹, respectivamente). Como era de esperar, las de menor tamaño (SAN y SAM) no son detectadas por ninguno de los dos ensayos, aún a altas concentraciones. Las sulfonamidas que mostraron competición a menor concentración son aquellas que preservan en mayor grado la estructura del inmunógeno (STZ y SMT).

Tabla 10. Estudio de selectividad de los ensayos A y B

<i>Compuesto</i>		<i>Ensayo A^a</i>		<i>Ensayo B^b</i>	
		<i>IC₅₀</i> (ng mL ⁻¹)	<i>RC^c</i> (%)	<i>IC₅₀</i> (ng mL ⁻¹)	<i>RC</i> (%)
Sulfatiazol	STZ	1,32	100	1,61	100
Sulfadiazina	SDZ	63,36	2,08	716,62	0,22
Sulfasalazina	SSZ	3,12	42,18	105,12	1,53
N ⁴ -Ftalilsulfatiazol	PSTZ	9,32	14,13	6,38	25,26
Sulfanilamida	SAN	>10,000	<0,01	>10,000	<0,01
Sulfadimetoxina	SDM	>10,000	<0,01	23,47	6,86
Sulfacetamida	SAM	>10,000	<0,01	>10,000	<0,01
Sulfametazina	SMZ	>10,000	<0,01	21,34	7,55
Sulfisoxazol	SOX	>10,000	<0,01	73,53	2,19
Sulfametoxipiridazina	SMP	12,82	10,27	0,63	255,84
Sulfapiridina	SP	8,28	15,90	2,64	61,09
Sulfametizol	SMT	7,03	18,73	0,80	201,62
Sulfametoxazol	SMX	260,44	0,51	11,86	13,58
Sulfaguanidina	SG	>10,000	<0,01	138,18	1,17
Sulfamerazina	SMR	70,48	1,87	36,40	4,43

^a Ensayo A: OVA S8/S3-I

^b Ensayo B: OVA S6/S4-II

^c RC: reactividad cruzada calculada mediante la ecuación: $[IC_{50} (STZ)/IC_{50} (interferente)] \times 100$

Así, los ELISAs desarrollados usando anticuerpos policlonales permiten el reconocimiento de un conjunto de seis sulfonamidas a bajas concentraciones ($IC_{50} < 13 \text{ ng mL}^{-1}$), mostrando valores de LD entre 0,13 y 1,28 ng mL^{-1} para el ensayo A, y 0,07 y 1,21 ng mL^{-1} para el ensayo B. Cabe destacar que las seis sulfonamidas presentan una sensibilidad similar, lo que resulta muy útil a la hora de desarrollar e interpretar los resultados analíticos de ambos ensayos.

La selectividad del ensayo C fue inferior (Tabla 11), presentando reactividad cruzada superior al 10% frente a nueve sulfonamidas (STZ, SDZ, PSTZ, SDM, SAM, SMP, SP, SMT y SMX), de modo que se trata de un ensayo genérico. Hay que señalar que, antes de la optimización del

ensayo, el número de sulfonamidas detectado era de once, aunque no todas mejoraron su IC₅₀ en la misma proporción con la optimización.

Tabla 11. Estudio de selectividad del ensayo C

<i>Compuesto</i>		<i>Ensayo C^a</i>	
		<i>IC₅₀</i> (<i>ng mL⁻¹</i>)	<i>RC^b</i> (%)
Sulfatiazol	STZ	59,00	100
Sulfadiazina	SDZ	584,16	10,10
Sulfasalazina	SSZ	1.560,85	3,78
N ⁴ -Ftalilsulfatiazol	PSTZ	263,75	22,37
Sulfanilamida	SAN	1.027,87	5,74
Sulfadimetoxina	SDM	453,50	13,01
Sulfacetamida	SAM	417,55	14,13
Sulfametazina	SMZ	7.763,16	0,76
Sulfisoxazol	SOX	1.076,64	5,48
Sulfametoxipiridazina	SMP	27,54	214,27
Sulfapiridina	SP	265,41	22,23
Sulfametizol	SMT	245,32	24,05
Sulfametoxazol	SMX	287,95	20,49
Sulfaguanidina	SG	1.586,02	3,72
Sulfamerazina	SMR	>10.000	<0,01

^a Ensayo C: OVA S2/S10-I

^b RC: reactividad cruzada calculada mediante la ecuación: [IC₅₀ (STZ)/IC₅₀ (interferente)]x100

Como puede observarse en este ensayo, los valores de IC₅₀ son superiores a los obtenidos en los inmunoensayos A y B, pero se ha conseguido el reconocimiento de un mayor número de analitos, que además presentan un nivel de sensibilidad muy similar entre sí.

Se puede concluir que se han desarrollado con éxito tres ELISAs genéricos (ensayos A, B y C) para la determinación de sulfonamidas, con muy buena sensibilidad. Además, son comparables en cuanto a capacidad de

reconocimiento y sensibilidad, a otros ensayos descritos previamente en la literatura (Tabla 12).

Comparando las características analíticas de los ensayos aquí desarrollados, cabe señalar que los resultados obtenidos mediante el ensayo A (OVA-S8/S3-I) fueron excelentes, en términos de selectividad y sensibilidad. Por otro lado, a la vista de los límites de detección alcanzados por distintos ELISAs de carácter específico (100 ng mL^{-1} ²⁰³, $6\text{-}21 \text{ ng mL}^{-1}$ ²⁰⁴ y $0,03 \text{ ng mL}^{-1}$ ²⁰⁵) o genérico (24 ng mL^{-1} ²⁰⁶, $8,2 \text{ ng mL}^{-1}$ ²⁰⁷ y 3 ng mL^{-1} ²⁰⁸) se puede concluir que los ensayos A y B para STZ presentan una elevada sensibilidad. El ensayo C resultó menos sensible pero, en cambio, presenta un carácter más genérico.

Con posterioridad a la obtención de nuestros resultados, Ermolenko *et al.*²⁰⁹ publicaron el desarrollo de un ELISA indirecto multirresiduo basado en anticuerpos policlonales. Como inmunógeno emplearon ácido N-sulfanil-4-aminobutírico, el cual mimetiza la parte común de las sulfonamidas. Así, los anticuerpos policlonales obtenidos permiten la detección del propio ácido N-sulfanil-4-aminobutírico (ELISA competitivo

²⁰³ Hasnoot, W., Du Pre, J., Cazemier, G., Kemmers-Voncken, A., Verheijen, R., Jansen, B.J.M. *Food. Agric. Immunol.* 12 (2000) 127.

²⁰⁴ Lee, N., Holtzapple, C.K., Muldoon, M.T., Deshpande, S.S., Stanker, L.H. *Food Agric. Immunol.* 13 (2001) 5.

²⁰⁵ Pastor-Navarro, N., García-Bover, C., Maquieira, A., Puchades, R. *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 1088.

²⁰⁶ Ermolenko, D.N., Eremin, S.A., Mart'ianov, A.A., Zherdev, A.V., Dzantiev, B.B. *Anal. Lett.* 10 (2007) 1047.

²⁰⁷ Franek, M., Diblikova, I., Cernoch, M., Vass, M., Hruska, K. *Anal. Chem.* 78 (2006) 1559.

²⁰⁸ Cliquet, P., Cox, E., Haasnoot, W., Scacht, E., Goddeeris, B.M. *Anal. Chim. Acta* 494 (2003) 21.

²⁰⁹ Ermolenko, D.N., Eremin, S.A., Mart'ianov, A.A., Zherdev, A.V., Dzantiev, B. *Anal. Lett.* 40 (2007) 1047.

indirecto) con un LD de 0,03 ng mL⁻¹, pudiendo determinar 11 sulfonamidas a concentraciones entre 0,1 y 37 ng mL⁻¹.

Tabla 12. Inmunoensayos genéricos para sulfonamidas

a) Ensayos genéricos desarrollados

<i>Ensayo</i>	<i>Tipo anticuerpos</i>	<i>S</i>	<i>Valores IC₅₀ (ng mL⁻¹)</i>	<i>Año</i>
A	Policlonal	6	1,32-12,82	2007
B	Policlonal	6	1,61-11,86	2007
C	Policlonal	9	59,00-584,16	2007

S: n° sulfonamidas detectadas

b) Otros inmunoensayos genéricos

<i>Autor</i>	<i>Tipo anticuerpos</i>	<i>S</i>	<i>Valores IC₅₀ (ng mL⁻¹)</i>	<i>Año</i>
Sheth ²¹⁰	Policlonal	11	20-21.600	1991
Assil ²¹¹	Policlonal	9	32-38.000	1992
Franek ²¹²	Policlonal	17	0,4-105	2006
Ermolenko ²¹³	Policlonal	11	0,1-37*	2007
Adrian ²¹⁴	Policlonal	7	1,30-14,05	2009
Muldoon ²¹⁵	Monoclonal	8	< 10	1999
Haasnoot ²¹⁶	Monoclonal	8	0,3-40	2000
Cliquet ²¹⁷	Monoclonal	5	9-100	2003
Korpimaki ²¹⁸	Recombinante	18	0,019-13	2004

S: n° sulfonamidas detectadas, * Límite de Detección

²¹⁰ Sheth, H.B., Sporns, P. *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991) 1696.

²¹¹ Assil, H.I., Sheth, H., Sporns, P. *Food Res. Int.* 25 (1992) 343.

²¹² Franek, M., Diblikova, I., Cernoch, I., Vass, M., Hruska, K. *Anal. Chem.* 78 (2006) 1559.

²¹³ Ermolenko, D.N., Eremin, S.A., Martianov, A.A., Zherdev, A.V., Dzantiev, B. *Anal. Lett.* 40 (2007) 1047.

²¹⁴ Adrian, J., Font, H., Diserens, J.M., Sánchez-Baeza, F., Marco, M.P. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 385.

²¹⁵ Muldoon, M.T., Font, I.A., Beier, R.C., Holtzapple, C.K., Young, C.R., Stanker, L.H. *Food Agric. Immunol.* 11 (1999) 117.

²¹⁶ Haasnoot, W., Cazemier, G., Du Pre, J., Kemmers-Voncken, A., Bienenmann-Ploum, Verheijen, R. *Food Agric. Immunol.* 12 (2000) 15.

²¹⁷ Cliquet, P., Cox, E., Haasnoot, W., Schacht, E., Goddeeris, B.M. *Anal. Chim. Acta* 494 (2003) 21.

²¹⁸ Korpimaki, T., Hagren, V., Brockmann, E.C., Tuomola, M. *Anal. Chem.* 76 (2004) 3091.

Tabla 12 (cont.)

c) Kits comerciales

Nombre	Metodología	S	Valores IC ₅₀ (ng mL ⁻¹)
Qflex Kit ²¹⁹	Inmunoquímica	20	8,5-101,7
Charm II ²¹²	RIA	6-14*	4-100
SulfaMRL ^{220**}	RIA	4	40-94
Gentaur ²²¹	Inmunoquímica	5	1-10

S: nº sulfonamidas detectadas, *depende de la matriz, ** Charm II en leche

Mención especial merece el trabajo de Franek *et al.*²²². Estos autores desarrollaron una nueva estrategia de síntesis de inmunógenos con alta capacidad de reconocimiento. Así, mediante un ELISA directo lograron detectar individualmente hasta diecisiete sulfonamidas con sensibilidades ajustadas a los LMR establecidos en la legislación.

Recientemente, Adrian *et al.*²²³ han descrito un ensayo genérico capaz de determinar las sulfonamidas más frecuentemente utilizadas en veterinaria, en cumplimiento con la regulación europea EC 2377/90. El ensayo reconoce siete sulfonamidas con valores de IC₅₀ comprendidos entre 1,30 y 14,05 ng mL⁻¹, resultados muy similares a los presentados en esta tesis.

Al comparar las prestaciones de los ensayos genéricos desarrollados con las proporcionadas por los kits comerciales (Tabla 12c), se observa que

²¹⁹ Pastor-Navarro, N., Gallego-Iglesias, E., Maquieira, A., Puchades, R. *Talanta* 71 (2007) 923.

²²⁰ http://www.charm.com/images/stories/pdf/charmII/charmII_milk_mrl.pdf

²²¹ http://www.gentaur.com/sulfonamides_residues_elisa_kit.htm

²²² Franek, M., Diblikova, I., Cernoch, I., Vass, M., Hruska, K. *Anal. Chem.* 78 (2006) 1559.

²²³ Adrian, J., Font, H., Diserens, J.M., Sánchez-Baeza, F., Marco, M.P. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 385.

los ensayos desarrollados superan a Charm II y Gentauro en términos de sensibilidad y número de sulfonamidas detectado, mientras que el Qflex Kit es capaz de reconocer a un mayor número de sulfonamidas, aunque con menor sensibilidad.

Por último, en el caso de los ensayos D y E (determinación de SSZ y SMX), se observa que los valores de reactividad cruzada obtenidos frente a otras sulfonamidas fueron despreciables (RC < 1,48% para el ensayo D y RC < 1,06% para el ensayo E), con lo que cabe resaltar su elevada especificidad (Tabla 13).

Asimismo, es destacable la elevada sensibilidad del ensayo para SSZ (ensayo D, LD = 0,01 ng mL⁻¹). Al comparar con los trabajos recogidos en la bibliografía para la determinación de esta sulfonamida utilizando HPLC, o en tándem con espectrometría de masas, se observa que los resultados obtenidos con el ensayo ELISA desarrollado son realmente buenos. Así, mediante métodos cromatográficos, Bugge *et al.*²²⁴ detectan SSZ en suero con un nivel de cuantificación entre 0,1 y 12 mg L⁻¹ y Gupta *et al.*²²⁵ mencionan niveles de SSZ en plasma situados entre 2,5 y 47,1 mg L⁻¹. Más recientemente, Palumbo *et al.*²²⁶ describen un método capaz de alcanzar una sensibilidad de hasta 5 ng mL⁻¹. Así pues, este ensayo es, según nuestro conocimiento, el primer inmunoensayo específico para la determinación de SSZ descrito en la literatura.

²²⁴ Bugge, C.J., Gautam, S.R., Parke, L.E., Mason, J.T., García, D.B. *J. Pharm. Sci.* 79 (1990) 1095.

²²⁵ Gupta, V., Jani, J.P., Jacobs, S., Levitt, M., Fields, L., Awasthi, S., Xu, B.H., Sreevardhan, M., Awasthi, Y.C., Singh, S.V. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 36 (1995) 13.

²²⁶ Palumbo, G., Bacchi, S., Primavera, L., Palumbo, P., Carlucci, G. *Biomed. Chromatogr.* 19 (2005) 50.

Tabla 13. Estudio de reactividad cruzada para los ensayos D y E

Compuesto	Ensayo D ^a		Ensayo E ^b		
	IC ₅₀ (ng mL ⁻¹)	RC ^c (%)	IC ₅₀ (ng mL ⁻¹)	RC (%)	
Sulfasalazina	SSZ	0,51	100,00	15,09	1,06
Sulfametoxazol	SMX	1.256,00	0,04	0,16	100
Sulfatiazol	STZ	33,14	1,48	204,26	0,08
N ^f -Ftalilsulfatiazol	PSTZ	40,36	1,21	57,14	0,28
Sulfapiridina	SP	110,87	0,44	268,71	0,06
Sulfadiazina	SDZ	2.340,35	0,02	136,34	0,12
Sulfametizol	SMT	>10.000	<0,01	42,11	0,38
Sulfacetamida	SAM	>10.000	<0,01	106,67	0,15
Sulfanilamida	SAN	>10.000	<0,01	411,24	0,04
Sulfisoxazol	SOX	>10.000	<0,01	806,18	0,02
Sulfametoxipiridazina	SMP	3.713,65	0,01	>10.000	<0,01
Sulfaguanidina	SG	>10.000	<0,01	1.589,51	0,01
Sulfamerazina	SMR	>10.000	<0,01	1.706,56	0,01
Sulfadimetoxina	SDM	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01

^a Ensayo D: OVA S8/S5-I

^b Ensayo E: OVA S8/S12-II

^c RC: reactividad cruzada calculada mediante la ecuación: [IC₅₀ (STZ)/IC₅₀ (interferente)]x100

Respecto a la determinación de SMX, los métodos más utilizados recogidos en la bibliografía son cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con varios detectores, especialmente espectrometría de masas (HPLC-MS)^{227,228} o espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS-MS)^{229,230}. También se han utilizado técnicas inmunoquímicas como ELISA^{231,232,233} y BIA^{234,235,236}.

²²⁷ Ye, S., Zhang, K.-W., Yao, Z.-W., Ma, D.-Y. *Dalian Haishi Daxue Xuebao* 33 (2007) 71.

²²⁸ Lindsey, M.E., Meyer, M., Thurman, E.M. *Anal. Chem.* 73 (2001) 4640.

²²⁹ Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.L. *Sci. Total Environ.* 225 (1999) 109.

²³⁰ Ye, S., Yao, Z., Na, G., Wang, J., Ma, D. *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 2360.

²³¹ Shen, W., Wu, G.-J., Li, H.-R., Guo, Z.-Q., Cui, S. *Food Agric. Immunol.* 16 (2005) 273.

²³² Shen, H., Wu, G., Su, P., Guo, Z. *Zhongguo Shouyi Kexue* 36 (2006) 336.

Los límites de detección para SMX recogidos en la bibliografía varían entre los 0,01 ng mL⁻¹ alcanzados por cromatografía²³⁰, con extracción previa del analito y preconcentración, los 0,15 ng mL⁻¹ obtenidos por BIA²³⁶, o los 0,067 ng mL⁻¹ conseguidos mediante ELISA²³³. Así pues, el ensayo E es, según la información recogida, el inmunoensayo más sensible (LD = 0,12 ng mL⁻¹) desarrollado hasta este momento para SMX.

8.1.3 Determinación de residuos de sulfonamidas en miel

Debido a la aparición de residuos de sulfonamidas en productos de origen animal destinados al consumo humano, como miel, leche, huevos, pescado y carne²³⁷, se decidió abordar la determinación de residuos de estos analitos en muestras de miel para evaluar el potencial analítico de los métodos desarrollados.

La miel es una matriz muy compleja, por lo que generalmente se utilizan disolventes orgánicos para extraer los residuos de sulfonamidas^{238,239}. Así, en primer lugar se evaluó el efecto de la

²³³ Feng, T.-T., Li, Z.-Y., Liu, Y.-B., Xu, W.-G., Guan, G.-Y., Han, S.-Q. *Tongweisu* 20 (2007) 20.

²³⁴ Haasnoot, W., Bienenmann-Ploum, M., Lamminmäki, U., Swanenburg, M., van Rhijn, H. *Anal. Chim. Acta* 552 (2005) 87.

²³⁵ Li, H., Cui, D.F., Liang, J.Q., Cai, H.Y., Wang, Y.J. *Chin. Chem. Lett.* 17 (2006) 1481.

²³⁶ Kalmykova, E.N., Melikhova, E.V., Eremin, S.A., Ermolaeva, T.N. *Antibiotiki I Khimioterapiya* 49 (2004) 8.

²³⁷ Adesiyun, A., Offiah, N., Lashley, V., Seepersadsingh, N., Rodrigo, S., Georges, K. *J. Food Protect.* 68 (2005) 1501.

²³⁸ Posyniak, A., Zmudzki, J., Niedzielska, J., Sniegocki, T., Grzebalska, A. *Apiacta* 38 (2003) 249.

²³⁹ Diamandis, E.P., Christopoulos, T.K., *Immunoassay*, Academic Press, San Diego, 1996, 57.

concentración de distintos disolventes en las características de los inmunoensayos A, B y C. A continuación, se procedió al estudio del procedimiento de extracción y, por último al análisis de las muestras.

8.1.3.1 Tolerancia a disolventes orgánicos

Inicialmente, se llevó a cabo un análisis de tolerancia a disolventes orgánicos utilizando los inmunoensayos A y B, por presentar sensibilidad e intervalos de trabajo superiores a los del ensayo C.

Los disolventes orgánicos tienen la capacidad de interferir en las propiedades físico-químicas de las proteínas^{240,241,242,243}. Los efectos de estos disolventes se atribuyen generalmente a los cambios en las interacciones no covalentes de las proteínas, incluyendo la solvatación de grupos iónicos y dipolos, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Estas alteraciones pueden modificar la estructura terciaria de las proteínas provocando, en mayor o menor grado, su desnaturalización.

La proporción de las regiones hidrofóbicas e hidrofílicas de la superficie de una proteína determina la conformación que ésta mantiene en un disolvente. Para estabilizar la estructura nativa de la proteína, esta proporción debe tener un cierto valor, ya que pequeños cambios provocan

²⁴⁰ Klibanov, A.M. *Chem. Technol.* 16 (1986) 354.

²⁴¹ Dordick, J.S. *Enz. Microbiol. Technol.* 11 (1989) 194.

²⁴² Khmelnsky, Y.L., Rich, J.O. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3 (1999) 47.

²⁴³ Magner, E., Klibanov, A.M. *Biotechnol. Bioeng.* 46 (1995) 175.

un reordenamiento de los puentes de hidrógeno, lo que resulta en modificaciones conformacionales de la molécula^{244,245}.

La afinidad de un anticuerpo está relacionada con la polaridad del disolvente y la solubilidad del hapteno en el mismo²⁴⁶. Sin embargo, en un estudio sobre el efecto del tipo de disolvente en la interacción antígeno-anticuerpo utilizando inmunoglobulinas anti-testosterona²⁴⁷, se observó que la afinidad aparente está inversamente relacionada con la masa molecular del disolvente, aunque no se encontró correlación entre dicha afinidad y algunas propiedades de los disolventes tales como constante dieléctrica, polaridad y momento dipolar. Esto sugiere que la inhibición del enlace puede relacionarse con la capacidad del disolvente de desplazar la capa de agua que rodea al hapteno. En dicho estudio se observó un aumento en la capacidad de reconocimiento del anticuerpo a medida que se reducía la concentración de algunos disolventes.

La mayor parte de los estudios de tolerancia de los anticuerpos frente a los medios orgánicos han sido desarrollados utilizando la técnica ELISA, donde la necesidad de extraer los analitos de la muestra para su análisis exige usar disolventes miscibles en agua, normalmente a bajas concentraciones.

En general, en los formatos en placa ELISA, en raras ocasiones se pueden utilizar concentraciones de disolventes orgánicos miscibles con agua superiores al 10% (v/v). La sensibilidad en medio orgánico es inferior a la

²⁴⁴ Avbelj, F., Moul, J. *Biochemistry* 34 (1995) 755.

²⁴⁵ Carra, J.H., Privalov, P.L. *FASEB J.* 10 (1996) 67.

²⁴⁶ Stocklein, W., Gebbert, A., Schmid, R.D. *Anal. Lett.* 23 (1990) 1465.

²⁴⁷ Giraudi, G., Baggiani, C. *Biochim. Biophys. Acta* 1157 (1993) 211.

alcanzada en medio acuoso, pero se ha demostrado que la unión antígeno-anticuerpo es posible en estos medios²⁴⁸.

Así pues, el uso de disolventes orgánicos en los inmunoensayos en placa debe ser estudiado para conocer la respuesta de los inmunorreactivos en dichos medios.

En primer lugar se obtuvieron las curvas patrón utilizando STZ como analito y diferentes porcentajes (entre 0 y 20% (v/v) en placa) de metanol, acetonitrilo, acetona, DMSO e isopropanol, ya que estos son los disolventes más comúnmente utilizados como extractantes y eluyentes para la determinación de sulfonamidas en distintos tipos de muestras.

Se observó una disminución de la señal (A_0) y de la sensibilidad al aumentar el porcentaje de disolvente utilizado. En general, los distintos disolventes empleados fueron tolerados hasta un 5% (Figuras 46 y 47). Los disolventes mejor tolerados fueron metanol y acetona, al mantener una buena sensibilidad hasta porcentajes de un 5%, mientras que acetonitrilo y DMSO ofrecieron los peores resultados, provocando una mayor disminución de la sensibilidad para un mismo porcentaje de disolvente (5%).

²⁴⁸ Penalva Villegas, J. En: *Inmunoensayos en medios orgánicos para el análisis en línea de plaguicidas*, Tesis doctoral UPV, Valencia, 2000, 49.
<http://dspace.upv.es/xmlui/bitstream/handle/10251/4283/tesisUPV1211.pdf?sequence=1>

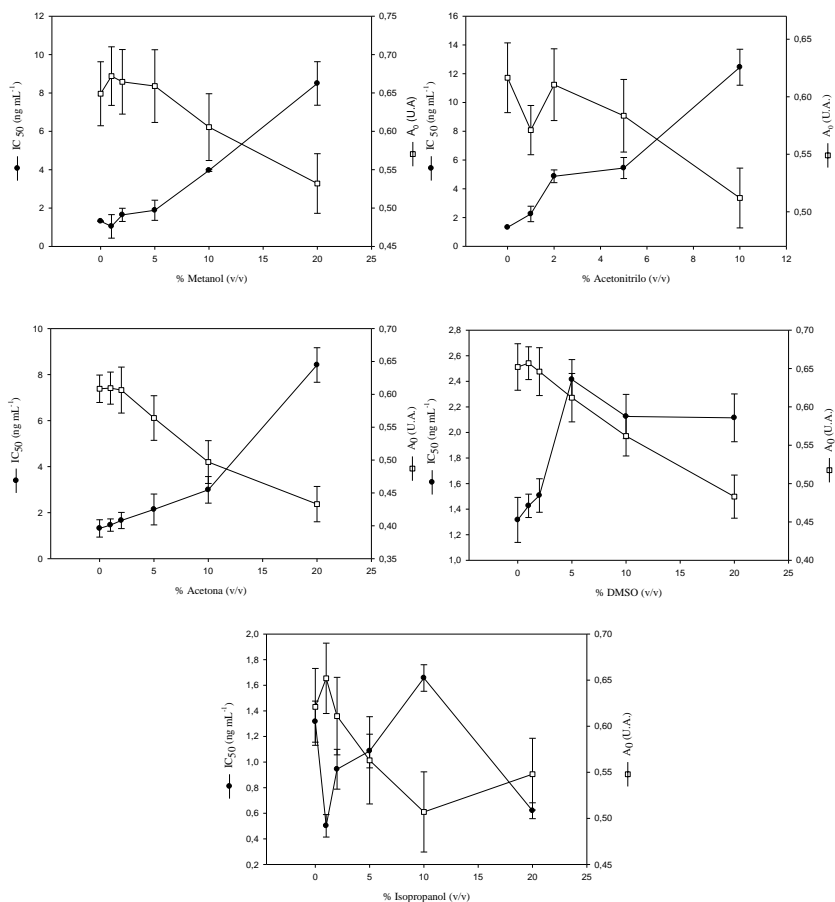


Figura 46. Estudio de la tolerancia a disolventes orgánicos del ensayo A

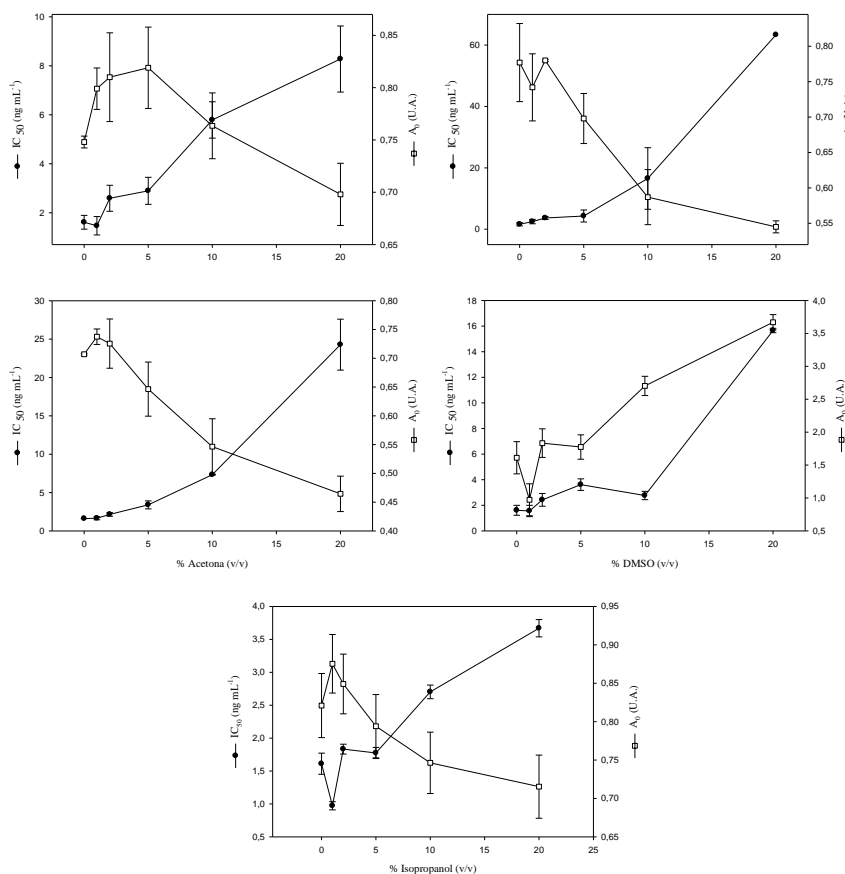


Figura 47. Estudio de la tolerancia a disolventes orgánicos del ensayo B

Dado que el metanol demostró ser uno de los disolventes mejor tolerados, y que es uno de los más empleados para extracción de sulfonamidas en mieles, se procedió a estudiar su efecto en el sistema sulfatiazol. A continuación, se presentan las curvas patrón (Figura 48) para la determinación de STZ en metanol al 5% (v/v) y una comparación entre las características de los ensayos A y B en tampón y en medio metanólico (Tabla 14).

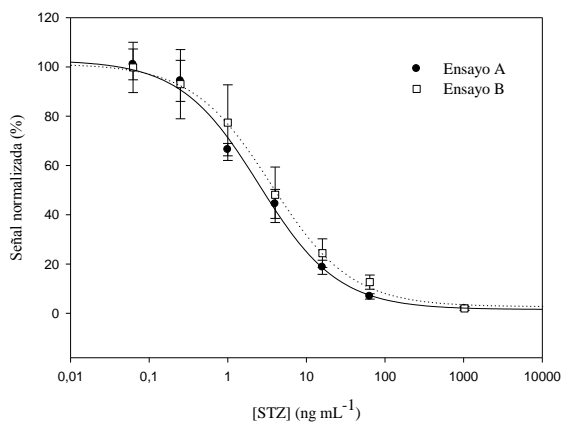


Figura 48. Curvas patrón para STZ en medio metanólico. (PBS-T/metanol, 5% v/v en placa). Ensayo A: OVA-S8/S3-I, Ensayo B: OVA-S6/S4-II.

Tabla 14. Comparación de las características de los ELISAs en tampón PBS y en medio metanólico^a.

<i>Ensayo</i>	<i>Medio</i>	<i>IC₅₀</i> (<i>ng mL⁻¹</i>)	<i>LD</i> (<i>ng mL⁻¹</i>)	<i>RD</i> (<i>ng mL⁻¹</i>)	<i>A₀</i> (<i>U.A.</i>)
A	Tampón	1,32	0,13	0,29 - 7,00	0,83
	Metanólico	2,50	0,25	0,57 - 13,60	0,81
B	Tampón	1,61	0,07	0,24 - 15,00	0,81
	Metanólico	3,55	0,34	0,80 - 21,80	0,79

^a PBS/metanol, 5% v/v en placa

Ensayo A: OVA-S8/S3-I, Ensayo B: OVA-S6/S4-II

LD (límite de detección): concentración que inhibe un 10% de la señal máxima

IC₅₀: concentración de analito que inhibe un 50% la señal máxima

RD (intervalo de trabajo o rango dinámico): concentraciones que inhiben la señal máxima entre 20% y 80%

Como puede observarse, los ELISAs llevados a cabo en presencia de metanol mostraron una pequeña disminución de sensibilidad: el ensayo A resultó ser 1,9 veces menos sensible, mientras que el ensayo B lo fue 2,2 veces, en comparación con los resultados obtenidos en medio acuoso. Sin embargo, en el medio metanólico se amplía ligeramente el intervalo de trabajo, mientras la señal se mantiene estable.

Asimismo, los valores de IC_{50} tanto en tampón como en medio metanólico fueron mejores para el ensayo A, siendo las diferencias más acusadas para la mezcla metanólica. Por este motivo, se seleccionó el ensayo A para llevar a cabo el análisis de residuos de sulfonamidas en miel.

8.1.3.2 Estudio del procedimiento de extracción de muestras de miel

El procedimiento de extracción se evaluó utilizando muestras de miel que no contenían sulfonamidas, las cuales fueron fortificadas con STZ a nivel de 3 ng mL^{-1} en placa ($48 \text{ } \mu\text{g/kg}$ en miel).

Para evaluar el método de extracción se probaron dos tipos de cartuchos: un cartucho de SPE basado en partículas de sílice funcionalizadas con C18 (Strata C18-E 500 mg, recomendado para la extracción de compuestos orgánicos polares o hidrofóbicos en muestras acuosas), y otro basado en un polímero de estireno-divinilbenceno de superficie modificada (Strata-X 200 mg, adecuado para la obtención de altas recuperaciones de analitos polares y no polares) de Phenomenex. Los cartuchos Strata-X se probaron con dos procedimientos diferentes de extracción, los cuales

incluían pretratamiento con metanol y equilibrado con agua, pero diferían en el disolvente empleado para la elución (metanol o una mezcla metanol/acetonitrilo/agua/ ácido acético glacial en proporción 60:30:10:0,1 v/v). Los resultados obtenidos mostraron un alto efecto matriz en ambos casos, ya que las recuperaciones fueron superiores al 120%, por lo que se decidió no proseguir los ensayos con este tipo de cartucho.

La evaluación de los cartuchos Strata C18-E se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por diferentes autores^{249,250}, la cual incluía una etapa de hidrólisis de los azúcares en tampón acetato y elución con acetonitrilo. Los resultados obtenidos dieron recuperaciones superiores al 120%, con lo cual se rechazó la elución con acetonitrilo. Sin embargo, cuando la elución se realizó con metanol los resultados fueron buenos, con recuperaciones alrededor del 100%, lo cual confirma la elección de metanol como disolvente más adecuado para realizar los análisis de mieles mediante ELISA.

Para una extracción cuantitativa, el tratamiento de muestra se comenzó con una hidrólisis en tampón acetato, necesaria para liberar el STZ de los complejos que forma con los azúcares reductores de la miel. Dicha etapa se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Posyniak *et al*²⁴⁹.

A continuación se describe el procedimiento seguido para realizar la extracción de sulfonamidas en miel. Se tomaron 2,5 g de miel de abeja y se diluyeron con 12,5 mL de tampón acetato 0,1 mol L⁻¹ a pH 5. Tras agitar la disolución en vórtex, se introdujo en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos. Posteriormente se pasó la disolución a través de un cartucho Strata

²⁴⁹ Posyniak, A., Zmudzki, J., Niedzielska, J., Sniegocki, T., Grzebalska, A. *Apiacta* 38 (2003) 249.

²⁵⁰ Heering, W., Usleber, E., Dietrich, R., Märtlbauer, E. *Analyst* 123 (1998) 2759.

C18-E de Phenomenex 500 mg (previamente activado con 2 mL de metanol y equilibrado con 2 mL de tampón acetato), se lavó con 2 mL de tampón acetato para eliminar al máximo los componentes de la matriz de la muestra, y se dejó secar durante, aproximadamente, 1 minuto. Finalmente, el cartucho se eluyó con 2 mL de metanol, y el extracto metanólico se diluyó con agua hasta que el porcentaje de metanol en placa fue del 5% (v/v). En la Figura 49 se muestra un esquema del proceso de extracción.

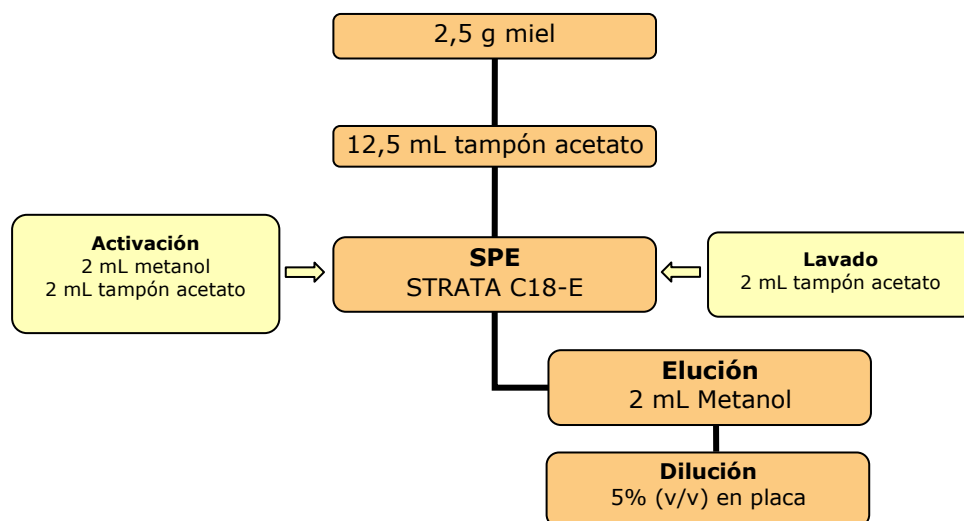


Figura 49. Esquema del proceso de extracción de STZ en muestras de miel

Para estudiar la recuperación obtenida utilizando dicho protocolo de extracción, se fortificaron once alícuotas de una muestra de miel milflores, de modo que la concentración de STZ resultante fuera del orden de 3 ng mL^{-1} en placa; dichas muestras fueron extraídas por separado y, posteriormente, analizadas mediante ELISA (ensayo A). Se obtuvieron valores de

recuperación entre un 97 y 125%, con un valor medio de 105% y una precisión del 15% (Tabla 15). Estos resultados indicaron que el procedimiento de extracción presentaba una buena recuperación a la concentración de analito estudiada.

Tabla 15. Recuperaciones obtenidas en el análisis de once alícuotas de miel dopadas con STZ (3 ng mL⁻¹, en placa)

<i>Muestra</i>	<i>[STZ] (ng mL⁻¹)^a</i>	<i>Recuperación (%)</i>
1	3,04 ± 0,51	101 ± 17
2	3,16 ± 0,39	105 ± 13
3	2,91 ± 0,42	97 ± 14
4	3,11 ± 0,42	104 ± 14
5	3,13 ± 0,45	104 ± 15
6	3,17 ± 0,48	106 ± 16
7	3,75 ± 0,54	125 ± 18
8	3,06 ± 0,51	102 ± 17
9	2,94 ± 0,48	98 ± 16
10	3,17 ± 0,60	106 ± 20
11	3,09 ± 0,39	103 ± 13

^a Media ± desviación estándar (n=3)

8.1.3.3 Análisis de muestras de miel

Una vez comprobada la ausencia de sulfonamidas (<LD del método) en una serie de muestras comerciales de miel, se procedió al dopaje de las mismas con un conjunto de sulfonamidas capaces de ser reconocidas con el ensayo A (STZ, SMP, SP, SMT, SSZ y PSTZ), a tres niveles de concentración (expresado como equivalentes de STZ, sulfonamida para la que se optimizó el ensayo A). Tras su posterior extracción (tal y como se ha descrito previamente) y análisis, se obtuvieron recuperaciones entre 75 y 129%, con un valor promedio del 104% para el conjunto de las muestras analizadas (Tabla 16).

Tabla 16. Recuperaciones obtenidas mediante el análisis de muestras de miel dopadas con una mezcla de STZ, SMP, SP, SMT, SSZ y PSTZ utilizando el ensayo A. Resultados expresados como equivalentes de STZ.

<i>eq STZ^a</i>	<i>1,5 ng mL⁻¹</i>	<i>3 ng mL⁻¹</i>	<i>4,5 ng mL⁻¹</i>
<i>Muestra^b</i>	<i>Recuperación (%)^c</i>	<i>Recuperación (%)</i>	<i>Recuperación (%)</i>
A	104 ± 14	108 ± 3	124 ± 8
B	84 ± 7	109 ± 5	129 ± 14
C	75 ± 15	92 ± 6	109 ± 12
D	93 ± 2	91 ± 10	119 ± 16
E	80 ± 11	98 ± 12	107 ± 17
F	129 ± 19	107 ± 23	112 ± 7

^a En placa

^b Mielles españolas de diferentes flores. Todas las muestras son comerciales: A, B, D, E y F milflores ; C romero

^c Las recuperaciones se muestran como media ± desviación estándar (n=3)

Los mejores resultados se obtuvieron a niveles de 3 ng mL⁻¹ equivalentes de STZ, una concentración cercana al valor de IC₅₀ en medio

metanólico (2,5 ng mL⁻¹). Los coeficientes de variación oscilaron entre 3 y 22%, pero sólo en tres casos superaron el 15%, obteniéndose un CV promedio del 11%.

El método propuesto muestra un límite de detección de 0,13 ng mL⁻¹ en el extracto, correspondiente a 2,08 µg Kg⁻¹ en miel, haciéndolo muy adecuado para el análisis por debajo de los LMRs permitidos, sin necesidad de preconcentración previa. Cabe destacar que el intervalo de trabajo del ELISA oscila entre 9,6 y 217,6 µg equivalentes de STZ por kg de miel. Así, sería posible cuantificar una muestra de miel por debajo del LMR establecido para sulfonamidas (100 µg Kg⁻¹)²⁵¹.

En resumen, el ensayo A muestra un gran potencial para su aplicación en *screening* de residuos de sulfonamidas en miel a concentraciones inferiores al LMR. Además, de acuerdo a nuestra información, este es el único ELISA que permite determinar simultáneamente varias sulfonamidas en miel.

Por otro lado, se pretendía comprobar si era posible determinar un mayor número de sulfonamidas en miel alcanzando buenas recuperaciones.

Para ello, se decidió utilizar el ensayo C (OVA-S2/S10-I), capaz de determinar nueve sulfonamidas con valores de reactividad cruzada superiores al 10% respecto a STZ: sulfatiazol, sulfadiazina, N⁴-ftalilsulfatiazol, sulfadimetoxina, sulfacetamida, sulfametizol, sulfapiridina, sulfametoxipiridazina y sulfametoxazol.

El primer paso del estudio consistió en establecer la tolerancia a metanol del ensayo C (Figura 50).

²⁵¹ Reglamento (CE) Nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de febrero de 2005.

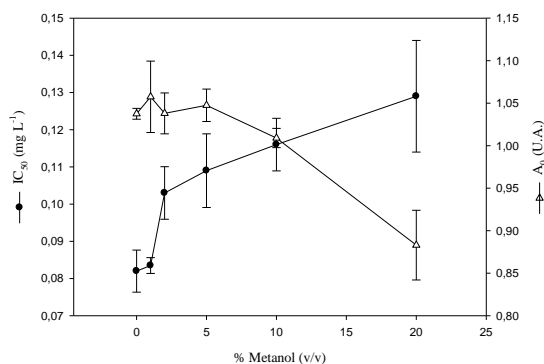


Figura 50. Estudio de la tolerancia a metanol del ensayo C

Tal y como puede verse en la Figura 50, la tolerancia a metanol fue superior a la observada para los ensayos A y B, obteniendo buenos resultados, en cuanto a señal y sensibilidad, hasta un 10% de disolvente. Este resultado indicaba que era posible aplicar el procedimiento de extracción establecido previamente.

Posteriormente, el ensayo C se aplicó a la determinación de sulfonamidas en mieles de distinto tipo y origen (España, Italia, Suecia, República Checa, Bélgica y Rumanía). Una vez comprobada la ausencia de sulfonamidas (<LD) en doce muestras distintas, se procedió al dopaje de las mismas con los nueve analitos reconocidos por el ensayo C, a tres niveles de concentración (expresado como equivalentes de STZ). Posteriormente se llevó a cabo la extracción y la determinación mediante ELISA (siguiendo el protocolo descrito anteriormente), obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Recuperaciones obtenidas al analizar muestras de miel dopadas con una mezcla de STZ, SDZ, PSTZ, SDM, SAM, SMP, SD, SMT y SMX utilizando el ensayo C. Resultados expresados como equivalentes de STZ.

<i>M</i> ^b	260 ng mL ⁻¹ ^a		130 ng mL ⁻¹		65 ng mL ⁻¹	
	<i>Eq</i> STZ (ng mL ⁻¹)	<i>R</i> (%)	<i>Eq</i> STZ (ng mL ⁻¹)	<i>R</i> (%)	<i>Eq</i> STZ (ng mL ⁻¹)	<i>R</i> (%)
A	272,85 ± 22,33	105	110,65 ± 19,03	85	67,46 ± 0,37	104
B	251,00 ± 18,03	97	147,30 ± 23,58	113	49,25 ± 7,28	76
C	195,16 ± 19,73	75	129,67 ± 0,18	100	77,35 ± 9,04	119
I	181,19 ± 2,32	70	116,51 ± 14,43	90	64,35 ± 2,48	99
II	200,12 ± 21,56	77	108,51 ± 0,34	83	70,33 ± 5,59	108
III	225,22 ± 22,30	87	160,68 ± 4,60	124	64,33 ± 5,20	99
IV	182,53 ± 13,81	70	155,66 ± 12,61	120	54,99 ± 3,07	85
V	241,37 ± 4,71	93	92,63 ± 8,39	71	76,31 ± 11,14	117
VI	274,51 ± 23,45	106	152,43 ± 12,31	117	65,80 ± 0,66	101
VII	245,74 ± 25,19	95	133,64 ± 14,60	103	64,31 ± 6,19	99
VIII	277,14 ± 3,88	107	99,88 ± 12,82	77	48,92 ± 9,12	75
IX	257,65 ± 1,15	99	127,34 ± 7,39	98	56,29 ± 1,32	87

^a En placa

^b Muestra: A, B, C: España; I, II, III: Italia; IV, V, VI: Suecia; VII: Rep. Checa; VIII: Bélgica; IX: Rumania

Los resultados se muestran como media ± desviación estándar (n=3)

Se obtuvieron recuperaciones entre un 70 y un 123 %, con un valor promedio de 95% y una desviación estándar del 15%. Los coeficientes de variación oscilaron entre 0,18 y 25%, pero sólo en nueve casos superaron el 15%, obteniéndose un CV promedio del 10%.

Así, los resultados obtenidos demuestran la utilidad del método inmunoquímico desarrollado que permite la determinación simultánea de sulfonamidas, con independencia de su número o del tipo de miel.

8.1.4 Determinación de residuos de SSZ en plasma humano

La SSZ es utilizada para tratar enfermedades que implican inflamación del intestino, como por ejemplo la artritis reumatoide, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. La concentración máxima de SSZ encontrada en plasma de voluntarios sanos oscila entre 6 y 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cabe destacar que la SSZ puede causar una reacción alérgica con distintos efectos secundarios entre el 3 y el 20% de los pacientes. Por tanto, se considera que una monitorización de la concentración de SSZ en plasma y de la función hepática, pueden ayudar a ajustar las dosis y decidir si el tratamiento debe ser interrumpido para evitar daños en el paciente²⁵².

Por ello, se consideró de interés estudiar la aplicación del inmunoensayo para SSZ (ensayo D) a la determinación de residuos de este analito en plasma humano.

8.1.5.1 Tolerancia al metanol

Debido a que los métodos para la extracción de residuos de sulfonamidas en plasma emplean generalmente metanol como extractante, se procedió a evaluar el efecto del contenido en metanol (0-20% v/v, en placa) en las características del ELISA (ensayo D: OVA-S8/S5-I). El ensayo toleró hasta un 5% metanol (v/v), presentando en este medio una ligera

²⁵² Pastor-Navarro, N., Gallego-Iglesias, E., Maquieira, A., Puchades, R. *Anal. Chim. Acta* 583 (2007) 377.

limitación en cuanto al intervalo de trabajo, pero una mejora de la sensibilidad, tal y como puede verse en la Tabla 18.

Tabla 18. Comparación de las características del ensayo D (OVA-S8/S5-I) en tampón y en medio metanólico^a.

<i>Ensayo</i>	<i>Medio</i>	<i>IC₅₀</i> (<i>ng mL⁻¹</i>)	<i>LD</i> (<i>ng mL⁻¹</i>)	<i>RD</i> (<i>ng mL⁻¹</i>)	<i>A₀</i> (<i>U.A.</i>)
D	Tampón	0,51	0,02	0,06 - 3,75	1,12
	Metanólico	0,27	0,01	0,02 - 2,60	1,15

^a PBS/metanol, 5% v/v en placa

LD (límite de detección): concentración que inhibe un 10% de la señal máxima

IC₅₀: concentración de analito que inhibe la señal máxima un 50%

RD (intervalo de trabajo o rango dinámico): concentraciones que inhiben la señal máxima entre 20% y 80%

Sin embargo, la curva patrón llevada a cabo en medio metanólico difiere de la obtenida en medio acuoso (Figura 51), por lo que los extractos de muestras biológicas deberán ser interpolados en la curva correspondiente a la calibración en medio metanólico (PBS/metanol, 5% v/v en placa).

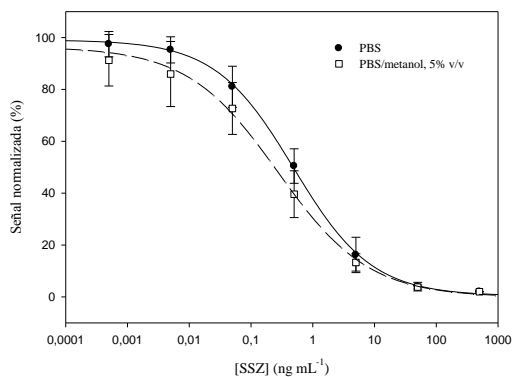


Figura 51. Curvas patrón para el ensayo D (OVA-S8/S5-I) en tampón y medio metanólico

8.1.4.2 Determinación de SSZ en muestras de suero fisiológico

Se procedió a analizar muestras de suero fisiológico dopadas a distintos niveles con SSZ, como un primer paso para la determinación de este analito en plasma humano.

Para ello, se obtuvieron las curvas de calibrado en tampón y en suero fisiológico; debido a las grandes diferencias encontradas entre ambas curvas, se realizó un ensayo para evaluar el efecto matriz debido al suero fisiológico. Así, se obtuvieron distintas curvas patrón conteniendo 0, 10, 20, 30, 40 y 50% de suero fisiológico en placa. Los resultados (Figura 52) mostraron que tanto la señal como la sensibilidad del ELISA dependen en gran medida de la fuerza iónica del medio, ya que disminuyen al aumentar el porcentaje de suero, tal y como se observó previamente en los estudios de optimización.

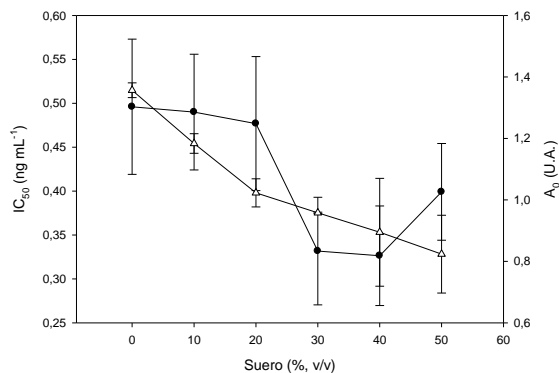


Figura 52. Efecto de la concentración de suero fisiológico

Por tanto, se escogió trabajar con un 10% de suero fisiológico en placa, ya que tanto la señal como la sensibilidad eran aceptables, y la curva de calibrado era coincidente con la obtenida en PBS (Figura 53).

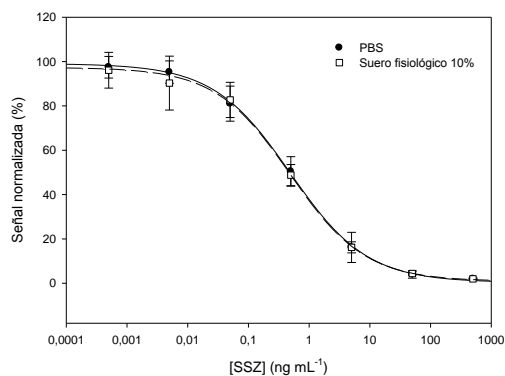


Figura 53. Curvas patrón para el ensayo D (OVA-S8/S5-I) en tampón y 10% suero fisiológico.

En estas condiciones se alcanzó un LD de 0,01 ng mL⁻¹, mejor que el obtenido en tampón. Los valores de IC₅₀ y el rango dinámico fueron

similares a los del medio tamponado ($IC_{50} = 0,49 \text{ ng mL}^{-1}$, $RD = 0,06 - 3,59 \text{ ng mL}^{-1}$)

Finalmente, diferentes alícuotas del suero de referencia fueron dopadas con SSZ a 4 niveles (0,5, 1, 1,5 y 2 ng mL^{-1}) y analizadas mediante ELISA, obteniéndose una recuperación media del 104% ($CV = 6\%$). Como se aprecia en la Tabla 19, pueden obtenerse muy buenos resultados realizando una dilución del suero al 10% como único tratamiento de muestra.

Tabla 19. Recuperaciones obtenidas al analizar suero fisiológico dopado con SSZ

<i>[SSZ] adicionada</i> (ng mL^{-1})	<i>[SSZ] determinada</i> (ng mL^{-1})	<i>Recuperación</i> (%)
0,5	$0,56 \pm 0,04$	112
1,0	$1,06 \pm 0,07$	106
1,5	$1,45 \pm 0,11$	97
2,0	$2,05 \pm 0,14$	103

Media \pm desviación estándar relativa (n=3)

8.1.4.3 Determinación de SSZ en muestras de plasma humano

Para evaluar el potencial analítico del método, éste se aplicó a muestras de plasma humano adquiridas a Sigma (Madrid, España). Para ello, el plasma fue dopado con SSZ a distintas concentraciones (de 5×10^{-2} hasta 5×10^4 , en placa).

En primer lugar, se obtuvieron curvas de calibrado con diluciones de plasma entre 1/100 y 1/1.000 en placa (Figura 54), siguiendo la estrategia utilizada para el suero fisiológico, detallada en el apartado anterior. Se

observó un aumento en la señal, pero la sensibilidad disminuyó considerablemente respecto a la obtenida en PBS. Por tanto, la dilución en agua no resultó ser adecuada como acondicionamiento de las muestras de plasma para su análisis mediante ELISA.

Para evitar el efecto matriz debido a proteínas u otros compuestos presentes en el plasma, se ensayaron dos procedimientos: precipitación con metanol y extracción en fase sólida (SPE) utilizando cartuchos Strata X-C.

Para la precipitación con metanol se empleó una modificación del procedimiento descrito por Palumbo *et al.*²⁵³ y Hansen²⁵⁴. El protocolo incluye la extracción de las muestras con metanol (1:2, v/v) para facilitar la precipitación de las proteínas, seguido de mezcla en vórtex y centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min. Una alícuota del sobrenadante (2/3 del volumen total) se diluye 1:10 (v/v) con agua desionizada antes de realizar el ELISA.

El tratamiento de extracción en fase sólida se llevó a cabo utilizando el procedimiento descrito por Huq *et al.*²⁵⁵ Las muestras de plasma dopado fueron diluídas 1:1 (v/v) con agua conteniendo H₃PO₄ al 2%. A continuación, se cargó 1 mL de esta disolución en un Cartucho Phenomenex Strata X-C, previamente activado con 1mL de metanol y equilibrado con 1 mL de agua desionizada. Se procedió al lavado del cartucho con 1 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹ y 1 mL de metanol, y se dejó secar durante, aproximadamente, 1 min. Finalmente, la SSZ se eluyó con 1 mL de metanol

²⁵³ Palumbo, G., Bacchi, S., Primavera, L., Palumbo, P., Carlucci, G. *Biomed.Chromatogr.* 19 (2005) 350.

²⁵⁴ Hansen, S.H. *J. Chromatogr.* 491 (1989) 175.

²⁵⁵ Huq, S., Dixon, A., Teuscher, J., Kallury, K. *LC-GC Europe* 16 (2003) 16.

conteniendo 5% (v/v) de amoniaco. El extracto metanólico fue diluído con agua desionizada hasta un 5% de metanol en placa (v/v).

Tal y como puede verse en la Figura 54, las curvas de calibrado obtenidas utilizando ambos procedimientos presentaron una sensibilidad similar: $IC_{50} = 0,44 \text{ ng mL}^{-1}$ en el caso del tratamiento con metanol y $0,43 \text{ ng mL}^{-1}$ en la extracción SPE.

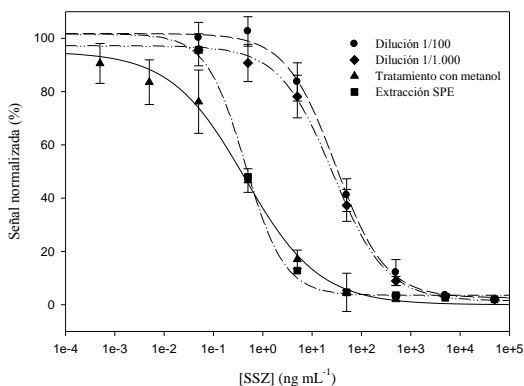


Figura 54. Evaluación de distintos tratamientos de muestra para la determinación de SSZ en plasma humano

Dado que el tratamiento con metanol permite llevar a cabo la extracción simultánea de un mayor número de muestras y reduce el tiempo de análisis, además del coste, en comparación con la extracción en fase sólida (SPE), se seleccionó este procedimiento como el más ventajoso para el tratamiento de las muestras.

Para evaluar la reproducibilidad del tratamiento de muestra, se fortificaron con SSZ 20 alícuotas de plasma humano, a distintos niveles: 60 ng mL^{-1} (1 ng mL^{-1} en placa) y 30 ng mL^{-1} ($0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ en placa). Todas las alícuotas fueron tratadas con metanol y analizadas por triplicado mediante ELISA. Los resultados se obtuvieron utilizando la curva en 5% de metanol

como curva de calibrado. Las recuperaciones obtenidas (Tabla 20) oscilaron entre 83 y 119%, con un resultado promedio del 99% y un CV=13%, lo que indica que todos los valores son aceptables y están en el intervalo considerado óptimo (80-120%). Por tanto, se puede concluir que el tratamiento de muestra empleado es eficiente y su reproducibilidad buena a las concentraciones estudiadas.

Teniendo en cuenta que las concentraciones de SSZ encontradas en plasma humano oscilan entre 6 y 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$, el ELISA desarrollado (ensayo D: OVA S8/S5-I) resulta muy adecuado para el análisis de SSZ en este tipo de matrices, dado que el inmunoensayo puesto a punto tiene una sensibilidad muy elevada.

Tabla 20. Recuperaciones obtenidas al analizar plasma humano dopado con SSZ

<i>Muestra</i>	<i>1 ng mL⁻¹</i>		<i>0,5 ng mL⁻¹</i>	
	<i>[SSZ][*]</i> <i>(ng mL⁻¹)</i>	<i>R</i> <i>(%)</i>	<i>[SSZ]</i> <i>(ng mL⁻¹)</i>	<i>R</i> <i>(%)</i>
1	0,97 ± 0,02	97	0,45 ± 0,01	90
2	1,15 ± 0,03	115	0,42 ± 0,04	83
3	1,17 ± 0,05	117	0,42 ± 0,02	84
4	0,88 ± 0,05	88	0,44 ± 0,05	87
5	1,15 ± 0,09	115	0,44 ± 0,03	88
6	0,91 ± 0,03	91	0,44 ± 0,02	87
7	1,11 ± 0,02	111	0,53 ± 0,05	105
8	1,09 ± 0,02	109	0,49 ± 0,03	98
9	1,19 ± 0,08	119	0,42 ± 0,02	83
10	0,96 ± 0,05	96	0,57 ± 0,03	113

* Media ± desviación estándar (n=3)

8.1.5 Determinación de residuos de SMX en aguas residuales

El SMX es una de las sulfonamidas más utilizadas en humanos (se prescribe para el tratamiento de malaria, conjuntivitis debida a la clamidia, toxoplasmosis e infecciones del tracto urinario) y ha sido frecuentemente detectada en aguas superficiales, subterráneas, e incluso en plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas. Por ello, para demostrar la utilidad del método desarrollado, se efectuó la determinación de residuos de este analito en dieciocho muestras de agua procedentes de plantas depuradoras ubicadas en la provincia de Valencia.

Las muestras se almacenaron a 4 °C, se filtraron por gravedad y se analizaron directamente, sin tratamiento de muestra alguno, mediante ELISA (ensayo E: OVA-S8/S12-II) como muestras ciegas. Los resultados pueden observarse en la Tabla 21.

El SMX no fue detectado en la mayoría de las muestras. Sin embargo, siete de ellas dieron positivo, con valores que oscilaron entre 0,02 y 0,11 ng mL⁻¹. Los resultados obtenidos demuestran la utilidad del método inmunoquímico desarrollado para la determinación de SMX en aguas.

A continuación, y para confirmar los resultados anteriores, las muestras libres de SMX se doparon a tres niveles (0,2 ng mL⁻¹, 0,5 ng mL⁻¹ y 1 ng mL⁻¹) y se analizaron mediante inmunoensayo en placa ELISA.

Tabla 21. Determinación de SMX en muestras de agua de depuradora mediante ELISA

<i>Muestra</i>	<i>[SSZ] determinada (ng mL⁻¹)</i>
1	0,02 ± 0,01
2	0,03 ± 0,01
3	0,11 ± 0,01
4	< LD
5	0,08 ± 0,01
6	0,07 ± 0,02
7	< LD
8	< LD
9	< LD
10	< LD
11	0,06 ± 0,01
12	< LD
13	< LD
14	< LD
15	0,06 ± 0,02
16	< LD
17	< LD
18	< LD

Media ± desviación estándar relativa (n=3)
Ensayo E (OVA S8/S12-II)

La Tabla 22 muestra los buenos valores de recuperación obtenidos, con un mínimo del 78% y un máximo del 112% (intervalo considerado óptimo). Asimismo, la recuperación media fue del 95%, 88% y 90%, para niveles de dopaje de 0,2, 0,5, y 1 ng mL⁻¹, respectivamente. El valor de recuperación media obtenido (91%, con desviación estándar de 7%) demuestra que este inmunoensayo en placa ELISA puede ser aplicado como método de control y cuantificación de residuos de SMX en aguas de depuradora a concentraciones de ng mL⁻¹.

Tabla 22. Recuperaciones obtenidas en el análisis de muestras de agua de depuradora (dopadas con SMX) utilizando el ensayo E

<i>M</i>	<i>0,2 ng mL⁻¹</i>		<i>0,5 ng mL⁻¹</i>		<i>1 ng mL⁻¹</i>	
	<i>[SMX]</i> [*] (<i>ng mL⁻¹</i>)	<i>R</i> (%)	<i>[SMX]</i> (<i>ng mL⁻¹</i>)	<i>R</i> (%)	<i>[SMX]</i> (<i>ng mL⁻¹</i>)	<i>R</i> (%)
4	0,211 ± 0,09	106	0,44 ± 0,08	88	0,90 ± 0,04	97
7	0,184 ± 0,04	92	0,47 ± 0,05	94	0,95 ± 0,04	102
8	0,223 ± 0,07	112	0,46 ± 0,07	92	0,98 ± 0,12	105
9	0,196 ± 0,06	98	0,42 ± 0,04	84	0,87 ± 0,20	94
10	0,175 ± 0,03	88	0,39 ± 0,09	78	0,81 ± 0,05	88
12	0,192 ± 0,05	96	0,46 ± 0,07	92	0,90 ± 0,11	97
13	0,168 ± 0,04	84	0,41 ± 0,05	82	0,83 ± 0,14	90
14	0,171 ± 0,04	86	0,43 ± 0,03	86	0,84 ± 0,13	91
16	0,186 ± 0,03	93	0,46 ± 0,13	92	0,90 ± 0,18	97
17	0,183 ± 0,02	92	0,44 ± 0,15	88	0,84 ± 0,33	91
18	0,195 ± 0,05	98	0,48 ± 0,04	96	1,03 ± 0,08	110

* Los resultados se muestran como media ± desviación estándar (n=3)

Para establecer la reproducibilidad *inter-día* de la metodología desarrollada, se utilizó un agua de depuradora dopada a tres niveles con SMX, que fue analizada utilizando el ensayo E durante cuatro días consecutivos (Tabla 23).

A pesar de la naturaleza de la matriz, las recuperaciones obtenidas oscilaron entre 80 y 109%, con un resultado promedio de 93%, lo que indica que todos los valores son aceptables y están en el intervalo considerado óptimo (80-120%). Asimismo, se obtuvo un coeficiente de variación *inter-día* del 8,22%. Por tanto, se puede concluir que el método desarrollado presenta una buena reproducibilidad *inter-día* a las concentraciones estudiadas y en el tipo de agua analizada.

Tabla 23. Reproducibilidad *inter-dia* en la determinación de SMX en agua de depuradora.

Dia	0,2 ng mL ⁻¹		0,5 ng mL ⁻¹		1 ng mL ⁻¹	
	[SMX] (ng mL ⁻¹)	R (%)	[SMX] (ng mL ⁻¹)	R (%)	[SMX] (ng mL ⁻¹)	R (%)
1	0,190 ± 0,04	95	0,47 ± 0,06	94	0,92 ± 0,05	92
2	0,193 ± 0,03	97	0,45 ± 0,04	90	0,84 ± 0,03	84
3	0,181 ± 0,02	91	0,42 ± 0,03	84	0,80 ± 0,04	80
4	0,217 ± 0,04	109	0,52 ± 0,07	104	0,91 ± 0,06	91

^a Los resultados se muestran como media ± desviación estándar (n=3)

A modo de recopilación, se puede decir que el método desarrollado para la determinación de SMX en aguas de depuradora es robusto y presenta una buena sensibilidad y recuperación, con un tratamiento de muestra sencillo, lo cual lo hace muy adecuado para la determinación de esta sulfonamida en aguas.

8.2 Tetraciclinas

8.2.1 ELISAs competitivos para tetraciclinas

Debido a los bajos títulos obtenidos en formato directo, en el desarrollo de los ensayos para tetraciclinas se empleó únicamente el formato indirecto, llevando a cabo la selección de inmunorreactivos mediante ensayos de titulación (Ver Anexo 2).

Las combinaciones suero/conjugado de tapizado que mostraron reconocimiento específico fueron utilizadas para llevar a cabo ensayos competitivos contra tres de las tetraciclinas más comunes: CTC, OTC y TC.

Los resultados se muestran en la Tabla 24. Para facilitar la observación, los haptenos tipo I aparecen con las letras en color azul, los tipo II en color rojo y los tipo III en verde.

Tabla 24. Valores de IC₅₀ (ng mL⁻¹) para tetraciclinas

suero conjug.	OVA CTC-1	OVA OTC-1	OVA TC-1	OVA CTC-2	OVA OTC-2	OVA CTC-3	OVA OTC-3	OVA TC-3	OVA TC-4
CTC-1 I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTC-1 II	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OTC-1 I	257 (CTC) >10.000 (OTC) >10.000 (TC)	-	-	-	-	-	-	-	-
OTC-1 II	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC-1 I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC-1 II	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTC-2 I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTC-2 II	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OTC-2 I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OTC-2 II	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTC-3 I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTC-3 II	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OTC-3 III	-	-	2.537 (CTC) 315 (TC) 4.508 (OTC)	-	-	-	> 10.000	> 10.000	-
OTC-3 IV	-	-	2.002 (CTC) 1079 (TC) 17.240 (OTC)	393 (CTC) 262 (TC) 1.240 (OTC)	-	-	> 10.000	> 10.000	-
TC-3 I	-	-	> 10.000	9,43 (CTC) 6,47 (TC) 492 (OTC)	-	-	-	> 10.000	-
TC-3 II	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC-4 I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC-4 II	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- = Ensayo sin competición, conjug. = conjugado, CTC = clortetraciclina, OTC = oxitetraciclina, TC = tetraciclina

De los resultados obtenidos con todas las combinaciones, cabe destacar el hecho de que ninguno de los sueros tipo II presentara competición (CTC-2, OTC-2). No obstante, los hatenos tipo II, al igual que los tipo I, resultaron adecuados como conjugados de tapizado. Por otro lado, los sueros CTC-I, TC-1, CTC-3 y TC-4 no presentaron competición en ninguna de las combinaciones ensayadas. Sin embargo, algunos de los sueros tipo III mostraron reconocimiento de uno o varios compuestos, obteniéndose un ensayo muy sensible para TC en el caso del par OVA CTC-2/TC-3 I ($IC_{50} = 6,47 \text{ ng mL}^{-1}$), aunque con poco carácter específico. Este resultado es similar al alcanzado previamente por Lang *et al.*²⁵⁶ (5 ng mL^{-1} , con alta reactividad cruzada para CTC, MNC y RTC).

Otro par seleccionado para llevar a cabo la optimización fue OVA CTC-1/OTC-1 I ($125 \text{ ng mL}^{-1}/1:500$), por presentar una gran selectividad frente a CTC. Esta combinación también ha sido utilizada, por otros miembros del grupo de investigación, en trabajos posteriores a la realización de esta tesis²⁵⁷.

8.2.2 Optimización y características de los ELISAs para tetraciclinas

Al igual que en el caso de las sulfonamidas, una vez establecidas las concentraciones de los inmunorreactivos para la determinación de CTC

²⁵⁶ Lang, B., Martlbauer, E., Terplan, G. *Arch Lebensmittelhyg* 43 (1992) 77.

²⁵⁷ Cháfer-Pericas, C., Maquieira, A., Puchades, R., Miralles, J., Moreno, A., Pastor-Navarro, N., Espinós, F. *Analytica Chimica Acta* 662 (2010) 177.

(OVA CTC-1 / OTC-1 I), se procedió a optimizar las condiciones del ensayo, con el fin de mejorar las prestaciones analíticas del mismo.

8.2.2.1 Efecto de la fuerza iónica

Para estudiar el efecto de la fuerza iónica se ensayaron concentraciones de PBS-T entre 5 mmol L^{-1} y 50 mmol L^{-1} (Figura 55).

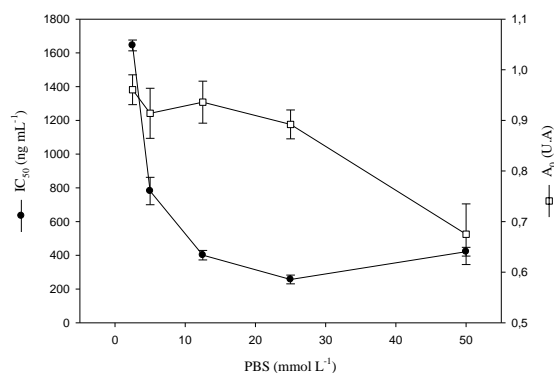


Figura 55. Efecto de la fuerza iónica en las características del ELISA para CTC

Cabe destacar que al trabajar con $\text{PBS } 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ no se obtuvo competición. Para el resto de condiciones, tanto la señal como los valores de IC_{50} disminuyeron al aumentar la concentración de sales, lo que indica que las interacciones que tienen lugar entre el analito y el anticuerpo deben ser principalmente hidrofóbicas. En este ensayo, la concentración de tampón fosfato 25 mmol L^{-1} fue la que proporcionó las mejores relaciones A_0 / IC_{50} , seleccionándose ésta para proseguir los estudios.

8.2.2.2 Efecto del pH

A continuación se evaluó la influencia del pH del medio en las características del inmunoensayo. Se estudiaron condiciones de pH desde 2,5 a 11 (Figura 56).

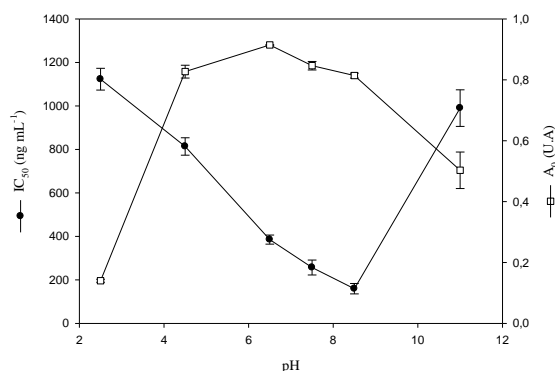


Figura 56. Efecto del pH en las características del ELISA para CTC

Tal y como era de esperar, el ensayo no mostró buenos resultados en condiciones fuertemente ácidas o básicas, ya que, como se ha comentado anteriormente, a estos pHs las tetraciclinas presentan muy poca estabilidad. La Figura 56 muestra cómo la sensibilidad mejora al aumentar el pH hasta 8,5, mientras que la señal se mantiene alta y estable a pH entre 4,5 y 8,5. Por lo tanto, puede decirse que los mejores resultados, en cuanto a señal y sensibilidad se refiere, se obtuvieron para pH 8,5.

8.2.2.3 Efecto de la concentración de tensoactivo

Con las condiciones seleccionadas anteriormente, se procedió a examinar el efecto de la concentración de tensoactivo en las características del ELISA para CTC. Para ello, se ensayó la adición de porcentajes de Tween 20 -entre 0,01 y 0,25% (v/v)- al tampón fosfato usado para diluir el anticuerpo específico.

En la Figura 57 se observa que tanto la IC_{50} como la señal disminuyen al aumentar la concentración de tensoactivo. Debido a esta tendencia en la disminución de señal, se decidió no ensayar valores superiores de Tween 20. Por ello, se seleccionó una concentración de 0,25% de Tween 20 como compromiso entre señal, sensibilidad y reducción de las interacciones no específicas.

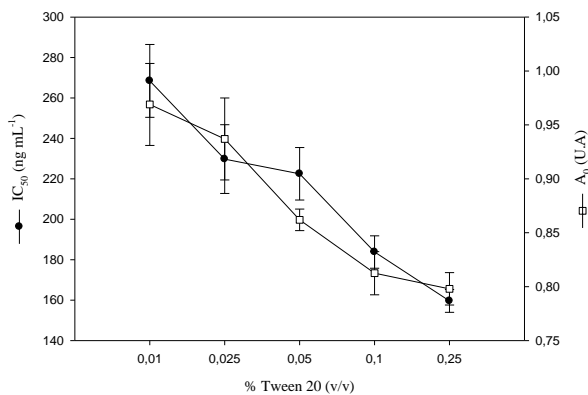


Figura 57. Efecto de la concentración de tensoactivo en las características del ELISA para CTC

8.2.2.4 Efecto del tiempo de incubación en la etapa competitiva

Por último, se procedió a estudiar la influencia del tiempo de competición, obteniendo curvas de calibrado para tiempos comprendidos entre 15 y 60 min. Los resultados (Figura 58) mostraron que tanto señal como sensibilidad aumentaban al hacerlo el tiempo de competición. Así, con el fin de obtener ensayos sensibles, con buena reproducibilidad, y rápidos, se seleccionó 15 min como tiempo de incubación óptimo en la etapa de competición.

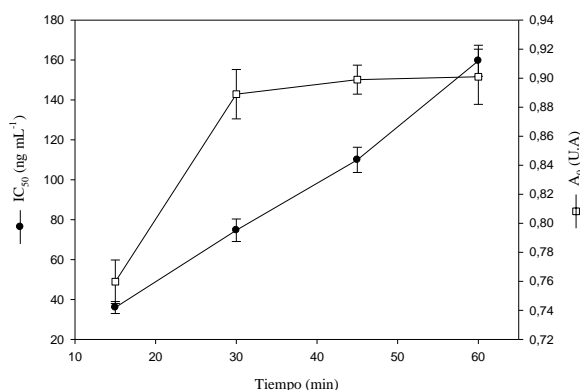


Figura 58. Influencia del tiempo de incubación de la etapa competitiva en las características del ELISA para CTC

8.2.2.5 Prestaciones analíticas del ELISA optimizado

A) Sensibilidad

En las condiciones de trabajo óptimas del ensayo desarrollado para CTC (fuerza iónica 25 mmol L⁻¹, pH 8,5, 0,25% de Tween 20 y tiempo de incubación de la etapa competitiva de 15 min), se efectuaron calibrados con

el fin de establecer la sensibilidad del ensayo (Figura 59). La gráfica muestra que se puede determinar CTC de manera sensible, con valores medios de desviación estándar relativa del 6%

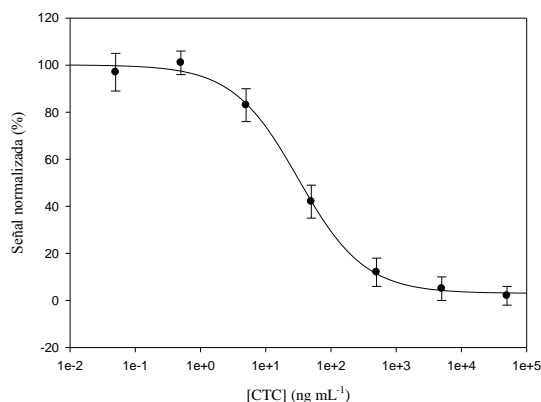


Figura 59. Curva patrón del ELISA para CTC (media y desviación de tres réplicas)

En resumen, este ensayo permite determinar CTC entre 6,70 y 193,20 ng mL⁻¹, con una sensibilidad elevada ($IC_{50} = 36,40$ ng mL⁻¹) y un límite de detección de 2,66 ng mL⁻¹.

B) Selectividad

La selectividad se evaluó frente a siete compuestos de la familia de las tetraciclinas (Tabla 25), obteniendo valores de reactividad cruzada inferiores al 3% en todos los casos. Por tanto, se demuestra que este ensayo es altamente específico para CTC.

Tabla 25. Estudio de selectividad del ensayo para CTC

<i>Compuesto</i>		<i>IC₅₀</i> <i>(mg L⁻¹)</i>	<i>RC</i> <i>(%)^a</i>
7-Clortetraciclina	CTC	36,40	100
Tetraciclina	TC	1.500	2,39
Oxitetraciclina	OTC	>10.000	<0,01
Rolitetraciclina	RTC	>10.000	<0,01
Doxiciclina	DXC	>10.000	<0,01
Anhidrotetraciclina	ATC	>10.000	<0,01
Metaciclina	MC	>10.000	<0,01
Minociclina	MNC	>10.000	<0,01

^a RC: reactividad cruzada calculada mediante la ecuación: $[IC_{50} (STZ)/IC_{50} (interferente)] \times 100$

En la Tabla 26 se recoge la comparación de los resultados obtenidos en esta tesis para la determinación inmunoenzimática de CTC con otros ensayos publicados previamente y con los resultados aportados por diferentes kits comerciales.

Tabla 26. Inmunoensayos para tetraciclinas

a) Ensayo específico desarrollado

<i>Analito</i>	<i>Tipo anticuerpo</i>	<i>tetraciclinas detectadas</i>	<i>Valor IC₅₀ (ng mL⁻¹)</i>	<i>Año</i>
CTC	Policlonal	CTC	36,40	2007

b) Otros inmunoensayos en placa para tetraciclinas

<i>Autor</i>	<i>Tipo anticuerpo</i>	<i>tetraciclinas detectadas</i>	<i>Valores IC₅₀ (ng mL⁻¹)</i>	<i>Año</i>
Lang ²⁵⁸	Policlonal	TC, CTC, MNC, RTC	5*	1992
Everest ²⁵⁹	Policlonal	TC, CTC, OTC	15 - 50	1994
Zhang ²⁶⁰	Policlonal	TC, CTC	3.920 - 4.390	2007
Pastor-Navarro ²⁶¹	Policlonal	TC, RTC, OTC, MC, CTC	6,5 - 65	2007
Jeon ²⁶²	Policlonal	TC, CTC, OTC	0,048 - 0,48	2008

* (LD frente a TC)

c) Kits comerciales

<i>Nombre</i>	<i>Metodología</i>	<i>tetraciclinas detectadas</i>	<i>Valores IC₅₀ (ng mL⁻¹)</i>
Ridascreen Tetracycline Test ²⁶³	Inmunoquímica	TC, CTC, MNC, RTC, OTC	<15 - 150
TMRL (Charm II en leche) ²⁶⁴	RIA	TC, CTC, OTC	20-100
SNAP Tetracycline Test kit ²⁶⁵	Inmunoquímica	TC, CTC, OTC	50 - 100

²⁵⁸ Lang, B., Martlbauer, E., Terplan, G. *Arch Lebensmittelhyg* 43 (1992) 77.²⁵⁹ Everest, S.J., Cobb, A.L., Courboin, G.M., Jackman, R. *Food Agric. Immunol.* 6 (1994) 55.²⁶⁰ Zhang, Y., Lu, S., Liu, W., Zhao, C., Xi., R. *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 211.²⁶¹ Pastor-Navarro, N., Morais, S., Maquieira, A., Puchades, R. *Anal. Chim. Acta* 594 (2007) 211.²⁶² Jeon, M., Kim, J., Paeng, K.-J., Park, S.-W., Rhee Paeng, I. *J. Microchem* 88 (2008) 26.²⁶³ <http://www.biokits.com/productinfo/912/RIDASCREEN-reg-Tetracycline.html>²⁶⁴ http://www.charm.com/images/stories/pdf/charmII/charmII_milk_mrl.pdf²⁶⁵ http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en_us/dairy/snap/0612015.pdf

Como se puede observar en la Tabla 26 (c), existen en el mercado kits comerciales para la determinación de tetraciclinas basados en métodos inmunoquímicos, siendo uno de los más utilizados el llamado “Ridascreen Tetracycline Test” (R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Alemania). Este test, en placa ELISA, permite determinar CTC, TC, MNC y RTC por debajo de 15 ng mL⁻¹ y OTC a concentraciones inferiores a 150 ng mL⁻¹. Sin embargo, el test Charm II, un radioinmunoensayo, detecta tres tetraciclinas entre 20 y 100 ng mL⁻¹. Por último, el “SNAP Tetracycline Test kit” (Idexx Laboratories, EE.UU.) basado en ELISA es capaz de detectar TC y OTC a 50 ng mL⁻¹ y CTC a 100 ng mL⁻¹. Así, el inmunoensayo aquí descrito presenta una sensibilidad similar o mejor (IC₅₀=36,40 mg L⁻¹ para CTC) a la que presentan los kits comerciales y, además, de manera específica.

Por otro lado, al comparar con otros métodos previamente descritos (Tabla 26b) se puede observar que Lang *et al.*²⁵⁸ desarrollaron un ELISA indirecto para la determinación de TC en leche, consiguiendo un LD de 5 ng mL⁻¹, aunque el ensayo no era específico, ya que presentaba reactividad cruzada con CTC, MNC y RTC. El inmunoensayo desarrollado por Everest *et al.*²⁵⁹ con anticuerpos policlonales de oveja detectó residuos de CTC, OTC y TC en carne y leche, con un LD de 50 ng mL⁻¹ y 15 ng mL⁻¹, respectivamente. Asimismo, el equipo de Zhang²⁶⁰ obtuvo un suero policlonal capaz de determinar CTC y TC a nivel de mg L⁻¹. Por otro lado, Pastor-Navarro *et al.*²⁶¹ desarrollaron un ensayo para detectar TC con una IC₅₀ de 6,5 ng mL⁻¹ (LD = 0,4 ng mL⁻¹), presentando reactividad cruzada con RTC (91%), OTC (30%), MC (14%) y CTC (10%).

Con posterioridad al desarrollo de este trabajo, el equipo de Jeon²⁶² ha publicado un ELISA capaz de detectar tetraciclinas en leche, basado en

un PAb comercial (ab30591, Abcam, Cambridge, MA, USA). Tras la optimización, el LD alcanzado para TC en leche es de $0,48 \text{ ng mL}^{-1}$, aunque reconoce a otras tetraciclinas como CTC (13,7%) y OTC (10%).

Por tanto, al comparar con otros métodos descritos previamente para tetraciclinas, se puede concluir que el ELISA aquí desarrollado para la determinación de CTC presenta una buena sensibilidad ($\text{LD} = 2,66 \text{ ng mL}^{-1}$) y elevada selectividad. Así, de acuerdo a los resultados alcanzados, este ensayo es el primer inmunoensayo específico para la determinación de CTC descrito en la literatura.

9. Desarrollo y puesta a punto de inmunoensayos en CD

Los denominados microinmunoensayos se desarrollaron utilizando un formato competitivo indirecto. Para llevar a cabo esta parte de las investigaciones, como soporte analítico para desarrollar los inmunoensayos se utilizó la superficie de policarbonato de CDs de baja reflectividad (L-CD), que se tapizó con el correspondiente conjugado, distribuido uniformemente mediante el uso de cubreobjetos de vidrio $22 \times 22 \text{ mm}$. De este modo pueden tapizarse hasta 8 zonas por CD.

Posteriormente, se depositó el anticuerpo primario, con o sin analito, utilizando el microimpresor de CDs, imprimiendo dieciséis matrices (4×4) de cuatro puntos (2×2) en cada una de las zonas del CD que han sido previamente tapizadas (Figura 60). Para ello, se trabajó con los sueros que proporcionaron mejores resultados en placa ELISA (S3-I, S4-II, S12-II y OTC-I). Pronto se observó que no era posible trasladar las condiciones del

ELISA a los microinmunoensayos en CD sin realizar modificaciones en la metodología. Por tanto, hubo que adaptar todos los parámetros de ensayo: concentración de inmunorreactivos, composición del tampón, tiempos de incubación, etc., a este nuevo formato.

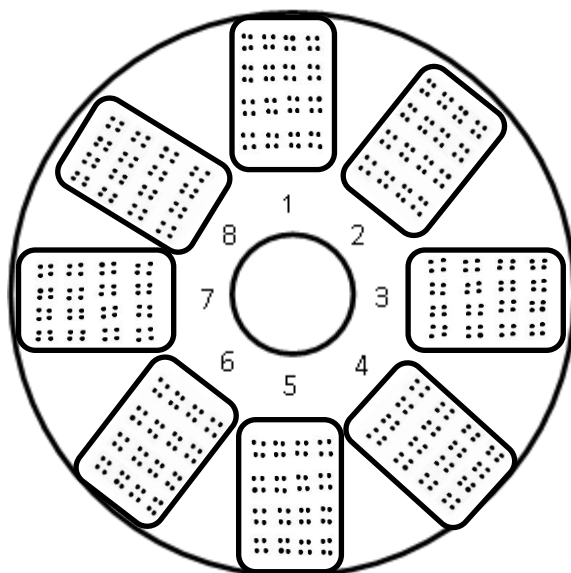


Figura 60. Esquema de la distribución de zonas y matrices en un CD (8 zonas con 16 matrices (4x4) de 4 puntos (2 × 2) cada una)

Dado que ensayos previos realizados por el grupo de investigación²⁶⁶ indicaron que es necesario añadir glicerol al PBS para prevenir la evaporación instantánea de las microgotas y reducir la formación de burbujas de aire durante el proceso de transferencia, se procedió a realizar un estudio preliminar para determinar la concentración idónea de glicerol. Para ello, tomando como modelo el par OVA S4/S3-I, se preparó un ensayo

²⁶⁶ Morais, S., Carrascosa, J., Mira, D., Puchades, R., Maquieira, A. *Anal. Chem.* 79 (2007) 7628.

de titulación con 8 tampones conteniendo distintas cantidades de glicerol en placa (50, 25, 10, 5, 2, 1, 0,5 y 0% de glicerol, v/v). En este caso, se emplearon 4 de las 8 posibles zonas del CD, donde se analizaron las ocho disoluciones con distintos porcentajes de glicerol (dos repeticiones por zona), según el esquema de la Figura 61.

50%	25%	10%	5%	} Repetición 1
2%	1%	0,5%	0%	
50%	25%	10%	5%	} Repetición 2
2%	1%	0,5%	0%	

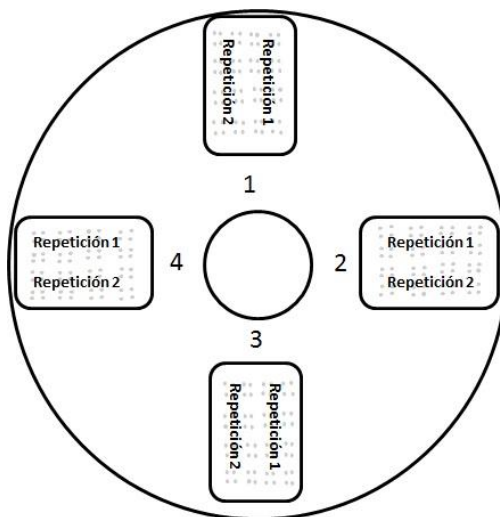


Figura 61. Esquema del ensayo de optimización del contenido en glicerol en el medio de impresión

Continuando con el estudio del efecto del glicerol en el medio de impresión, se prepararon tres discos distintos (A, B, C) en un mismo día. De este modo, pudo establecerse la reproducibilidad de la señal dentro de una misma zona, entre zonas de un mismo disco y entre discos (Tabla 27).

Tabla 27. Estudio de la influencia de la concentración de glicerol en la intensidad de la señal.

		Conc. glicerol	50%	25%	10%	5%	2%	1%	0,5%	0%
CD A	Zona 1	media	5.448	7.855	10.909	12.330	13.242	15.984	16.879	17.883
		SD	249	245	135	168	174	125	321	322
	Zona 2	media	5.188	8.345	10.010	13.729	13.205	15.279	14.968	15.535
		SD	132	193	132	125	333	197	206	299
	Zona 3	media	5.524	7.482	10.362	12.426	12.613	14.401	14.947	16.185
		SD	207	190	153	137	257	189	277	253
	Zona 4	media	4.479	6.628	9.411	12.717	12.469	14.699	15.011	16.079
		SD	197	124	91	35	108	115	83	281
CD B	Zona 1	media	4.744	7.529	10.219	12.691	13.468	15.338	16.366	17.046
		SD	152	199	295	308	200	176	184	253
	Zona 2	media	5.323	6.895	9.327	11.677	12.077	14.163	15.730	16.512
		SD	114	206	157	368	472	236	136	138
	Zona 3	media	5.330	7.097	9.197	12.201	12.930	14.114	14.578	15.875
		SD	238	142	152	217	23	80	123	105
	Zona 4	media	5.138	6.772	9.266	12.497	13.069	14.934	15.473	15.905
		SD	134	146	145	206	386	112	153	101
CD C	Zona 1	media	5.206	6.277	9.093	12.104	13.128	14.099	15.012	15.492
		SD	125	234	120	104	104	136	109	95
	Zona 2	media	5.097	7.839	10.789	12.493	13.465	13.989	14.360	15.647
		SD	175	264	315	284	182	232	239	90
	Zona 3	media	4.729	6.569	10.920	12.537	13.240	14.241	15.573	16.794
		SD	170	206	73	206	137	111	134	290
	Zona 4	media	5.324	6.985	9.275	11.757	12.883	13.754	13.915	15.042
		SD	118	87	111	276	84	148	112	237

Intensidad de señal (U.A.)

Los resultados mostraron (Tabla 27) una disminución de la señal a medida que aumentaba la cantidad de glicerol en el medio, lo cual concuerda con resultados obtenidos previamente por otros investigadores del grupo²⁶⁷. Esta disminución es mucho más drástica para concentraciones de glicerol superiores al 10%. Para visualizar más fácilmente los resultados, éstos se han representado en forma de gráfica (Figura 62).

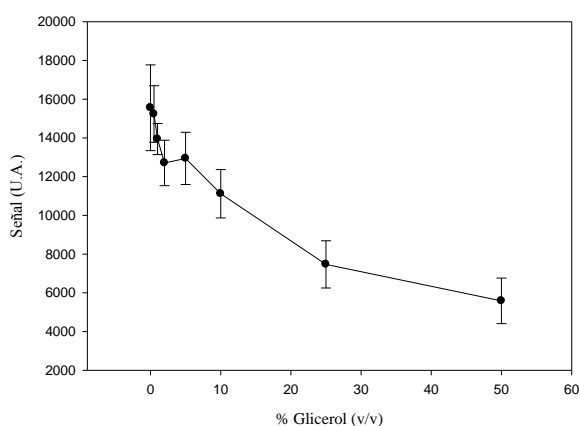


Figura 62. Influencia de la concentración de glicerol en la señal

En cuanto a la reproducibilidad, se obtuvieron los siguientes valores:

- Variación según la concentración: CV = 1,77%
- Variación intra-zona: CV = 5,27%
- Variación inter-CD: CV = 5,56%

Estos resultados demuestran que la metodología para análisis en CD empleada presenta resultados muy reproducibles tanto a nivel intra-zona como inter-CD, para cualquier concentración de glicerol.

²⁶⁷ Tamarit-López, J., Morais, S., Puchades, R., Maquieira, A. *Analytica Chimica Acta* 609 (2008) 120.

A continuación, se llevaron a cabo ensayos competitivos para STZ con las condiciones que presentaban mejores valores de señal (5, 2 y 1% de glicerol, v/v). En la Figura 63 se observa una mejora de la sensibilidad a medida que aumenta la concentración de glicerol, con lo que se seleccionó 5% en placa como concentración de trabajo óptima en CDs. Dichos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores²⁶⁸.

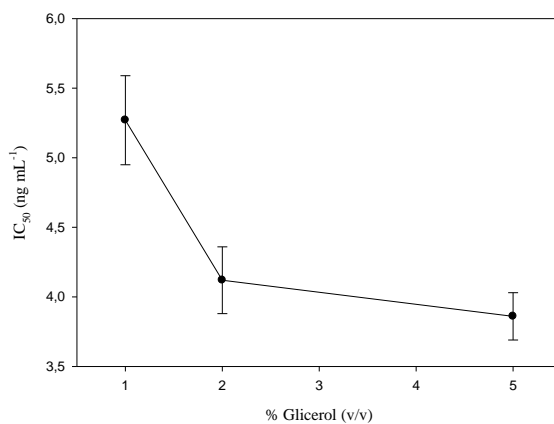


Figura 63. Optimización de la concentración de glicerol

Por otro lado, en ensayos previos llevados a cabo con diferentes sistemas para la determinación de sulfonamidas, se observó que los mejores resultados se obtenían para una concentración de Tween 20 menor a la utilizada previamente en placa ELISA. Así, al cambiar la composición del PBS habitual, se cambió su denominación por la de tampón de impresión en CDs (PPB), compuesto por PBS conteniendo 0,02% de Tween 20 y 10% de glicerol.

²⁶⁸ Morais, S., Carrascosa, J., Mira, D., Puchades, R., Maquieira, A. *Anal. Chem.* 79 (2007) 762.

9.1 Sulfonamidas

Debido al cambio en las condiciones de los ensayos respecto a los realizados en placa ELISA (distinto tampón de impresión y menor tiempo de competición), los sueros se re-titularon (ver sección 6.5.1) con todos los conjugados de tapizado, tanto en modo homólogo como heterólogo, con el fin de seleccionar el formato y las concentraciones de reactivos más adecuadas para desarrollar un inmunoensayo en CD.

La Tabla 28 presenta los resultados de los ensayos de titulación indirecta llevados a cabo con los sueros S3-I, S4-II y S12-II y todos los conjugados OVA-hapteno. Los ensayos se llevaron a cabo en formato indirecto por haber presentado mejores prestaciones en placa. Este formato fue utilizado en todas las investigaciones con CDs. En la misma tabla aparecen los haptenos tipo I en color azul, y los tipo II en color rojo. Los valores de absorbancia leídos para cada par suero/conjugado de tapizado se han expresado en unidades arbitrarias (L, M y H) en función del factor de dilución aplicado a los sueros ($L < 1/10.000$, $M = 1/10.000$ a $1/30.000$, y $H > 1/30.000$), para obtener señales netas comprendidas entre 10.000 y 20.000. Los resultados se han asociado a un color con el fin de facilitar la lectura de las tablas.

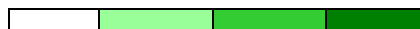
En la Tabla 28 también se muestran los resultados obtenidos previamente en placa ELISA para facilitar la comparación. Como se puede observar, los resultados en CD son similares a los obtenidos en placa ELISA, aunque presentan algunas diferencias. En general, se mantienen las afinidades entre los mismos pares, a pesar de que los resultados de titulación

son algo inferiores en CD. Destaca el caso de los haptenos OVA-S4 y OVA-S8, que resultan excelentes como conjugados de tapizado en CD.

Tabla 28. Resultados de los ensayos de titulación realizados sobre CD y placa ELISA

TAPIZADO	CD			Placa ELISA		
	S3-I	S4-II	S12-II	S3-I	S4-II	S12-II
OVA-S2	N	M	N	M	H	N
OVA-S3	N	N	N	M	N	N
OVA-S4	H	H	H	H	H	N
OVA-S5	L	N	N	N	N	N
OVA-S6	M	H	N	L	H	N
OVA-S7	M	N	N	L	N	N
OVA-S8	H	H	H	H	L	M
OVA-S9	L	N	N	L	M	N
OVA-S10	L	N	N	M	M	N
OVA-S11	L	L	N	H	H	M
OVA-S12	L	N	L	N	N	H
OVA-S13	L	L	N	M	H	N
OVA-S14	L	L	N	H	H	N

Señal



0 2.000 5.000 10.000 20.000

Dilución del suero 1:500
Concentración de conjugado de tapizado 1 mg L⁻¹



0 0,2 0,5 1 2

Dilución del suero 1:1.000
Concentración de conjugado de tapizado 1 mg L⁻¹

En el desarrollo de inmunoensayos competitivos para las sulfonamidas objeto de estudio, se evaluaron las combinaciones suero/competidor que, en los ensayos de titulación, proporcionaron señales entre 5.000 y 20.000 (M o H). Así, se realizaron ensayos de competición contra STZ (sueros S3-I y S4-II) o SMX (suero S12-II), con el fin de

seleccionar las concentraciones de inmunorreactivos que proporcionaron mayor sensibilidad. Los resultados se muestran en la Tabla 29. Nuevamente se adjuntan los resultados obtenidos previamente en placa ELISA para facilitar la comparación.

Tabla 29. Valores de IC_{50} (ng mL⁻¹) para STZ en CD y placa ELISA

TAPIZADO	CD			ELISA		
	S3-I	S4-II	S12-II	S3-I	S4-II	S12-II
OVA-S2	-	>10.000	-	3	195	-
OVA-S4	3,86	27,55	13,12	6	818	-
OVA-S6	-	39,92	-	>10.000	9	-
OVA-S8	1,37	>10.000	3,96	2	270	7,42

Cabe destacar que la mayoría de los sistemas ensayados presentaron una sensibilidad mayor a la obtenida previamente en placa ELISA. Algunos autores indican que el formato *microarray* puede aumentar la sensibilidad de los ensayos, especialmente cuanto más pequeño es el *spot*²⁶⁹. Cabe recordar que las condiciones de competición no son idénticas en ambos formatos: el tampón utilizado en el formato CD no es exactamente el mismo que el empleado anteriormente en placa ELISA (contiene glicerol y una menor concentración de Tween 20), y los tiempos de competición son inferiores en CD (20 min en CD frente a 60 min en placa ELISA). Así, la suma de todos estos factores, especialmente el formato en *microarray*, puede influir en la mejora de la sensibilidad en CD.

²⁶⁹ Templin, M.F., Stoll, D., Schrenk, M., Traub, P.C., Vöhringer, C.F., Joos, T.O. *Drug Discovery Today* 7 (2002) 815.

A continuación, se muestran las diluciones de suero y conjugado de tapizado seleccionadas, y la sensibilidad inicial alcanzada en cada caso:

- I) OVA-S4 5 mg L⁻¹ / S3-I 1/500 IC₅₀ = 3,86 ng mL⁻¹ STZ
- II) OVA-S4 10 mg L⁻¹ / S4-II 1/1.000 IC₅₀ = 27,55 ng mL⁻¹ STZ
- III) OVA-S8 1 mg L⁻¹ / S3-I 1/250 IC₅₀ = 1,37 ng mL⁻¹ STZ
- IV) OVA-S6 0,5 mg L⁻¹ / S4-II 1/250 IC₅₀ = 7,19 ng mL⁻¹ STZ
- V) OVA-S4 1 mg L⁻¹ / S12-II 1/500 IC₅₀ = 13,12 ng mL⁻¹ SMX
- VI) OVA-S8 5 mg L⁻¹ / S12-II 1/1.000 IC₅₀ = 3,96 ng mL⁻¹ SMX

Se puede apreciar que, aquellos ensayos que utilizan menor concentración de tapizado requieren la utilización de sueros más concentrados, y a la inversa.

9.1.1 Optimización y características de los microinmunoensayos

Tal y como se ha comentado anteriormente, las características de un inmunoensayo dependen de las condiciones físico-químicas del medio y de otras variables experimentales. Por tanto, utilizando las combinaciones seleccionadas en los ensayos competitivos, se llevaron a cabo distintas pruebas con el fin de establecer los parámetros experimentales que proporcionen los mejores resultados analíticos. Así, se evaluó el efecto de: fuerza iónica, pH, concentración de tensioactivo, tiempo de incubación en la etapa competitiva, concentración de anticuerpo secundario y tiempo de incubación del mismo.

Inicialmente, las reacciones se llevaron a cabo en tampón PPB (PBS conteniendo 0,02% de Tween 20 y 10% de glicerol) y el tiempo de incubación de la etapa competitiva fue fijado en 20 min, de acuerdo a resultados obtenidos en ensayos previos.

A continuación se detalla la optimización de los seis microinmunoensayos desarrollados para sulfonamidas. Cabe mencionar que el ensayo V (OVA-S4//S12-II) fue muy poco robusto y mostró competición únicamente en un intervalo muy estrecho de condiciones de los diferentes parámetros analíticos optimizados. Por ello, dichos resultados no aparecen en forma de gráfica.

9.1.1.1 Efecto de la fuerza iónica

Para estudiar el efecto de la fuerza iónica se ensayaron concentraciones de fosfato entre 2,5 mmol L⁻¹ y 20 mmol L⁻¹. En la Figura 64 se observa que, en líneas generales, la sensibilidad disminuye al aumentar la concentración de sales, lo que, como en otros casos, indica que las interacciones que tienen lugar entre el analito y el anticuerpo deben ser principalmente hidrofóbicas. Estas interacciones se favorecen, generalmente, al aumentar la fuerza iónica del medio de reacción, mientras que en las interacciones principalmente iónicas se produce el efecto contrario.

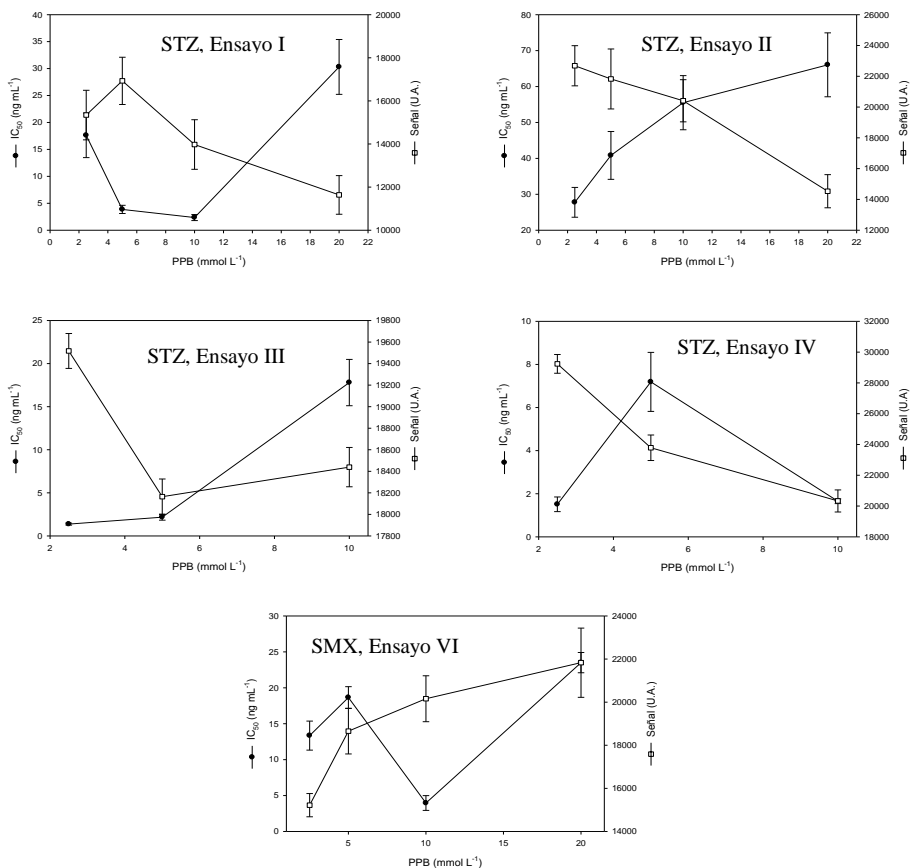


Figura 64. Efecto de la fuerza iónica en las características de los microinmunoensayos para sulfonamidas

Estableciendo un compromiso entre señal y sensibilidad, se tomó 2,5 mmol L⁻¹ como concentración óptima de PPB para los ensayos II, III y IV, y 10 mmol L⁻¹ para los ensayos I y VI. El ensayo V (resultados no expuestos gráficamente) sólo mostró competición para una concentración de 5 mmol L⁻¹. Cabe destacar que los valores seleccionados como óptimos son notablemente inferiores a los seleccionados para los ensayos en placa ELISA (20-30 mmol L⁻¹).

9.1.1.2 Efecto del pH

La influencia del pH del medio se ensayó en un intervalo entre 6,5 y 9,5. Los valores de IC_{50} y señal se recogen en la Figura 65.

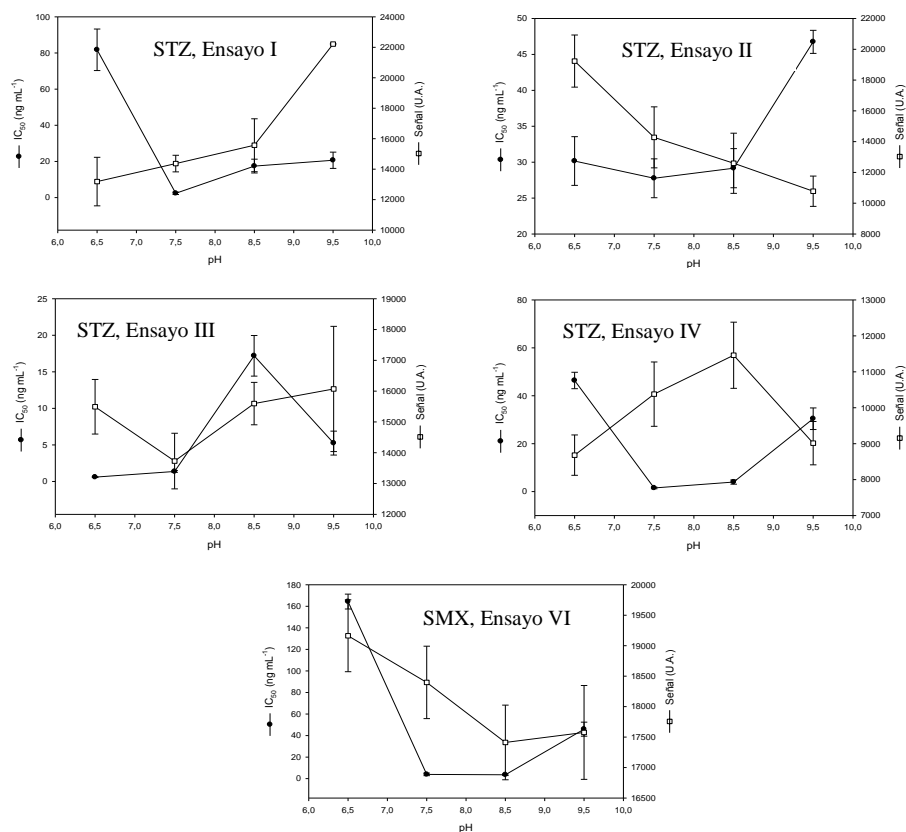


Figura 65. Efecto del pH en las características de los microinmunoensayos para sulfonamidas

Se observa que, en general, al aumentar el pH se produce una mejora de sensibilidad. Por tanto, se puede concluir que la mejor relación A_0 / IC_{50} se obtiene para valores de pH en torno a 7,5. Así, en los ensayos I, II y IV se seleccionó éste como pH de trabajo. Tan sólo en el caso del ensayo III, se

obtuvieron resultados óptimos a pH inferior, 6,5. En el caso de los ensayos V (resultados no expuestos gráficamente) y VI (ensayos frente a SMX), los mejores resultados en términos de señal y sensibilidad se obtuvieron a pH 8,5. Una vez más, las condiciones de trabajo seleccionadas para CDs difieren claramente de las de placa ELISA, donde los pHs seleccionados fueron, en general, más ácidos. Concretamente, el pH de trabajo óptimo fue 6 para STZ y 5,5 para SMX.

9.1.1.3 Efecto de la concentración de tensoactivo

En las condiciones previamente establecidas, se procedió a examinar el efecto de la concentración de tensoactivo en las características de los ensayos frente a sulfonamidas en soporte CD.

Para ello, se ensayó la adición de diferentes porcentajes de Tween 20 al tampón fosfato usado para diluir el anticuerpo específico, entre 0,01 y 0,05% (v/v) (Figura 66).

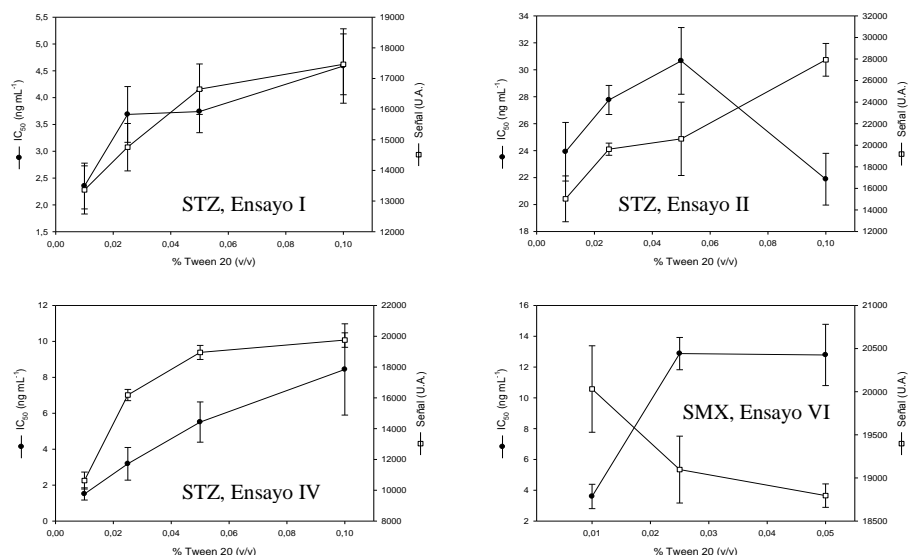


Figura 66. Efecto de la concentración de tensoactivo en las características de los microinmunoensayos frente a sulfonamidas

En el caso de los micro-ensayos frente a STZ (ensayos I-IV), se observa que tanto la señal como la IC_{50} aumentan con la concentración de tensoactivo del medio, al igual que sucedía en otros microinmunoensayos²⁷⁰. Así, las mejores relaciones A_0/IC_{50} se obtuvieron a 0,01% de Tween 20 en el caso de los ensayos I y IV, y a 0,025% en el caso del ensayo II. Sin embargo, el ensayo III resultó ser muy poco robusto frente a la variación de la concentración de Tween en el medio, no dándose competición para porcentajes distintos a 0,01% de Tween 20, por lo que los resultados no se muestran en la Figura 66.

²⁷⁰ Pastor-Navarro, N., Brun, E.M., Gallego-Iglesias, E., Maquieira, A., Puchades, R. *J. Environ. Monit.* 11 (2009) 1094.

Por otro lado, el ensayo frente a SMX (ensayo VI) muestra disminución de la señal al aumentar la concentración de Tween 20. Así, en los ensayos V (resultados no mostrados gráficamente) y VI, se seleccionó 0,01% como compromiso entre señal, sensibilidad y ausencia de interacciones no específicas. En este caso, podemos observar que el efecto de la concentración de tensoactivo no difiere entre los formatos CD y placa ELISA, ya que las condiciones seleccionadas como óptimas son muy similares, aunque en un caso el soporte es PC y en el otro poliestireno.

9.1.1.4 Efecto del tiempo de incubación en la etapa competitiva

Finalmente, se procedió a optimizar el tiempo de competición con el objetivo de reducir la duración del ensayo. Para ello, se estudió la influencia del tiempo de incubación de la etapa competitiva (5, 10, 15, 20 min) sobre las características de los inmunoensayos (Figura 67).

En líneas generales, los resultados mostraron que los valores de IC_{50} y A_0 aumentaban gradualmente con el tiempo de incubación, pudiendo establecerse una buena relación señal/sensibilidad para tiempos de competición bajos. Así, el ensayo II registró el menor tiempo (5 min), seguido de los ensayos III, IV y V (10 min), mientras que los microinmunoensayos VI y I necesitaron de periodos de incubación de 15 y 20 minutos, respectivamente.

Cabe destacar que el trabajo en formato microinmunoensayo sobre CD permite disminuir la duración de la etapa de competición respecto a la

de la placa ELISA, donde los tiempos de competición óptimos superan los 45 min.

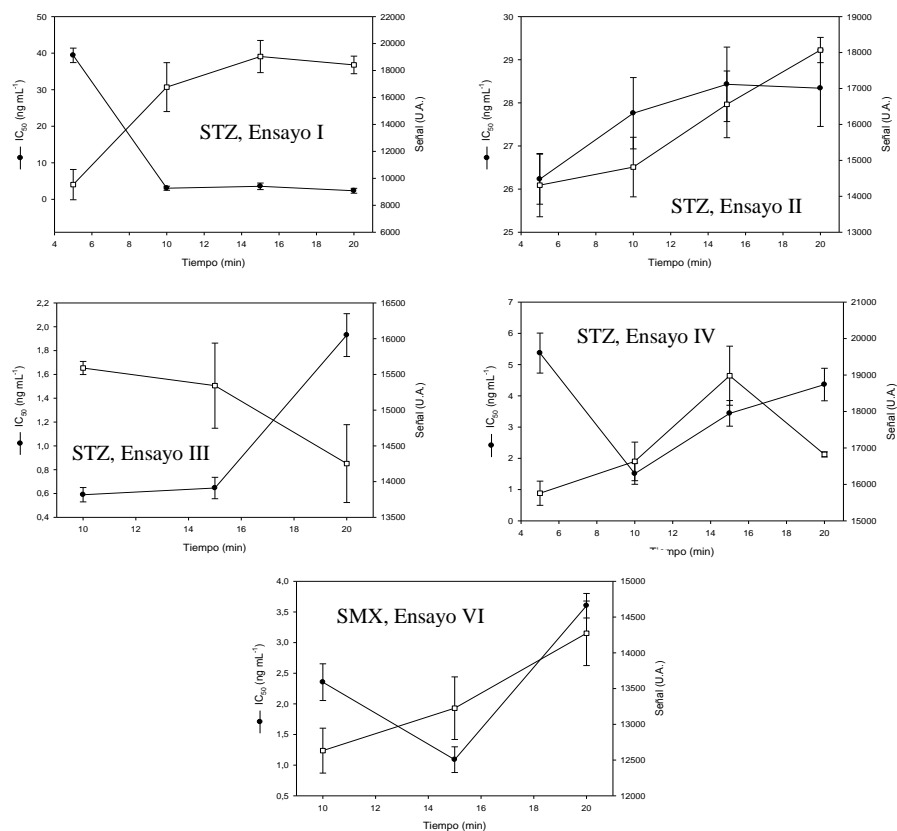


Figura 67. Efecto de la influencia del tiempo de incubación de la etapa competitiva en las características de los microinmunoensayos de sulfonamidas

9.1.1.5 Efecto de las condiciones de incubación del anticuerpo secundario

Al trabajar con microinmunoensayos sobre CDs, se utilizaron anticuerpos de cabra anti-conejo marcados con oro (GAR-Gold) como anticuerpos secundarios, en lugar del habitual GAR-HRP utilizado en placa ELISA. Esto se debe a que el método de revelado mediante precipitación de plata requiere utilizar partículas de oro como marcador.

Al contrario que en los ELISAs en placa, al trabajar con discos no podemos establecer unas condiciones generales de ensayo, sino que conviene optimizarlo para cada caso concreto. Así, se realizó un estudio con el fin de optimizar la concentración de anticuerpo secundario GAR-Gold y la duración de la etapa de incubación.

Al evaluar las condiciones de incubación con anticuerpo secundario es cuando se observaron las mayores discrepancias entre los distintos ensayos, pues cada uno de ellos ofrecía una respuesta diferente a las distintas concentraciones de GAR-Gold, en términos de señal y sensibilidad. Así, mientras la mayoría presentaban resultados válidos a diluciones entre 1/100 y 1/1.000, el ensayo VI requirió trabajar con diluciones menores para proporcionar una señal aceptable ([GAR-Gold] 1/25-1/100). Además, algunos de los ensayos tan sólo ofrecieron una buena respuesta en un intervalo estrecho de concentraciones. Por ello, en la Tabla 30 se resaltan únicamente las condiciones seleccionadas más favorables para la incubación del anticuerpo secundario GAR-Gold.

Tabla 30. Condiciones seleccionadas para la incubación del anticuerpo secundario

	<i>[GAR-Gold]</i>	<i>Tiempo</i>
	<i>(ng mL⁻¹)</i>	<i>(min)</i>
Ensayo I (STZ)	1/250	30
Ensayo II (STZ)	1/500	30
Ensayo III (STZ)	1/125	30
Ensayo IV (STZ)	1/125	30
Ensayo V (SMX)	1/500	60
Ensayo VI (SMX)	1/25	60

Para los ensayos II, IV y VI las señales eran mayores y los valores de IC_{50} menores a medida que aumentaba la concentración de GAR-Gold, obteniéndose la mejor relación A_0 / IC_{50} para una concentración de GAR-Gold de 1/125 en el caso de los ensayos para STZ (II y IV), y de 1/25 en el ensayo para SMX (VI). Pese a mostrar esta misma tendencia, el ensayo I no presentó competición a 1/125 y requirió la utilización de GAR-Gold 1/250. En el caso de los ensayos II y V, se seleccionó una concentración de anticuerpo secundario de 1/500, ya que los valores de IC_{50} fueron menores al disminuir la concentración de GAR-Gold.

En cuanto a la duración de la etapa de incubación con anticuerpo secundario, cabe mencionar que en el caso de los ensayos frente a STZ pudo reducirse a 30 min. Sin embargo, esto no fue posible en los ensayos frente a SMX, y se tuvo que mantener un tiempo de incubación de 60 min con el fin de obtener ensayos sensibles, con una señal adecuada. Esto puede deberse a

una mayor afinidad por el anticuerpo secundario GAR-Gold de los sueros obtenidos con los haptenos S3 y S4 (contienen un grupo amino aromático libre), que la obtenida con el suero del hapteno S12 (presenta una cadena alifática como brazo espaciador).

9.1.1.6 Prestaciones analíticas de los microinmunoensayos optimizados

Durante el proceso de optimización, los microinmunoensayos desarrollados para sulfonamidas mostraron una gran mejora de la sensibilidad, tal y como se resume en la Tabla 31. Así, la mayoría de los ensayos mejoraron su sensibilidad en más de un 50%, siendo los ensayos II y IV aquellos que disminuyeron su IC₅₀ de manera más notable (95 y 97%, respectivamente).

Las condiciones de trabajo seleccionadas como óptimas en los microinmunoensayos desarrollados en CD para la determinación de sulfonamidas se resumen en la Tabla 32. En ella se observa que el pH óptimo varía entre 7,5 y 8,5 (sólo en un caso es 6,5), que el tampón óptimo contiene Tween 20 al 0,01% o 0,025% (v/v), y que el tiempo de incubación con GAR-Gold es de 30 min para STZ y 60 min para SMX. Por otro lado, la concentración de sales, el tiempo de competición y la concentración de anticuerpo secundario son las variables que mayores diferencias presentan.

Tabla 31. Mejora de la sensibilidad en el proceso de optimización de los ensayos en CD para sulfonamidas

	$IC_{50} inicial$ ($ng mL^{-1}$)	$IC_{50} final$ ($ng mL^{-1}$)	Mejora de la sensibilidad (%)
Ensayo I (STZ)	3,86	1,97	49
Ensayo II (STZ)	27,55	1,43	95
Ensayo III (STZ)	1,37	0,30	78
Ensayo IV (STZ)	7,19	0,22	97
Ensayo V (SMX)	13,12	9,29	29
Ensayo VI (SMX)	3,96	1,09	72

Ensayos: I (OVA-S4//S3-I), II (OVA-S4//S4-II), III (OVA-S8//S3-I), IV (OVA-S6//S4-II), V (OVA-S4//S12-II), VI (OVA-S8//S12-II)

Tabla 32. Condiciones de trabajo óptimas de los microinmunoensayos para sulfonamidas

Ensayo / analito	PBS ($mmol L^{-1}$)	pH	Tween 20 (%, v/v)	Tiempo* (min)	[GAR- Gold]	Tiempo** GAR-Gold (min)
I / STZ	10	7,5	0,01	20	1/250	30
II / STZ	2,5	7,5	0,025	5	1/500	30
III / STZ	2,5	6,5	0,025	10	1/125	30
IV / STZ	2,5	7,5	0,01	10	1/125	30
V / SMX	5	8,5	0,01	10	1/500	60
VI / SMX	10	8,5	0,01	15	1/25	60

* tiempo de incubación en la etapa competitiva

** tiempo de incubación con el anticuerpo secundario

Ensayos: I (OVA-S4//S3-I), II (OVA-S4//S4-II), III (OVA-S8//S3-I), IV (OVA-S6//S4-II), V (OVA-S4//S12-II), VI (OVA-S8//S12-II)

En la Figura 68 se muestran las curvas de calibrado obtenidas para STZ (A) y SMX (B), utilizando los microinmunoensayos optimizados.

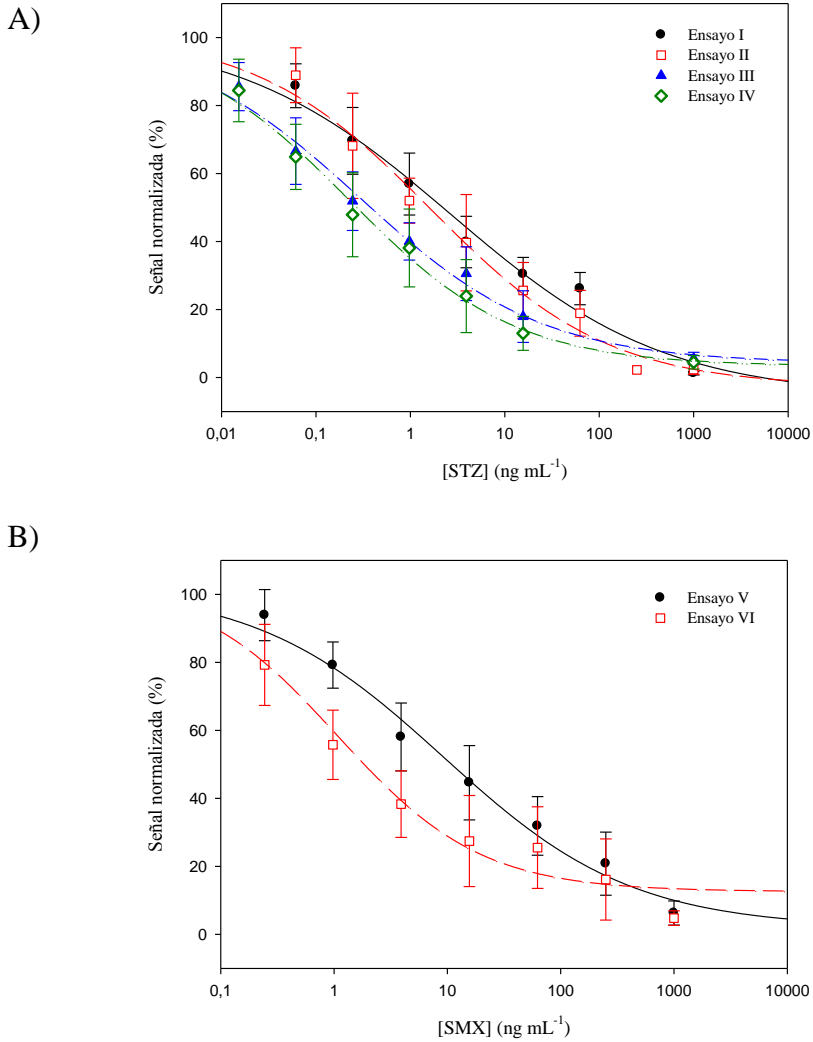


Figura 68. Curvas patrón de los microinmunoensayos para STZ (A) y SMX (B) (media y desviación de tres réplicas)

Se observa (Figura 68) que es posible cuantificar desde niveles inferiores a pg mL^{-1} (ensayos III y IV) hasta pocos ng mL^{-1} (ensayo V) -o intermedios (ensayos I, II y VI)- de estos compuestos.

A continuación, se muestra un resumen de las principales características analíticas de los microinmunoensayos optimizados (Tabla 33). Como puede observarse, el hapteno S4 resultó apropiado como conjugado de tapizado en CDs, pero no proporcionó los mejores resultados en términos de sensibilidad. Al igual que sucedía en placa ELISA, los mejores conjugados de tapizado se obtuvieron con los haptenos S6 y S8.

Tabla 33. Parámetros analíticos de los microinmunoensayos desarrollados para sulfonamidas en CD

<i>Ensayo</i>	<i>Inmunorreactivos</i>	<i>Analito</i>	<i>IC₅₀</i> (<i>ng mL⁻¹</i>)	<i>LD</i> (<i>ng mL⁻¹</i>)	<i>RD</i> (<i>ng mL⁻¹</i>)
I	OVA-S4 / S3-I	STZ	1,97	0,02	0,08 – 55,23
II	OVA-S4 / S4-II	STZ	1,43	0,02	0,10 – 25,27
III	OVA-S8 / S3-I	STZ	0,30	0,005	0,01 – 11,28
IV	OVA-S6 / S4-II	STZ	0,22	0,003	0,016 – 5,55
V	OVA-S4 / S12-II	SMX	9,29	0,21	0,83 – 170,98
VI	OVA-S8 / S12-II	SMX	1,09	0,09	0,24 – 36,84

La Tabla 34 muestra las condiciones de trabajo de los ensayos desarrollados en el formato en placa ELISA y en CD.

La concentración de tampón y el tiempo de competición son las condiciones de trabajo que marcan mayor diferencia entre placa ELISA y CD. En cuanto a sensibilidad, los microinmunoensayos para STZ resultaron ser mucho más sensibles en disco que su equivalente en placa, lo cual podría

Tabla 34. Condiciones de ensayo. Comparación entre los formatos de placa ELISA y CD.

	OVA-S8 / S3-I (STZ)		OVA-S6 / S4-II (STZ)		OVA S8 / S12-II (SMX)	
	ELISA	CD	ELISA	CD	ELISA	CD
[Tampón] (mmol L ⁻¹)	30	2,5	30	2,5	20	10
pH	6	6,5	6	7,5	5,5	8,5
Tween 20 (%, v/v)	0,01	0,025	0,01	0,01	0,025	0,01
Tiempo (min)	60	10	60	10	30	15
IC ₅₀ (ng mL ⁻¹)	1,32	0,30	1,61	0,22	0,16	1,09
LD (ng mL ⁻¹)	0,13	0,005	0,07	0,003	1,20x10 ⁻⁴	0,09
RD (ng mL ⁻¹)	0,29-	0,01-	0,24-	0,016-	5,56x10 ⁻³ -	0,24-
	7,00	11,28	5,00	5,55	1,07	36,84

deberse a que el formato microarray puede aumentar la sensibilidad de los ensayos, tal y como se ha descrito en la literatura²⁷¹. Asimismo, cabe recordar que las condiciones de competición no son idénticas en ambos formatos: el tampón utilizado en el formato CD no es el mismo que el empleado anteriormente en placa ELISA (contiene glicerol, una menor concentración de fosfato y Tween 20, y valores de pH más básicos), y los tiempos de competición son inferiores en CD, lo que puede dar lugar a diferencias entre las características analíticas de ensayos realizados en ambos formatos. Estas diferencias pueden ser positivas, como en el caso de los ensayos para STZ, o negativas, como en el caso del SMX, donde la sensibilidad alcanzada fue menor en CD (aunque aumentó notablemente el intervalo de trabajo).

²⁷¹ Templin, M.F., Stoll, D., Schrenk, M., Traub, P.C., Vöhringer, C.F., Joos, T.O. *Drug Discovery Today* 7 (2002) 815.

En comparación con los kits comerciales basados en métodos inmunoquímicos, y con otros inmunoensayos descritos previamente en la literatura (Tabla 35), cabe destacar la alta sensibilidad alcanzada por los ensayos desarrollados para sulfonamidas con esta novedosa metodología de microinmunoensayo en formato CD (LD entre 0,003 y 0,09 ng mL⁻¹, excepto para el ensayo V, que presentó un LD de 0,21 ng mL⁻¹).

Tabla 35. Comparación de la sensibilidad en formato placa y CD para sulfonamidas alcanzada por diferentes autores

<i>Método</i>	<i>Analito</i>	<i>LD (ng mL⁻¹)</i>
Kits comerciales ^{272,273,274}	STZ	1-300
Haasnoot. ²⁷⁵	STZ	100
Lee ²⁷⁶	STZ	6-21
Pastor-Navarro ²⁷²	STZ	0,03
Ermolenko ²⁷⁷	STZ	24
Franek ²⁷⁸	STZ	8,2
Cliquet ²⁷⁹	STZ	3
Feng ²⁸⁰	SMX	0,067
Sulfonamidas en CD	STZ	0,003 – 0,02
	SMX	0,09 – 0,21

²⁷² Pastor-Navarro, N., García-Bover, C., Maquieira, A., Puchades, R. *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 1088.

²⁷³ http://www.gentaur.com/sulfonamides_residues_elisa_kit.htm

²⁷⁴ <http://www.made-in-china.com/china-products/productviewFoJQIANEJicL/Sulfonamides-SAS-ELISA-Kit.html>

²⁷⁵ Hasnoot, W., Du Pre, J., Cazemier, G., Kemmers-Voncken, A., Verheijen, R., Jansen, B.J.M. *Food. Agric. Immunol.* 12 (2000) 127.

²⁷⁶ Lee, N., Holtzapple, C.K., Muldoon, M.T., Deshpande, S.S., Stanker, L.H. *Food Agric. Immunol.* 13 (2001) 5.

²⁷⁷ Ermolenko, D.N., Eremin, S.A., Mart'ianov, A.A., Zherdev, A.V., Dzantiev, B.B. *Anal. Lett.* 10 (2007) 1047.

²⁷⁸ Franek, M., Diblikova, I., Cernoch, M., Vass, M., Hruska, K. *Anal. Chem.* 78 (2006) 1559.

²⁷⁹ Cliquet, P., Cox, E., Haasnoot, W., Scacht, E., Goddeeris, B.M. *Anal. Chim. Acta* 494 (2003) 21.

²⁸⁰ Feng, T.-T., Li, Z.-Y., Liu, Y.-B., Xu, W.-G., Guan, G.-Y., Han, S.-Q. *Tongweisu* 20 (2007) 20.

En conclusión, cabe resaltar la excelente sensibilidad de los microinmunoensayos desarrollados en CDs para la determinación de sulfonamidas.

9.1.1.7 Ensayos de selectividad

La selectividad de los microinmunoensayos desarrollados para STZ y SMX se evaluó mediante ensayos de reconocimiento frente a catorce compuestos de la familia de las sulfonamidas. Los resultados se muestran en las Tablas 36 y 37.

Los ensayos I y II son altamente específicos para STZ, y muestran valores de RC inferiores al 10% con otras sulfonamidas, excepto en el caso del ensayo I, que muestra reconocimiento frente a sulfamerazina, con un valor de RC del 21,77%. Estos valores pueden considerarse prácticamente despreciables teniendo en cuenta la sensibilidad del inmunoensayo, por lo que puede asumirse que es altamente específico para STZ.

En cambio, los ensayos III y IV para STZ presentan carácter genérico, con reconocimiento de cinco sulfonamidas (RC >10%): STZ, SSZ, SDM, SOX y SMP para el ensayo III, y STZ, SDZ, PSTZ, SDM y SMZ para el ensayo IV.

Al comparar el carácter genérico de los inmunorreactivos OVA S8/S3-I (ensayo A en placa ELISA y III en CD) y OVA S6/S4-II (ensayo B en placa ELISA y IV en CD) en los dos formatos estudiados (placa ELISA y CD), constatamos nuevamente diferencias según el formato empleado. En el primer caso, ambos formatos reconocen STZ, SSZ y SMP, pero en el

segundo caso tan sólo reconocen en común STZ y PSTZ. Cabe destacar también que en placa ELISA se producía el reconocimiento de seis sulfonamidas, mientras que en CD se reconocen cinco (Tabla 38).

Tabla 36. Estudio de selectividad de los ensayos I y II (STZ)

<i>Compuesto</i>		<i>Ensayo I</i>		<i>Ensayo II</i>	
		<i>IC₅₀</i> (ng mL ⁻¹)	<i>RC^c</i> (%)	<i>IC₅₀</i> (ng mL ⁻¹)	<i>RC</i> (%)
Sulfatiazol	STZ	1,97	100	1,43	100
Sulfadiazina	SDZ	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01
Sulfasalazina	SSZ	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01
N ^t -Ftalilsulfatiazol	PSTZ	>10.000	<0,01	62,72	2,28
Sulfanilamida	SAN	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01
Sulfadimetoxina	SDM	>10.000	<0,01	38,06	3,76
Sulfacetamida	SAM	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01
Sulfametazina	SMZ	>10.000	<0,01	182,87	0,78
Sulfisoxazol	SOX	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01
Sulfametoxipiridazina	SMP	>10.000	<0,01	21,25	6,73
Sulfapiridina	SP	85,46	2,31	15,85	9,02
Sulfametizol	SMT	36,77	5,36	80,44	1,78
Sulfametoxazol	SMX	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01
Sulfaguanidina	SG	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01
Sulfamerazina	SMR	9,05	21,77	>10.000	<0,01

Ensayo I: OVA S4/S3-I

Ensayo II: OVA S4/S4-II

RC: reactividad cruzada calculada mediante la ecuación: [IC₅₀ (STZ)/IC₅₀ (interferente)]x100

Tabla 37. Estudio de selectividad de los ensayos III y IV

Compuesto		Ensayo III		Ensayo IV	
		IC ₅₀ (ng mL ⁻¹)	RC ^c (%)	IC ₅₀ (ng mL ⁻¹)	RC (%)
Sulfatiazol	STZ	0,30	100	0,22	100
Sulfadiazina	SDZ	>10.000	<0,01	1,66	13,29
Sulfasalazina	SSZ	0,56	55,36	>10.000	<0,01
N ⁴ -Ftalilsulfatiazol	PSTZ	>10.000	<0,01	0,60	36,84
Sulfanilamida	SAN	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01
Sulfadimetoxina	SDM	1,95	15,90	1,33	16,54
Sulfacetamida	SAM	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01
Sulfametazina	SMZ	>10.000	<0,01	1,98	11,11
Sulfisoxazol	SOX	1,81	17,13	4,27	5,15
Sulfametoxipiridazina	SMP	1,93	16,06	>10.000	<0,01
Sulfapiridina	SP	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01
Sulfametizol	SMT	>10.000	<0,01	4,96	4,44
Sulfametoxazol	SMX	8,32	3,73	2,32	9,50
Sulfaguanidina	SG	6,45	4,81	>10.000	<0,01
Sulfamerazina	SMR	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01

Ensayo III: OVA S8/S3-I

Ensayo IV: OVA S6/S4-II

RC: reactividad cruzada calculada mediante la ecuación: [IC₅₀ (STZ)/IC₅₀ (interferente)]x100

Tabla 38. Selectividad de los ensayos para STZ en formato placa ELISA y CD

OVA-S8 / S3-I		OVA-S6 / S4-II	
ELISA	CD	ELISA	CD
STZ	STZ	STZ	STZ
SSZ	SSZ	PSTZ	PSTZ
SMP	SMP	SMP	SDZ
PSTZ	SDM	SP	SDM
SP	SOX	SMT	SMZ
SMT		SMX	

Sulfonamidas reconocidas por cada ensayo.

En grinta se marcan las coincidencias entre formato ELISA y CD

Por último, en la Tabla 39 se muestran los estudios de selectividad realizados con los ensayos para SMX en CD. El ensayo V mostró reconocimiento de SDZ y SDM (RC 58,38% y 12,1%, respectivamente). Sin embargo, el ensayo VI resultó ser prácticamente específico, con valores de RC inferiores a 0,01%. Dichos resultados concuerdan con los obtenidos en formato de placa ELISA.

Tabla 39. Selectividad de los ensayos V y VI (SMX) en CD

<i>Compuesto</i>		<i>Ensayo V</i>		<i>Ensayo VI</i>	
		<i>IC₅₀</i> (ng mL ⁻¹)	<i>RC^c</i> (%)	<i>IC₅₀</i> (ng mL ⁻¹)	<i>RC</i> (%)
Sulfametoxazol	SMX	9,29	100	1,09	100
Sulfatiazol	STZ	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01
Sulfadiazina	SDZ	15,91	58,38	>10.000	<0,01
Sulfasalazina	SSZ	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01
N ⁴ -Ftalilsulfatiazol	PSTZ	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01
Sulfanilamida	SAN	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01
Sulfadimetoxina	SDM	76,78	12,10	>10.000	<0,01
Sulfacetamida	SAM	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01
Sulfametazina	SMZ	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01
Sulfisoxazol	SOX	219,62	4,23	>10.000	<0,01
Sulfametoxipiridazina	SMP	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01
Sulfapiridina	SP	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01
Sulfametizol	SMT	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01
Sulfaguanidina	SG	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01
Sulfamerazina	SMR	>10.000	<0,01	>10.000	<0,01

Ensayo V: OVA S4/S12-II

Ensayo VI: OVA S8/S12-II

RC: reactividad cruzada calculada mediante la ecuación: $[IC_{50} (STZ)/IC_{50} (interferente)] \times 100$

9.1.2 Aplicación de los ensayos desarrollados en CD para sulfonamidas

9.1.2.1 Determinación de residuos de sulfatiazol en agua

El análisis se llevó a cabo utilizando el ensayo IV (OVA S6 / S4-II), por presentar mayor sensibilidad. Para ello, se seleccionaron ocho muestras de agua residual de distintas depuradoras de la provincia de Valencia.

Las muestras fueron previamente analizadas para comprobar la ausencia de residuos de STZ (<LD), observando además que no existía efecto matriz. Para ello, se almacenaron a 4 °C, se filtraron por gravedad y se analizaron como muestras ciegas. A continuación, se doparon a tres niveles (0,2, 0,5 y 1 ng mL⁻¹) con una mezcla de cinco analitos (STZ, PSTZ, SDM, SMZ, SMX). Los resultados obtenidos (Tabla 40) demuestran la utilidad del método inmunoquímico desarrollado para la determinación de STZ en aguas, a niveles de ng mL⁻¹ utilizando la tecnología de CDs.

Se obtuvieron recuperaciones entre un 78 y un 112 %, con un valor promedio de 95% y una desviación estándar del 9%. Los coeficientes de variación estaban comprendidos entre 4 y 22%, pero sólo en dos casos superaron el 15%, con un CV promedio del 11%.

Así, los resultados obtenidos demuestran la viabilidad y utilidad de la tecnología de microinmunoensayo en CDs, siendo un procedimiento rápido (permite reducir el tiempo de análisis un mínimo de 40 min, respecto a lo establecido en placa) y sencillo, que permite la determinación simultánea de sulfonamidas en diferentes muestras de aguas residuales simultáneamente.

Tabla 40. Recuperaciones obtenidas en el análisis de distintas muestras de agua de depuradora (dopadas con una mezcla de STZ, PSTZ, SDM, SMZ, SMX) utilizando el ensayo IV.

M	0,2 ng mL ^{-1a}		0,5 ng mL ⁻¹		1 ng mL ⁻¹	
	<i>Eq STZ determinados (ng mL⁻¹)</i>	<i>R (%)</i>	<i>Eq STZ determinados (ng mL⁻¹)</i>	<i>R (%)</i>	<i>Eq STZ determinados (ng mL⁻¹)</i>	<i>R (%)</i>
1	0,21 ± 0,02	106	0,49 ± 0,05	98	0,79 ± 0,05	79
2	0,16 ± 0,02	78	0,51 ± 0,02	103	0,86 ± 0,10	86
3	0,17 ± 0,02	84	0,55 ± 0,07	111	1,03 ± 0,11	103
4	0,18 ± 0,01	91	0,42 ± 0,04	84	1,00 ± 0,12	100
5	0,22 ± 0,05	112	0,45 ± 0,07	90	0,95 ± 0,07	95
6	0,19 ± 0,02	95	0,52 ± 0,08	104	0,94 ± 0,08	94
7	0,20 ± 0,03	102	0,52 ± 0,08	105	0,97 ± 0,12	97
8	0,18 ± 0,02	91	0,45 ± 0,06	91	0,93 ± 0,12	93

^a eq STZ en placa

Resultados expresados como equivalentes de STZ, media ± desviación estándar (n=3)

9.1.2.2 Determinación de residuos de sulfametoxazol en agua

El SMX ha sido frecuentemente detectado en aguas superficiales, subterráneas e incluso en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas. Para demostrar la aplicabilidad del formato de ensayo desarrollado sobre CDs, se efectuó la determinación de residuos de este analito en dieciocho muestras de efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas de la provincia de Valencia. La determinación se llevó a cabo mediante el ensayo VI (OVA-S8/S12-II), por poseer las mejores prestaciones analíticas.

Para ello, se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior (filtración por gravedad). Las muestras fueron previamente

analizadas para comprobar la ausencia de residuos de SMX. El SMX no fue detectado en el 90% de las muestras (<LD), pero dos de ellas dieron resultados positivos, con valores similares al LD del método (0,10 ng mL⁻¹ y 0,09 ng mL⁻¹).

A continuación, las muestras libres de SMX se doparon a tres niveles (0,5 ng mL⁻¹, 1 ng mL⁻¹ y 4 ng mL⁻¹) y se analizaron mediante inmunoensayo en soporte CD. Los resultados (Tabla 41) muestran que se obtuvieron buenos valores de recuperación, con un mínimo de 70% y un máximo de 112% (en el intervalo considerado óptimo). Asimismo, la recuperación media fue de 87%, 96% y 80%, para niveles de dopaje de 0,5, 1 y 4 ng mL⁻¹, respectivamente. El valor total de recuperación media obtenido (87%, con desviación estándar de 5%) demuestra que este inmunoensayo en CD puede ser aplicado como método de control y cuantificación de residuos de SMX en aguas de depuradora a concentraciones de ng mL⁻¹.

Para establecer la reproducibilidad *inter-día* de la metodología en formato CD, se utilizó agua de depuradora dopada a tres niveles con SMX. Las muestras se analizaron mediante el ensayo VI en cuatro días consecutivos (Tabla 42).

Tabla 41. Recuperaciones obtenidas en el análisis de muestras de agua de depuradora (dopadas con SMX) utilizando el ensayo VI.

Muestra	0,5 ng mL ⁻¹		1 ng mL ⁻¹		4 ng mL ⁻¹	
	[SMX] ^a ng mL ⁻¹	R (%)	[SMX] ng mL ⁻¹	R (%)	[SMX] ng mL ⁻¹	R (%)
1	0,42 ± 0,06	84	0,93 ± 0,09	93	3,21 ± 0,83	80
2	0,45 ± 0,09	90	1,02 ± 0,14	102	3,46 ± 0,40	87
3	0,44 ± 0,15	88	0,92 ± 0,13	92	3,13 ± 0,27	78
4	0,43 ± 0,06	86	0,96 ± 0,02	96	2,81 ± 0,16	70
5	0,46 ± 0,11	92	1,06 ± 0,05	106	3,32 ± 0,41	83
6	0,48 ± 0,07	96	1,03 ± 0,14	103	3,44 ± 0,69	86
7	0,39 ± 0,10	78	0,96 ± 0,20	96	3,21 ± 0,89	80
8	0,40 ± 0,09	80	0,84 ± 0,05	84	3,11 ± 0,51	78
9	0,42 ± 0,07	84	0,92 ± 0,09	92	3,23 ± 0,80	81
10	0,39 ± 0,07	78	0,91 ± 0,16	91	3,03 ± 0,18	76
11	0,44 ± 0,02	88	0,93 ± 0,23	93	3,09 ± 0,62	77
12	0,44 ± 0,13	88	0,94 ± 0,15	94	3,19 ± 0,71	80
13	0,46 ± 0,19	92	0,91 ± 0,36	91	3,26 ± 0,76	82
14	0,42 ± 0,03	84	1,12 ± 0,07	112	2,99 ± 0,70	75
15	0,43 ± 0,07	86	0,97 ± 0,14	97	3,09 ± 0,97	77
16	0,45 ± 0,10	90	0,91 ± 0,71	91	3,33 ± 0,39	83

^a Resultados expresados como media ± desviación estándar (n=3)

Tabla 42. Reproducibilidad *inter-día* en la determinación de SMX en agua de depuradora.

Dia	0,5 ng mL ⁻¹		1 ng mL ⁻¹		4 ng mL ⁻¹	
	[SMX] ^a ng mL ⁻¹	R (%)	[SMX] ng mL ⁻¹	R (%)	[SMX] ng mL ⁻¹	R (%)
1	0,46 ± 0,02	92	1,06 ± 0,11	106	3,51 ± 0,73	88
2	0,44 ± 0,05	88	0,97 ± 0,09	97	3,43 ± 0,64	86
3	0,40 ± 0,07	80	0,89 ± 0,12	89	2,93 ± 0,38	73
4	0,42 ± 0,06	84	0,92 ± 0,08	92	3,26 ± 0,52	82

^a Resultados expresados como media ± desviación estándar (n=3)

A pesar de la naturaleza de la matriz, las recuperaciones obtenidas oscilaron entre 80 y 106%, con un resultado promedio del 88%, lo que indica que todos los valores son aceptables y están en el intervalo considerado óptimo (80-120%). Asimismo, se obtuvo un coeficiente de variación inter-día del 8,44%.

A modo de recopilación, se puede decir que el método desarrollado para la determinación de SMX en aguas de depuradora mediante microinmunoensayo sobre CD es robusto, con buena reproducibilidad inter-día a las concentraciones estudiadas, y presenta una buena sensibilidad y recuperación, con un tratamiento de muestra sencillo, lo cual lo hace muy adecuado para su aplicación en aguas.

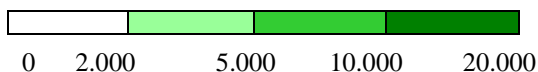
9.2 Tetraciclinas

Debido a los bajos títulos obtenidos en placa ELISA en el caso de las tetraciclinas, se procedió a evaluar directamente el comportamiento del sistema desarrollado anteriormente: OVA-CTC-1/OTC-I. Para ello, se llevó a cabo una titulación (según protocolo descrito en apartado 6.5.1) con diferentes concentraciones de conjugado de tapizado (entre 10 mg L^{-1} y $0,25 \text{ ng mL}^{-1}$) y suero (1/125 – 1/2.000). Los valores de absorbancia leídos para cada par suero/conjugado de tapizado se han expresado como unidades arbitrarias (L, M y H), correspondientes al factor de dilución aplicado a los sueros (L<1/10.000, M=1/10.000 a 1/30.000, y H>1/30.000) para obtener señales comprendidas entre 10.000 y 20.000. Los resultados se han asociado a un color con el fin de facilitar la lectura de la Tabla 43.

Tabla 43. Resultados de la titulación para el ensayo OVA-CTC-1 // OTC-I en CD

OVA CTC-1	OTC-I 1/125	OTC-I 1/250	OTC-I 1/500	OTC-I 1/750	OTC-I 1/1.000	OTC-I 1/2.000
10 mg L ⁻¹	H	H	H	M	L	L
5 mg L ⁻¹	H	H	M	M	L	L
3 mg L ⁻¹	H	M	L	L	L	N
2 mg L ⁻¹	H	M	L	L	L	N
1 mg L ⁻¹	M	L	N	N	N	N
500 ng L ⁻¹	M	L	N	N	N	N
250 ng L ⁻¹	L	L	N	N	N	N
125 ng L ⁻¹	L	L	N	N	N	N
75 ng L ⁻¹	L	N	N	N	N	N
50 ng L ⁻¹	L	N	N	N	N	N
25 ng L ⁻¹	L	N	N	N	N	N
0 ng L ⁻¹	N	N	N	N	N	N

Señal



A la vista de los resultados, se escogieron concentraciones de tapizado de 10 o 5 mg L⁻¹, y 1/250 o 1/500 de suero, para proceder posteriormente a su optimización.

Las relaciones suero/conjugado de tapizado que mostraron reconocimiento específico fueron utilizadas para llevar a cabo ensayos competitivos frente a CTC. Los resultados pueden observarse en la Tabla 44.

Tabla 44. Optimización de la concentración de inmunorreactivos en el ensayo para CTC. Valores de IC₅₀ (mg L⁻¹).

OVA CTC-1	OTC-I 1/125	OTC-I 1/250	OTC-I 1/500	OTC-I 1/750
10 mg L ⁻¹	44,97	25,49	nc	nc
5 mg L ⁻¹	40,67	21,27	nc	nc
3 mg L ⁻¹	38,46	20,93	nc	nc

Se observa que la sensibilidad es mejor para una dilución de suero 1/250, sin embargo, a concentraciones menores no se obtuvo competición. Asimismo, la mayor concentración de tapizado arroja los resultados menos sensibles. En términos de sensibilidad, los valores de IC₅₀ fueron muy similares tanto para concentración de tapizado de 5 mg L⁻¹ como de 3 mg L⁻¹, aunque para esta última la señal obtenida fue mucho menor, siendo seleccionado OVA CTC-1 5 mg L⁻¹ y OTC-I 1/250. Con ello, antes de la optimización, el valor de IC₅₀ en formato CD (21,27 ng mL⁻¹) resulta ser considerablemente inferior al obtenido en placa ELISA (IC₅₀ = 257 ng mL⁻¹). Este resultado puede deberse - al igual que en el caso de las sulfonamidas - al tamaño del *spot* propio de un *microarray*, así como a las condiciones de competición (tampón y tiempo) utilizadas en CD.

9.2.1 Optimización y características de los microinmunoensayos

9.2.1.1 Efecto de la fuerza iónica

Para estudiar el efecto de la fuerza iónica en las prestaciones del ensayo para CTC, se ensayaron concentraciones entre $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ y 20 mmol L^{-1} de fosfatos (Figura 69). Se observó que, en líneas generales, tanto la señal como la IC_{50} disminuían gradualmente a medida que aumentaba la concentración del tampón. Como ya se ha comentado, este aumento de sensibilidad indica que las interacciones que tienen lugar entre el analito y el anticuerpo son principalmente hidrofóbicas.

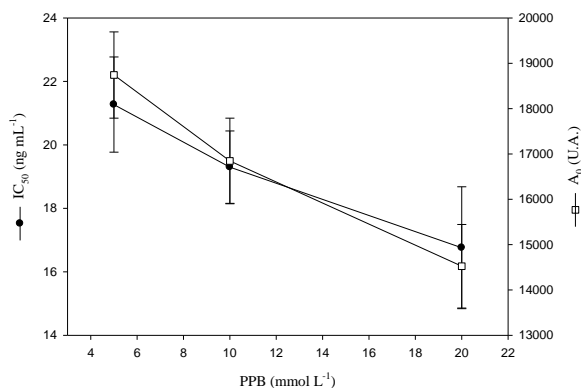


Figura 69. Efecto de la fuerza iónica en las características del microinmunoensayo para CTC

Debido a la fuerte disminución de señal con el aumento de fuerza iónica, no se ensayaron concentraciones de fosfatos superiores a 20 mmol L^{-1} . En este ensayo, la concentración de tampón fosfato 20 mmol L^{-1} fue la que proporcionó las mejores relaciones señal/sensibilidad, seleccionándose ésta para proseguir los estudios.

9.2.1.2 Efecto del pH

A continuación se evaluó la influencia del pH del medio en las características del microinmunoensayo sobre CD (Figura 70). Cabe destacar que para pH 9,5 no hubo competición, ya que las tetraciclinas presentan poca estabilidad en medios fuertemente ácidos o básicos.

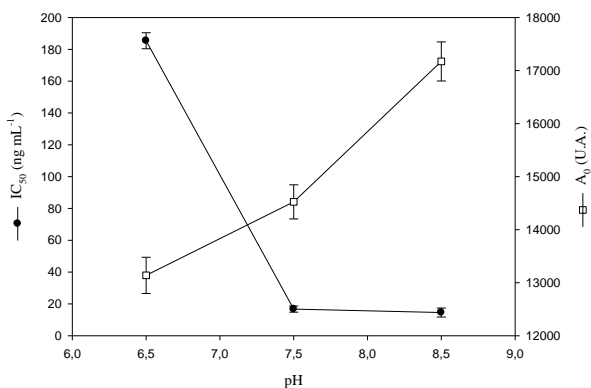


Figura 69. Efecto del pH en las características del microinmunoensayo para CTC

Como se puede observar en la Figura 70, la sensibilidad mejora ligeramente a pH 7,5-8,5, mientras que la señal aumenta considerablemente a medida que aumenta la basicidad del medio. Por tanto, se seleccionó pH 8,5 como óptimo.

9.2.1.3 Efecto de la concentración de tensoactivo

Partiendo de las condiciones seleccionadas anteriormente, se procedió a examinar el efecto de la concentración de tensoactivo en las características del microinmunoensayo. Para ello, se incrementó el porcentaje de Tween 20 en el tampón fosfato entre 0 y 0,05% (v/v).

Nuevamente, se observa (Figura 71) que tanto la IC_{50} como la señal crecen al aumentar la concentración de tensoactivo, al igual que sucedía en otros microinmunoensayos²⁸¹. Por ello, se seleccionó una concentración 0,01% de Tween 20 como compromiso entre sensibilidad y ausencia de interacciones inespecíficas.

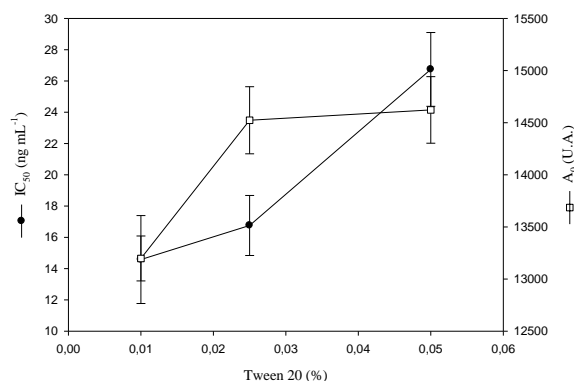


Figura 71. Efecto de la concentración de tensoactivo en el microinmunoensayo para CTC

²⁸¹ Pastor-Navarro, N., Brun, E.M., Gallego-Iglesias, E., Maquieira, A., Puchades, R. *J. Environ. Monit.* 11 (2009) 1094.

9.2.1.4 Efecto del tiempo de incubación en la etapa competitiva

Por último, se procedió a estudiar la influencia del tiempo de competición, obteniendo curvas de calibrado para tiempos comprendidos entre 5 y 20 min. Los resultados (Figura 72) mostraron que tanto señal como sensibilidad aumentaban con el tiempo de competición. Así, con el fin de obtener ensayos sensibles, con buena reproducibilidad, una señal adecuada y en un tiempo reducido, se seleccionó como tiempo de incubación óptimo 15 min.

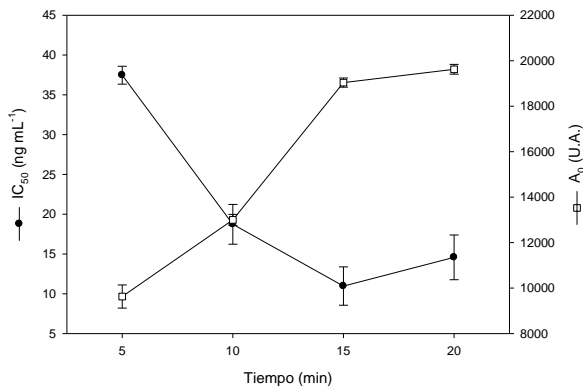


Figura 72. Influencia del tiempo de incubación de la etapa competitiva en las características del microinmunoensayo para CTC

9.2.1.5 Efecto de las condiciones de incubación con el anticuerpo secundario.

Tal y como ya se ha comentado anteriormente, al trabajar en CDs es necesario establecer la concentración óptima de anticuerpo secundario GAR-Gold y la duración de la etapa de incubación (Figura 73, Tabla 45).

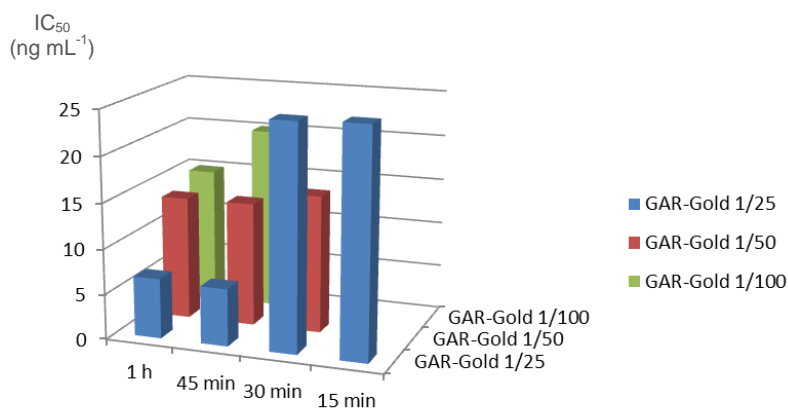


Figura 73. Efecto del tiempo de incubación y la dilución de anticuerpo secundario GAR-Gold en la sensibilidad.

Como puede observarse en la Figura 73, tanto la señal como la sensibilidad disminuyen al reducir el tiempo de incubación y la concentración del anticuerpo secundario GAR-Gold.

Al observar los resultados numéricos (Tabla 45) se constata que no se obtiene señal para concentraciones bajas (1/200) o tiempos muy reducidos.

Tabla 45. Optimización del tiempo de incubación con anticuerpo secundario GAR-Gold.

[GAR-GOLD] (ng mL ⁻¹)	t	60 min	45 min	30 min	15 min
1/25	IC ₅₀	6,62 ± 3,18	6,33 ± 2,34	24,69 ± 2,64	24,91 ± 3,88
	A ₀	25.490 ± 104,62	24.325 ± 101,41	13.478 ± 429,62	13.386 ± 531,27
1/50	IC ₅₀	13,62 ± 3,35	13,67 ± 3,68	15,16 ± 2,96	-
	A ₀	19.720 ± 130,55	14.906 ± 554,96	12.092 ± 472,83	no señal
1/100	IC ₅₀	14,97 ± 2,41	20,13 ± 4,51	-	-
	A ₀	12.476 ± 320,72	11.990 ± 457,84	no señal	no señal
1/200	IC ₅₀	-	-	-	-
	A ₀	no señal	no señal	no señal	no señal

IC₅₀ (ng mL⁻¹), A₀ (U.A.)

También se puede observar que al trabajar con concentraciones altas de GAR-Gold (1/25 y 1/50) la sensibilidad se mantiene al reducir el tiempo de incubación a 45 min, aunque la señal disminuye considerablemente cuando se emplea GAR-Gold 1/50 y 45 min de incubación. Mientras que a concentraciones bajas de GAR-Gold, la sensibilidad disminuye o no hay señal. Por ello, se seleccionó una concentración de GAR-Gold 1/25 y un tiempo de incubación de 45 min por proporcionar la mejor sensibilidad manteniendo una señal neta elevada.

Al comparar los resultados con los obtenidos en la optimización con anticuerpo secundario para el caso de sulfonamidas en CD (ver Tabla 30, pág. 146), se observa que el ensayo para CTC requiere mayor concentración de anticuerpo GAR-Gold y mayor tiempo de incubación que los ensayos para sulfonamidas. Esto puede deberse a una menor afinidad del suero obtenido con el hapteno para CTC por el anticuerpo secundario GAR-Gold.

9.2.1.6 Prestaciones analíticas del microinmunoensayo optimizado

Durante el proceso de optimización, el microinmunoensayo desarrollado frente a CTC mejoró la sensibilidad más de un 70%, ya que la IC_{50} pasó de 21,27 ng mL⁻¹ a 6,33 ng mL⁻¹.

La Tabla 46 muestra las condiciones de trabajo seleccionadas como óptimas.

Tabla 46. Condiciones de trabajo óptimas del microinmunoensayo para CTC

<i>Parámetros</i>	<i>Condiciones seleccionadas</i>
PBS (mmol L ⁻¹)	20
pH	8,5
Tween 20 (%)	0,01
Tiempo competición (min)	15
[GAR-Gold]	1/25
Tiempo GAR-Gold (min)	45

A continuación, se muestra la curva de calibrado para CTC, obtenida utilizando las condiciones de trabajo óptimas (Figura 74). Como se puede observar, el ensayo permite cuantificar CTC de manera sensible y reproducible, con valores de desviación estándar relativa del 5%.

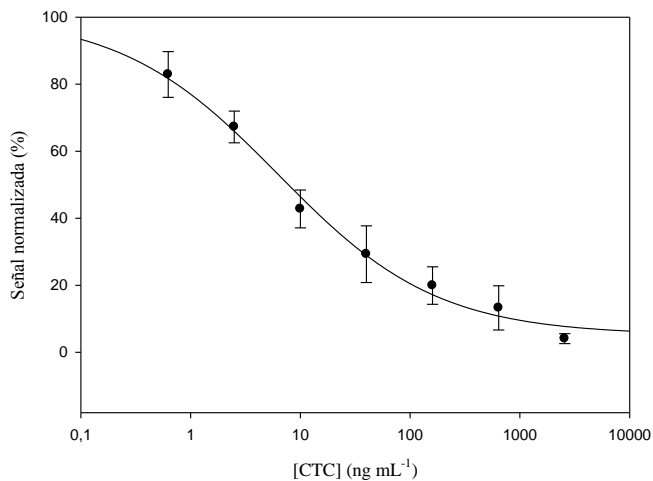


Figura 74. Curva patrón del microinmunoensayo para CTC (media y desviación de tres réplicas)

En la Tabla 47 se resumen las principales características analíticas del inmunoensayo optimizado en CD. También se incluyen los resultados obtenidos con el ensayo desarrollado en placa ELISA, para facilitar la comparación.

Se observa que se obtiene mejor sensibilidad al utilizar el formato de microinmunoensayo en CD, ya que se alcanza un valor de IC_{50} 1/6 inferior al obtenido en placa ELISA. Además, el formato CD presenta otras ventajas tales como su mayor capacidad de trabajo, el menor consumo de reactivos y la facilidad de manejo.

Tabla 47. Parámetros analíticos del inmunoensayo para CTC utilizando CD y placa ELISA

<i>Parámetros</i>	<i>CD</i>	<i>ELISA</i>
<i>IC₅₀ (ng mL⁻¹)</i>	6,33	36,40
<i>LD (ng mL⁻¹)</i>	0,20	2,66
<i>RD (ng mL⁻¹)</i>	0,75 – 106,53	6,70 – 193,20
<i>Capacidad</i>	Hasta 3.072 puntos	96 celdas
<i>Consumo de reactivos</i>	100 nL – 1μL/punto	100μL/celda

LD (límite de detección): concentración que inhibe un 10% de la señal máxima

IC₅₀: concentración de analito que inhibe la señal máxima un 50%

RD (intervalo de trabajo o rango dinámico): concentraciones que inhiben la señal máxima entre 20% y 80%

Tal y como se ha comentado (apartado 8.2.2.6), en la literatura se han puesto a punto distintos inmunoensayos en placa ELISA para la determinación de tetraciclinas. La Tabla 48 muestra la sensibilidad alcanzada con dichos métodos para la determinación de CTC, además de la del ensayo desarrollado en CD.

Existen diversos kits comerciales para la determinación de tetraciclinas, basados en métodos inmunoquímicos, capaces de determinar CTC a un nivel de ng mL⁻¹, pero presentando reactividad cruzada con otras tetraciclinas.

Tabla 48. Comparación de la sensibilidad alcanzada para la determinación de CTC por diferentes autores

<i>Método</i>	<i>LD (ng mL⁻¹)</i>	<i>Reactividad Cruzada</i>
Ridascreen Tetracycline Test ²⁸²	< 15 ng mL ⁻¹ (CTC)	TC, MNC, RTC, OTC
SNAP Tetracycline Test kit ²⁸³	100 ng mL ⁻¹ (CTC)	TC, OTC
Lang ²⁸⁴	5 ng mL ⁻¹ (TC)	CTC, MNC, RTC
Everest ²⁸⁵	15 ng mL ⁻¹ (CTC)	OTC, TC
Zhang ²⁸⁶	> 3.000 ng L ⁻¹ (CTC)	TC
Pastor-Navarro ²⁸⁷	0,4 ng mL ⁻¹ (TC)	RTC, OTC, MC, CTC
Jeon ²⁸⁸	0,48 ng mL ⁻¹ (TC)	CTC, OTC
CD	0,20 ng mL⁻¹ (CTC)	-

Por otro lado, entre los métodos inmunoquímicos previamente descritos en la literatura se observan algunos con valores de IC₅₀ muy elevados para la determinación de CTC²⁸⁴⁻²⁸⁶ (LD 5 - 3.000 ng mL⁻¹) y otros valores más sensibles^{287,288} (LD 0,4 – 0,48 ng mL⁻¹). Sin embargo, todos estos ensayos presentan reactividad cruzada con otras tetraciclinas. Así, se puede concluir que el microinmunoensayo desarrollado en esta tesis para la determinación de CTC sobre CD presenta una sensibilidad muy superior (LD 0,20 ng mL⁻¹) a la obtenida con otros métodos inmunoquímicos descritos previamente para tetraciclinas. Por otro lado, cabe destacar su carácter específico, tal y como se detallará a continuación.

²⁸² <http://www.biokits.com/productinfo/912/RIDASCREEN-reg-Tetracycline.html>

²⁸³ http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en_us/dairy/snap/0612015.pdf

²⁸⁴ Lang, B., Martlbauer, E., Terplan, G. *Arch Lebensmittelhyg* 43 (1992) 77.

²⁸⁵ Everest, S.J., Cobb, A.L., Courboin, G.M., Jackman, R. *Food Agric. Immunol.* 6 (1994) 55.

²⁸⁶ Zhang, Y., Lu, S., Liu, W., Zhao, C., Xi., R. *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 211.

²⁸⁷ Pastor-Navarro, N., Morais, S., Maquieira, A. Puchades, R. *Anal. Chim. Acta* 594 (2007) 211.

²⁸⁸ Jeon, M., Kim, J., Paeng, K.-J., Park, S.-W., Rhee Paeng, I. *J. Microchem* 88 (2008) 26.

9.2.1.7 Ensayos de selectividad

La selectividad de los ELISAs desarrollados en CD para CTC se evaluó mediante ensayos de reconocimiento de inmunorreactivos frente a siete compuestos de la familia de las tetraciclinas (Tabla 49), obteniendo valores de selectividad inferiores al 8% para todas los compuestos ensayados. De nuevo, la única sustancia que presentó un valor de RC significativo fue la tetraciclina.

Como ya se ha comentado anteriormente, este es, según nuestro conocimiento, el primer inmunoensayo específico para la determinación de CTC descrito en la literatura.

Tabla 49. Estudio de selectividad para el microinmunoensayo para CTC

		IC₅₀ (mg L⁻¹)	RC (%)
7-Clortetracyclina	CTC	6,33	100
Tetraciclina	TC	89,12	7,10
Oxitetraciclina	OTC	>10.000	<0,01
Rolitetraciclina	RTC	>10.000	<0,01
Doxiciclina	DXC	>10.000	<0,01
Anhidrotetraciclina	ATC	>10.000	<0,01
Metaciclina	MC	>10.000	<0,01
Minociclina	MNC	>10.000	<0,01

RC: reactividad cruzada calculada mediante la ecuación: $[IC_{50} (STZ)/IC_{50} (interferente)] \times 100$

9.2.2 Aplicación de los ensayos desarrollados en CD para clortetraciclina

9.2.2.1 Determinación de residuos de clortetraciclina en dorada (*Sparus aurata*)

A pesar de la prohibición del uso de los antimicrobianos como promotores del crecimiento establecida por la Unión Europea (regulación 1831/2003 del Parlamento Europeo, vigente a partir de 1/1/2006), en EEUU existen ciertas sustancias autorizadas como promotores del crecimiento, entre las que se encuentra la clortetraciclina.

También se ha demostrado la presencia de residuos de tetraciclinas, en cantidades detectables, en muestras de carne de distintas especies de peces²⁸⁹. Concretamente, la CTC ha sido detectada²⁹⁰ a una concentración de 7,21 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Para demostrar el potencial del ensayo desarrollado, se analizaron cuatro muestras ciegas de pescado *Sparus aurata* (dorada) mediante microinmunoensayo en CD. No se detectaron residuos de CTC en ninguna de las muestras analizadas (<LD).

Para llevar a cabo el análisis en las muestras de pescado, se desechó la cabeza, la cola y las vísceras, y se retiró la espina central. El resto se homogenizó en un molino de aspas metálicas hasta obtener una papilla perfectamente homogénea. A continuación se pesaron 5 g de muestra, a los que se añadieron 25 mL de una disolución agua/metanol 1:1

²⁸⁹ Fortt, A., Cabello, F., Buschmann, A. *Re. Chil. Infect.* 24 (2007) 14.

²⁹⁰ Koeypudsa, W. The Impact of Chlortetracycline Residue from Fresh Chicken Manure on Pond Ecosystem. Thesis (Ph.D.). Asian Institute of Technology, 2005.
<http://www.library.ait.ac.th/ThesisSearch/showDetails.asp?id=552>

(v/v) con 0,4% de EDTA. El EDTA se añadió para evitar que la CTC formara complejos con iones metálicos o se uniera a proteínas, y mantener así la máxima capacidad de extracción²⁹¹. Posteriormente, se agitó en vortex durante 1 min y se centrifugó a 11.000 r.p.m. durante 5 min. Tras decantar el sobrenadante, se dejó reposar durante 2h en oscuridad. Posteriormente se centrifugó de nuevo a 11.000 r.p.m. durante 5 min, y se filtró el sobrenadante a través de un disco de membrana de 0,2 µm de tamaño de poro.

Una vez comprobada la ausencia de residuos, los extractos de las cuatro muestras fueron enriquecidos con CTC a cuatro niveles (50, 10, 5 y 2,5 ng mL⁻¹ en placa) y cuantificados mediante el microinmunoensayo en CD.

La Tabla 50 muestra las recuperaciones obtenidas, que oscilaron entre 81% y 115 %, con un valor promedio de 96% y una precisión de 12%. Los coeficientes de variación estaban comprendidos entre 7 y 17%, pero sólo en un caso se superó el 15%, obteniéndose un CV promedio del 11%. Así, los resultados obtenidos demuestran la viabilidad y utilidad de la tecnología de microinmunoensayo en CD, siendo un procedimiento sensible, rápido y con gran capacidad de trabajo que permite la determinación de residuos de clortetraciclina en músculo de dorada por debajo de los límites máximos de residuos establecidos por la legislación, con un tratamiento de muestra sencillo y sin necesidad de utilizar disolventes.

²⁹¹ Wen, Y., Wang, Y., Feng, Y-Q. *Talanta* 70 (2006) 153

Tabla 50. Recuperaciones obtenidas en el análisis de muestras de *Sparus aurata* dopada con CTC

Muestra	[CTC] añadido (ng mL ⁻¹)	[CTC] encontrado (ng mL ⁻¹) ^a	Recuperación (%)
A	50	47,76 ± 6,05	96
	10	8,64 ± 0,97	86
	5	5,75 ± 0,43	115
	2,5	2,75 ± 0,23	110
B	50	51,24 ± 6,37	102
	10	8,80 ± 1,19	88
	5	4,29 ± 0,56	86
	2,5	2,61 ± 0,25	104
C	50	52,72 ± 6,71	105
	10	11,46 ± 1,00	115
	5	4,05 ± 0,48	81
	2,5	2,24 ± 0,22	90
D	50	46,12 ± 7,96	92
	10	8,07 ± 0,65	81
	5	4,09 ± 0,31	82
	2,5	2,77 ± 0,24	111

^a Los resultados se muestran como media ± desviación estándar (n=3).

9.3 Inmunoensayos en CD: conclusiones

Se han desarrollado dos microinmunoensayos genéricos en CD para la determinación de cinco sulfonamidas, con valores de IC₅₀ entre 0,22 y 1,98 ng mL⁻¹ y otro microinmunoensayo para la determinación de SMX con un valor de IC₅₀ de 1,09 ng mL⁻¹. Por otro lado, también se ha desarrollado un microinmunoensayo específico para la determinación de CTC, con un valor de IC₅₀ de 6,33 ng mL⁻¹.

Finalmente, estos microinmunoensayos se han aplicado con éxito a la cuantificación de residuos de sulfonamidas en muestras de alimentos (pescado) y medioambientales (aguas de depuradora).

CONCLUSIONES GENERALES

En la presente tesis doctoral se han desarrollado una serie de inmunoensayos capaces de determinar antimicrobianos, tanto sulfonamidas como tetraciclinas, destacando su sensibilidad y sencillez.

En primer lugar, se ha trabajado en **placa ELISA**, habiéndose seleccionado nuevos reactivos con los que se han desarrollado y optimizado por un lado ensayos genéricos, capaces de determinar simultáneamente un gran número de sulfonamidas, y por otro, inmunoensayos específicos para algunas sulfonamidas concretas.

Así, se han desarrollado con éxito tres ELISAs genéricos (ensayos A, B y C) para la determinación de sulfonamidas, presentando una elevada sensibilidad. Además, son comparables en cuanto a capacidad de reconocimiento y sensibilidad, tanto a kits comerciales como a otros ensayos descritos previamente en la literatura.

Asimismo, cabe señalar que se han puesto a punto ELISAs específicos para la determinación de SSZ, SMX y CTC, con resultados de sensibilidades comparables a los métodos cromatográficos recogidos en la bibliografía. Cabe destacar que el ensayo para SSZ es, según nuestro conocimiento, el primer inmunoensayo específico para la determinación de SSZ descrito en la literatura, mientras que el ensayo para SMX es, según la información recogida, el inmunoensayo más sensible desarrollado hasta este momento para esta sulfonamida. Por otro lado, se ha obtenido el primer inmunoensayo específico para la determinación de CTC descrito en la literatura.

Dichos ELISAs se han aplicado con éxito a la cuantificación de residuos de sulfonamidas en muestras de alimentos (miel). Estos resultados

muestran su gran potencial para aplicación en *screening* de residuos de sulfonamidas a concentraciones inferiores al LMR en alimentos. Además, de acuerdo a nuestra información, estos son los únicos ELISAs que permiten determinar simultáneamente varias sulfonamidas en miel. Asimismo, el ensayo para SMX ha sido aplicado a la determinación de aguas de depuradora, lo cual resulta de gran interés para el control medioambiental, ya que dicha sulfonamida ha sido frecuentemente detectada en aguas superficiales, subterráneas, e incluso en plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas. Por último, el ensayo para SSZ se ha aplicado en muestras de plasma humano, lo que podría permitir la monitorización de la concentración de SSZ y de la función hepática, ayudando a ajustar las dosis y decidir si el tratamiento debe ser interrumpido para evitar daños en el paciente.

Cabe destacar que los métodos desarrollados para la determinación de sulfonamidas en muestras reales incluyen tratamientos de muestra sencillos, lo cual los hace muy adecuado para análisis de campo.

Se ha puesto a punto una metodología muy novedosa basada en **tecnología de disco compacto**. Ello ha permitido disponer de una nueva herramienta analítica aplicable a microinmunoensayos. Se ha probado, por primera vez, que un dispositivo de lectura/grabación óptico (lector/grabador de CDs) integrado en un ordenador personal convencional puede tener un alto potencial analítico, utilizando el diodo del lector de CDs como fuente láser de barrido. Se ha demostrado, a su vez, la aplicación de la tecnología de CDs para la generación de una señal inmunoquímica *in situ* sin interrumpir la lectura normal del disco.

El procedimiento desarrollado utilizando un lector/grabador de CDs como detector, es altamente operativo y permite el desarrollo del ensayo en un tiempo total de 90 minutos. Además de la simplicidad de operación y manejo, de su versatilidad, y del bajo coste económico del soporte (disco) y del lector de CDs, éste ha resultado ser un sistema de detección muy sensible comparado con los lectores de *microarrays* convencionales.

Utilizando esta tecnología se han puesto a punto con éxito ensayos específicos para la determinación de STZ, SMX y CTC, y ensayos genéricos capaces de reconocer un conjunto de sulfonamidas.

Los resultados obtenidos demuestran la viabilidad y utilidad de la tecnología de microinmunoensayo en CD. El procedimiento es rápido, sencillo y permite analizar gran cantidad de muestras simultáneamente. Asimismo, las sensibilidades alcanzadas son muy buenas, mejorando los valores de IC_{50} obtenidos en placa ELISA, y con resultados comparables a los métodos descritos en la literatura.

Los microinmunoensayos desarrollados se han aplicado con éxito a la cuantificación de residuos de sulfonamidas en muestras de alimentos (pescado) y medioambientales (aguas de depuradora), utilizando tratamientos de muestra rápidos y sencillos.

La viabilidad de la tecnología de disco compacto para la determinación sencilla y sensible de antimicrobianos abre un amplio abanico de posibilidades para la implementación de dichos dispositivos en el estudio de numerosas sustancias, y su posterior aplicación a campos como el clínico, agroalimentario o medioambiental.

PUBLICACIONES ASOCIADAS

AUTORES (p.o. de firma): N. Pastor-Navarro, E. Gallego-Iglesias, A. Maquieira, R. Puchades.
TÍTULO: Development of a group-specific immunoassay for sulfonamides.

REF. REVISTA/LIBRO:(ISBN, ISSN,...): Talanta CLAVE: A
VOLUMEN: 71 PÁGINAS: 923-933 AÑO: 2007

AUTORES (p.o. de firma): N. Pastor-Navarro, E. Gallego-Iglesias, A. Maquieira, R. Puchades.
TÍTULO: Immunochemical method for sulfasalazine determination in human plasma.

REF. REVISTA/LIBRO:(ISBN, ISSN,...): Analytica Chimica Acta CLAVE: A
VOLUMEN: 583 PÁGINAS: 377-383 AÑO: 2007

AUTORES (p.o. de firma): N. Pastor-Navarro, E. M. Brun, E. Gallego-Iglesias, A. Maquieira, R. Puchades
TÍTULO: Development of immunoassays to determinate sulfamethoxazole residues in wastewaters

REF. REVISTA/LIBRO:(ISBN, ISSN,...): Journal of Environmental Monitoring CLAVE: A
VOLUMEN: 11 PÁGINAS: 1094-1100 AÑO: 2009

ANEXOS

Anexo 1. Resultados de los ensayos de titulación de sulfonamidas en placa ELISA.

<i>suero</i> <i>conjugado</i>	OVA S2	OVA S3	OVA S4	OVA S5	OVA S6	OVA S7	OVA S8
S2-I	H	M	H	N	L	N	L
S2-II	H	L	H	N	L	N	L
S3-I	M	M	H	N	L	L	H
S3-II	M	L	H	N	L	N	L
S4-I	H	H	H	N	H	N	M
S4-II	H	N	H	N	H	N	L
S5-I	M	L	H	M	H	M	H
S5-II	M	N	M	M	M	L	H
S6-I	N	N	N	N	N	N	N
S6-II	N	N	N	N	N	N	N
S7-I	N	N	L	N	L	L	H
S7-II	N	N	N	N	L	N	L
S8-I	N	N	N	N	L	N	M
S8-II	N	N	N	N	H	L	H
S9-I	M	N	N	N	N	N	N
S9-II	M	N	N	N	N	N	N
S10-I	M	N	L	N	N	N	N
S10-II	L	N	L	N	N	N	N
S11-I	M	N	L	N	N	N	N
S11-II	M	M	M	N	N	N	N
S12-I	L	N	L	N	N	N	N
S12-II	N	N	N	N	N	N	M
S13-I	N	N	L	N	N	N	N
S13-II	H	L	H	L	N	N	M
S14-I	H	N	H	L	M	M	L
S14-II	H	L	H	N	M	N	L

<i>suero</i> <i>conjugado</i>	OVA S9	OVA S10	OVA S11	OVA S12	OVA S13	OVA S14
S2-I	M	M	H	H	H	H
S2-II	L	N	H	H	M	H
S3-I	L	M	H	N	M	H
S3-II	L	N	H	N	L	M
S4-I	N	M	H	N	M	H
S4-II	M	M	H	N	H	H
S5-I	N	L	H	M	L	M
S5-II	L	L	H	L	M	M
S6-I	N	N	N	N	N	N
S6-II	N	N	L	N	N	N
S7-I	N	N	N	N	N	N
S7-II	N	N	N	N	N	N
S8-I	N	N	N	N	N	N
S8-II	N	N	N	N	N	L
S9-I	L	N	N	N	N	N
S9-II	L	N	N	N	N	N
S10-I	N	H	M	N	L	M
S10-II	N	H	L	N	N	L
S11-I	N	L	M	H	M	M
S11-II	L	M	M	M	M	M
S12-I	N	L	L	H	L	N
S12-II	N	N	M	H	N	N
S13-I	N	L	L	N	M	N
S13-II	M	H	H	H	H	M
S14-I	M	L	H	L	M	H
S14-II	M	L	H	M	L	H

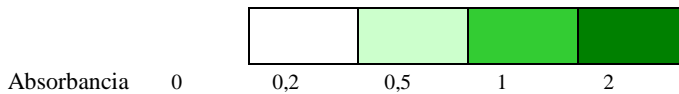


Dilución del suero 1:1000

Concentración de conjugado de tapizado 1 mg L⁻¹

Anexo 2. Resultados de los ensayos de titulación de tetraciclinas en placa ELISA.

suero conjugado	OVA CTC-1	OVA OTC-1	OVA TC-1	OVA CTC-2	OVA OTC-2	OVA CTC-3	OVA OTC-3	OVA TC-3	OVA TC-4
CTC-1 I	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CTC-1 II	N	N	L	N	N	N	N	N	N
OTC-1 I	M	L	L	N	N	N	N	N	N
OTC-1 II	L	L	L	N	N	N	N	N	N
TC-1 I	N	N	N	N	N	N	N	N	N
TC-1 II	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CTC-2 I	N	L	N	N	N	N	N	N	N
CTC-2 II	N	L	N	N	N	N	N	N	N
OTC-2 I	N	N	N	N	N	N	N	N	N
OTC-2 II	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CTC-3 I	N	N	N	N	N	N	N	N	N
CTC-3 II	N	N	N	N	N	N	N	N	N
OTC-3 III	N	N	M	L	L	N	M	M	N
OTC-3 IV	N	L	M	L	M	N	M	M	N
TC-3 I	N	N	M	L	N	N	N	M	N
TC-3 II	N	N	N	N	N	N	N	N	N
TC-4 I	N	N	N	N	N	N	N	N	N
TC-4 II	N	N	N	N	N	N	N	N	N



Dilución del suero 1:1000

Concentración de conjugado de tapizado 1 mg L⁻¹