

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Jaume Reverté Navarro

Grado en BIOTECNOLOGÍA

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

Dirigido por:

Magdalena Constantí (*Tutora académica - URV*)

Mònica Campàs (*Tutora profesional - IRTA*)



Universidad Rovira y Virgili

Tarragona

Junio del 2019

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

ÍNDICE

ESPECIFICACIONES DEL CENTRO DE ACOGIDA	1
ABSTRACT EN.....	2
RESUMEN ES.....	3
1 – INTRODUCCIÓN.....	4
2 – HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	7
3 – MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1- <i>Reactivos y Soluciones</i>	8
3.2- <i>Equipamiento</i>	9
3.3- <i>Tratamiento de las muestras de marisco</i>	9
3.4- <i>Protocolo para la extracción de la TTX</i>	9
3.5- <i>Protocolo para el ensayo mELISA</i>	10
3.6- <i>Calibrado de TTX en el mELISA</i>	12
3.7- <i>Análisis de datos y estadística</i>	12
4 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1- <i>Calibrado de tetrodotoxina en el mELISA</i>	13
4.2- <i>Estudio del efecto matriz de los extractos de marisco</i>	15
4.3- <i>Estudio de recuperación de tetrodotoxina</i>	18
5 – CONCLUSIONES.....	24
6 – BIBLIOGRAFÍA.....	26
7 – AUTOEVALUACIÓN.....	30

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

ESPECIFICACIONES DEL CENTRO DE ACOGIDA

El presente Trabajo de Fin de Grado ha podido ser realizado gracias a la colaboración del centro IRTA de Sant Carles de la Ràpita, con el que se firmó un convenio de prácticas para la realización de un total de 400 horas de prácticas entre el 25/03/19 y el 07/06/19.

La estancia de prácticas se hizo dentro del grupo de biosensores, y toda la línea de investigación que se desarrolló durante las prácticas, y que se muestra en el presente trabajo, se enmarcó dentro del proyecto SeaFood^{TOMORROW}, con el que el grupo colabora.

Todos los procedimientos realizados y resultados obtenidos durante la estada fueron supervisados por la investigadora Mònica Campàs; tutora profesional de la estada de prácticas y responsable del grupo de acogida.

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

ABSTRACT | EN

During the last 10 years, the presence of tetrodotoxin (TTX) in European shellfish has been reported in numerous cases. This situation highlighted an important problem of food safety in all Europe. To date, none of the screening methods for the detection of TTX had been validated for the analysis of shellfish samples. For this reason, the analysis had to be performed with LC-MS/MS technology. The elevated costs and complexities derived from this technique boosted the innovation and the creation of new technologies for detection of TTX in shellfish. From this innovation, the mELISA assay was born. This immunoassay proved to be valid and specific to TTX, however, it also showed a lot of problems with the matrix effects produced by the shellfish extracts. In this study, a new extraction protocol has been evaluated for its application on mELISA assay with the aim of reducing the matrix effects. By the analysis of the extract obtained with the new protocol, we were able to set new working concentrations where the matrix effect disappears. These working concentrations are: 150 mg/mL (razor clam), 25 mg/mL (oyster) and 5 mg/mL (mussel). Working with these concentrations, TTX detection with mELISA was only possible with razor clam and oysters (detection concentrations of 40 µg/kg and 640 µg/kg, respectively). We also appreciated an inefficiency of our extraction method. When working with razor clams, only the 70 % of the total TTX present in the samples was recovered after the extraction process, and with oyster's, the recovery was only 15 %. Although recoveries were not high in all cases, we proved that the new extraction protocol is still valid for the detection of TTX in the case of razor clam and oyster. To apply this extraction method to more types of shellfish, it is necessary to search for new strategies to reduce the matrix effect without needing to dilute the samples.

Keywords: Tetrodotoxin (TTX), extraction method, matrix effect, mELISA (maleimida-based enzyme-linked immunosorbent assay), mussel, oyster and razor clam.

RESUMEN | ES

Durante los últimos 10 años, la presencia de tetrodotoxina (TTX) en mariscos europeos ha sido reportada en numerosos casos. Esta situación ha evidenciado un importante problema de seguridad alimentaria en toda Europa. Hasta la fecha, ninguno de los métodos de cribado para la detección de TTX había sido validado para el análisis de muestras de marisco. Por esa razón, la detección de TTX en mariscos debía realizarse con la tecnología LS-MS/MS. Los elevados costes y la complejidad derivados de esta técnica analítica, impulsó la innovación y la creación de nuevas tecnologías para la detección de TTX en mariscos. De esta innovación, nació el ensayo mELISA. Este inmunoensayo demostró ser válido y específico hacia la TTX, de todas maneras, también evidenció muchos problemas derivados del efecto matriz producido por los extractos de marisco. Por esa razón, en el presente estudio, se evalúa un nuevo protocolo de extracción para su aplicación en el ensayo mELISA con la intención de reducir los efectos de la matriz. Del análisis de los extractos obtenidos con el nuevo protocolo, pudimos establecer unas nuevas concentraciones de trabajo donde el efecto matriz desaparecía. Estas concentraciones de extracto eran: 150 mg/mL (navaja), 25 mg/ml (ostra) y 5 mg/mL (mejillón). Trabajando a esas concentraciones, la detección de TTX con el mELISA solo fue posible en el caso de las ostras y las navajas (concentraciones de detección de 40 µg/kg y 640 µg/kg, respectivamente). Además, también se apreció una ineficiencia en el protocolo de extracción. Cuando se trabajaba con navaja, solo el 70 % de la TTX total presente en las muestras era recuperada después del proceso de extracción y, en el caso de la ostra, esta recuperación era solo del 15 %. Aunque las recuperaciones de TTX no eran altas en todos los casos, se pudo probar que el nuevo protocolo de extracción continuaba siendo válido para la detección de TTX con el mELISA en el caso de la navaja y la ostra. Para poder aplicar este protocolo de extracción a más tipos de muestras de mariscos, es necesario encontrar nuevas estrategias para reducir el efecto matriz sin la necesidad de diluir los extractos de las muestras.

Palabras clave: Tetrodotoxina (TTX), método de extracción, efecto matriz, mELISA (ensayo inmunoenzimático basado en placas de maleimida), mejillón, ostra y navaja.

1 – INTRODUCCIÓN

La tetrodotoxina (TTX) es una toxina de naturaleza no-proteica, soluble en agua y con elevada termoestabilidad que tiene un gran impacto en la industria alimentaria (Saoudi et. al., 2007). Su ingesta puede provocar episodios neuroparalíticos, entumecimiento muscular y, en algunos casos más graves, también puede provocar la muerte por fallos orgánicos (Lorentz et. al., 2016). Esta actividad tóxica está relacionada con el bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje y las modificaciones moleculares que la toxina induce en la estructura del mismo canal (Tikhonov et. al., 2018).

Algunos estudios estiman que la TTX es producida por más de 150 cepas bacterianas diferentes. Entre estas, se encuentran bacterias del género *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Anteromonas* y *Vibrio* (Pratheepas et. al., 2013). Algunas de estas bacterias han sido encontradas de forma libre en sedimentos, y otras, han sido encontradas estableciendo una relación simbiótica, principalmente, con animales acuáticos (Magarlamov et. al., 2017). Se piensa que esta relación podría derivar en una acumulación de la toxina a través de la cadena trófica. Esa sería la razón por la cual animales tan distintos como gasterópodos, crustáceos, anfibios y pescados, entre otros, ya presentan diferentes dosis de TTX en su organismo (Pratheepa et. al., 2013).

El pez globo es el agente causal de la mayor parte de intoxicaciones alimentarias por TTX, y la inmensa mayoría de los casos se focalizan en la zona de Japón (Noguchi et. al., 2008). Esto se debe a que en esa zona asiática, el pez globo es considerado una *delicatesen* y se consume frecuentemente. En Europa, contrariamente, la comercialización y el consumo estos tipos de peces está prohibida a causa del gran riesgo que supone para la salud de los consumidores (*Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament*). Aún y esta prohibición, en los últimos años se han reportado algunos casos de intoxicación por TTX tras el consumo erróneo de peces globos tóxicos pescados en Europa (Chamandi et. al., 2009; Kheifets et. al., 2012).

Durante los últimos años también se han reportado algunas intoxicaciones por TTX tras el consumo de mariscos europeos. La alimentación de los mariscos se basa en el consumo del fitoplancton, que consiguen tras el filtrado del agua del mar. Considerando

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

esta característica, los mariscos presentan una elevada potencialidad a ser contaminados con TTX por su naturaleza bioacumuladora. El primer caso de intoxicación se dio en España, en el año 2007, y el marisco que se consumió (caracol de mar) provenía de Portugal (Rodríguez et al., 2008). Tras este primer caso de intoxicación se empezó a analizar más a fondo los mariscos para detectar la presencia de la TTX y, por esa razón, muchos más casos de presencia de toxina en mariscos fueron reportados en diferentes partes de Europa: Inglaterra (Turner et. al., 2015), Grecia (Vlamiis et. al., 2015) y Holanda (Knutsen et al., 2017).

En humanos, tras el estudio de casos reales, se han estimado dosis letales de 2 mg de TTX/kg. Además, se han descrito graves efectos sobre la salud humana a dosis de entre 0,18 y 0,2 mg de TTX/kg (Noguchi et. al., 2001). Por tanto, teniendo en consideración el efecto que esta toxina induce a dosis tan pequeñas, que unos organismos tan consumidos como los mariscos presenten TTX supone un riesgo sin precedentes de seguridad alimentaria. Por esa razón, la European Food Safety Authority (EFSA), decidió recomendar la concentración de 44 $\mu\text{g(TTX)}/\text{kg}(\text{marisco})$ como la concentración de referencia en términos de no impacto sobre la salud humana. Además, también propuso la tecnología LC-MS/MS como tecnología de referencia para el análisis de TTX en muestras de mariscos (Knutsen et. al., 2017).

La tecnología LC-MS/MS, está basada en los principios químicos de la cromatografía y espectrofotometría de masas para la detección y cuantificación de la TTX. Ha demostrado ser altamente específica para cualquier análogo de tetrodotoxina presente en una determinada muestra, lo que supone una ventaja analítica (Turner et. al., 2017). De todos modos, los elevados costes derivados de esta tecnología y las dificultades de interpretación de resultados, hacen evidente la necesidad de desarrollo de nuevas tecnologías igualmente válidas para el análisis de TTX en mariscos.

En la actualidad existen una gran variedad de métodos para la detección de TTX incluyendo ensayos in-vivo de citotoxicidad (Hamasaki et. al., 1996), ensayos de unión a receptor (Doucette et. al., 2000), inmunoensayos (Thattiyaphong et. al., 2014) y biosensores (Yakes et. al., 2014). De todos modos, hasta la fecha, no muchos de estos

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

métodos han sido validados para el análisis de mariscos y, mucho menos, han sido optimizados para ser aplicados como métodos de cribado o análisis rápido.

Uno de los pocos ensayos que sí han sido validados y optimizados para su aplicación en el análisis de TTX en muestras de marisco, ha sido el ensayo mELISA (Reverté et al., 2018). La base de este ensayo inmunoenzimático sobre placas de maleimida es una inmunocompetición. Durante el ensayo se fija TTX sobre placas de maleimida mediante el autoensamblaje de la cisteamina. Después de esta fijación se añade la muestra y, seguidamente, durante el mismo paso, el mAb Anti-TTX. Este anticuerpo reconoce y se une a la TTX, ya sea en su forma libre o la fijada. El porcentaje de unión del anticuerpo hacia la TTX fijada dependerá de la cantidad de toxina que presente la muestra. Como mayor sea la concentración de TTX en la muestra, mayor será el porcentaje de unión del anticuerpo hacia la TTX libre y viceversa. Este balance de unión de anticuerpo permite determinar si una muestra tiene TTX, y en caso afirmativo, permite la cuantificación. Teniendo en consideración todo lo expuesto, el ensayo mELISA es un ensayo atractivo, sencillo y rápido para el desarrollo de un sistema de detección de TTX en muestras de marisco.

Aun y las ventajas que presenta el mELISA, existe un problema, y este está relacionado con la alteración de la sensibilidad del método a causa del efecto matriz inducido por los propios extractos de mariscos, como ha sido reportado en Reverté et al., 2018. Por tanto, para poder aplicar este ensayo al desarrollo de un test de detección rápida de TTX, es necesaria la eliminación de este efecto matriz.

Uno de los aspectos se pueden cambiar para mejorar la situación de la matriz, es el protocolo de extracción de TTX usado. En Reverté et al., 2018 se propone un protocolo de extracción que incluye un paso de extracción de fase sòlida (SPE) para intentar eliminar el efecto matriz. Sin embargo los resultados no són convincentes en todos los mariscos analizados porque se produce una gran perdida de toxina durante la extracción. Por esa razón, en el presente estudio se evalua una nueva aproximación de extracción más eficiente en términos de recuperación y que resulta prometedora para su aplicación en muestras de mejillón, ostra y navaja.

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

2 – HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Para realizar el estudio de validación del nuevo protocolo de extracción de TTX se parte de las siguientes hipótesis de trabajo:

- Un nuevo protocolo de extracción de TTX más eficiente permite extraer una cantidad de toxina suficiente como para que, después de la dilución del extracto para eliminar el efecto matriz, se pueda seguir detectando la toxina con el mELISA.
- Este protocolo de extracción puede ser aplicado a muestras de mejillón, ostra y navaja para su posterior análisis con el mELISA.

Los objetivos marcados en este estudio son:

- Determinación de los parámetros de sensibilidad del mELISA para confirmar la capacidad del ensayo para detectar la TTX aún y el uso de un lote de anticuerpos distinto al de referencia (Reverté et al., 2018).
- Determinación de las concentraciones de extracto de marisco donde el efecto de la matriz sobre la sensibilidad del ensayo mELISA se anula.
- Determinación de la concentración mínima de TTX que se puede detectar con el ensayo mELISA bajo las condiciones de trabajo de no efecto matriz establecidas.
- Determinación de los porcentajes de recuperación de TTX después de la extracción para estudiar las posibles pérdidas del nuevo protocolo de extracción.

3 – Materiales y Métodos

3.1- Reactivos y Soluciones

Para los ensayos mELISA se utilizan tres soluciones tampón (*buffers*); *Binding Buffer*, *Washing Buffer* y *Buffer* BSA-fosfato. El *Buffer* BSA-fosfato se prepara con Albumina de Suero Bovino al 1% (m/v) en *Binding Buffer*. El *Binding Buffer* se prepara con fosfato potásico monobásico (KH_2PO_4), con fosfato potásico dibásico (K_2HPO_4) y con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a unas concentraciones molares de 0,09 M, 0,02 M y 0,01 M respectivamente. El *Washing Buffer* se prepara también con KH_2PO_4 y con K_2HPO_4 utilizando las mismas concentraciones molares que en el caso del *Binding Buffer*. Además, a parte de estas dos sales, el *Washing Buffer* también lleva TWEEN 10® al 0,05 % (v/v). Todos los reactivos necesarios para la preparación de los tres *buffers* se obtienen de *Sigma-Aldrich* (Tres Cantos, España).

El mELISA se realiza sobre placas Pierce™ de maleimida obtenidas de *Thermo Fisher Scientific* (Madrid, España). A parte de las placas, el ensayo mELISA requiere el uso de: hidrocloreto de cisteamina, formaldehído en solución al 3,4 %, 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) y mAb anti-IgG de Ratón (molécula entera) – HRP producido en conejo, obtenidos de *Sigma-Aldrich* (Tres Cantos, España). También se requiere un estándar de anticuerpo monoclonal (mAb) anti-TTX que se preparó como se describe en Kawatsu, et al.,1997 y que es proporcionado por Katrina Campbell (*Institute for Global Food Security*, Belfast, Reino Unido). Por último, también se requiere un estándar de tetrodotoxina pura que se obtiene de *Tocris Bioscience* (Bristol, Reino Unido) y que se prepara a 1 mg/mL con agua acética al 1% (v/v).

La extracción de TTX se hace con agua acética al 1% (v/v) preparada mediante ácido acético comercial obtenido de *Chem-lab* (Zedelgem, Bélgica).

Todos los estándares de los reactivos y los *buffers* se preparan utilizando agua ultra pura Mili-Q (18 MΩ/cm²) (Milipore Iberica Ltd., Madrid, España).

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

3.2- Equipamiento

Para la extracción de TTX se emplea un agitador vortex multi-tubo (modelo DVX-2500) de *VWR International Eurolab S. L.* (Barcelona, España). También se requiere el uso de un baño de agua (modelo 6000138 600W) de *J. P. Selecta S. A.* (Barcelona, España) y una centrifuga Alegra X-15R de *Beckman Coulter* (Barcelona, España).

En el caso del mELISA se emplea un agitador de placas de *BIO-TEK* (modelo SINERGY HT) de *Izasa S. A.* (Barcelona, España) y un lector de placas modelo KC4 obtenido de *BIO-TEK Instruments, Inc.* con el software *GEN 2.09* (Winoosky, VT, USA).

3.3- Tratamiento de las muestras de marisco

Para este estudio se emplean tres tipos de mariscos distintos: Mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), Ostra (*Crassostera gigas*) y Navaja (*Solen marginatus*), obtenidos del Delta del Ebro (Bahía de los Alfaques, NW Mar Mediterráneo). Más concretamente, se emplean 6 lotes de ejemplares de cada especie.

El procesado de las muestras consiste en el separado de la carne del marisco de su respectiva valva. Las valvas se descartan y el músculo se homogeniza con Ultraturrax. El producto se dispone dentro de tubos de centrifuga de polipropileno de 50 mL para proceder a su almacenaje a -20°C hasta que sean requeridos.

Las muestras de marisco deben ser analizadas por HILIC-MS/MS como se describe en Turner, et al., 2017 para confirmar la no-presencia de TTX. En este estudio únicamente se utilizan muestras libres de TTX.

3.4- Protocolo para la extracción de la TTX

El protocolo de extracción de TTX que se sigue para la obtención de los extractos de cada muestra está basado en el protocolo descrito por *EURLMB*, 2017 para la determinación de TTX por HILIC-MS/MS, con algunas modificaciones. El procedimiento detallado que se sigue, es el que se describe a continuación:

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

En tubos de centrifuga de polipropileno de 15 mL se pesan cuidadosamente $1,0 \pm 0,1$ g de homogenado de marisco (mejillón, ostra y navaja). A cada tubo se añade 1,0 mL de agua acética al 1% (v/v), y se agita con vigorosidad en un vortex por 5 minutos. Seguidamente, los tubos debidamente tapados se ponen en un baño de agua hirviendo (100°C) por 5 minutos. Cuando se retiran los tubos, se dejan enfriar hasta temperatura ambiente antes de volverlos a agitar con vigorosidad en el vortex por otros 5 minutos. Para terminar la extracción se centrifugan los tubos a 4500 *g* y a 20°C durante 10 minutos. El sobrenadante se transfiere a una jeringa de 2 mL conectada a un filtro de PTFE de 0,22 μm y se prosigue a hacer la filtración del extracto. Los extractos filtrados se recogen en viales de vidrio de 2 mL y se guardan, debidamente tapados, a -20°C hasta que sean requeridos para su uso. La concentración de matriz obtenida en el extracto es de 1000 mg equiv./mL (a partir de ahora mg/mL).

3.5- Protocolo para el ensayo mELISA

El protocolo empleado para este ensayo está basado en el descrito por Reverté et al., 2018. Inicialmente, y de forma precedente al primer paso del protocolo, se debe activar la placa de maleimida Pierce™ con un lavado de 200 μL de *Binding Buffer*.

El primer paso del mELISA es el auto-ensamblaje de la cisteamina mediante una incubación de 3 horas de 100 μL de cisteamina 1 mM preparada en *Binding Buffer*. Después de esta primera incubación, se prosigue a realizar la inmovilización directa de la TTX mediante una incubación *overnight* a 4°C de otros 100 μL de una solución de tetrodotoxina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con formaldehído al 3,4 % preparada en el mismo *buffer*. Una vez la TTX está fijada sobre la placa se acaba el primer paso del mELISA y se prosigue a preparar la inmunocompetición.

Para realizar, propiamente, el inmunoensayo competitivo se incuban durante 30 minutos 50 μL de extracto de marisco con 50 μL de una solución de mAb Anti-TTX (1:1600) preparada en *Buffer* BSA-fosfato al 1%. Después de la inmunocompetición se realiza un paso de bloqueo con 200 μL de *Buffer* BSA-fosfato durante 30 minutos. A este paso le prosigue otra incubación de 30 minutos de 100 μL de una solución de anticuerpo Anti-IgG de ratón (molécula entera)- HRP preparada a una proporción 1:1000 en *Buffer*

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

BSA-fosfato. El último paso del ensayo es la lectura de la respuesta colorimétrica a 620 nm, después de la incubación con 100 µL de TMB durante 10 minutos. Los valores de absorbancia obtenidos se transformaran a valores de porcentaje de unión de mAb Anti-TTX mediante el uso de dos controles; el positivo y el negativo (o blanco), siguiendo la ecuación (1):

$$\text{Ecuación (1)} \quad \frac{\text{Abs(muestra)} - \text{Abs (control negativo)}}{\text{Abs (control positivo)} - \text{Abs (control negativo)}} \times 100$$

El control positivo se obtiene del análisis mELISA de pozos donde no se emplean los 50 µL de extracto de marisco durante la inmunocompetición (y que se substituyen por 50 µL de *Buffer* BSA-fosfato libre de toxina). El control negativo, en cambio, se obtiene del análisis mELISA de pozos donde se ha omitido los 50 µL de muestra y los 50 µL de mAb Anti-TTX (volúmenes que se substituyen por 100 µL totales de *Buffer* BSA-fosfato).

Entre cada paso de incubación se realiza un triple lavado con 200 µL de *Washing Buffer*, y durante la incubación se agitan las placas mediante un soporte agitador.

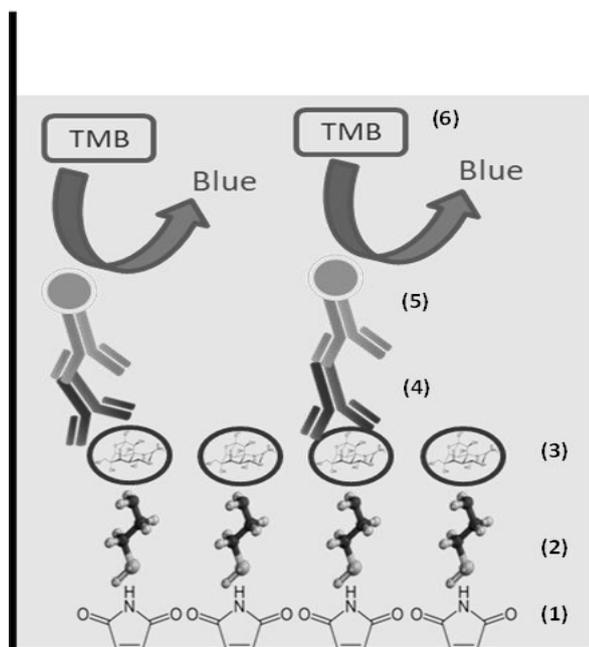


Figura 1 – Distribución esquemática de los elementos del mELISA

En la parte inferior del pozo se observa la TTX fijada (3) mediante el autoensamblaje entre la maleimida (1) y la cisteamina (2). La TTX fijada es reconocida por el anticuerpo primario mAb Anti-TTX (4), y este es reconocido por el anticuerpo secundario mAb Anti-IgG de Ratón (molécula entera) – HRP (5). Después de la adición de TMB (6), la enzima peroxidasa del anticuerpo secundario provoca un cambio de color en el reactivo que vira hacia azul; color que podrá ser leído por colorimetría a 620 nm.

3.6- Calibrado de TTX en el mELISA

Inicialmente, se prepara un estándar puro de TTX a una concentración de 200 ng/mL, utilizando *Buffer* BSA-fosfato. A partir de este primer extracto, se hacen 9 diluciones seriadas utilizando el mismo *buffer* hasta obtener 10 extractos a diferentes concentraciones de TTX. Estos extractos se evalúan por triplicado mediante el mELISA, poniendo 50 µL por pozo del extracto junto a otros 50 µL de una solución de mAb Anti-TTX (1:1000) para establecer la inmunocompetición. Después de la lectura colorimétrica se obtienen valores de absorbancia. Estos valores se transformaran a valores de porcentaje de unión de mAb Anti-TTX utilizando los valores de absorbancia de los controles como se ha descrito previamente.

Una vez obtenidos los valores de porcentaje de unión del mAb Anti-TTX, se representan los mismos, respecto las concentraciones de toxina evaluadas (ng/mL). De esta representación gráfica se obtiene una curva de calibrado que presentará una distribución sigmoidea. El intervalo lineal de esta curva puede ser ajustado a una ecuación logarítmica, y esta ecuación aportará información del Límite de Detección (LOD) del método y el rango de concentración de tetrodotoxina al que se debe trabajar en el ensayo ($IC_{\text{MÍNIMO}}$ – $IC_{\text{MÁXIMO}}$) entre otros parámetros de sensibilidad.

3.7- Análisis de datos y estadística

El ensayo mELISA se hará por triplicado para cada muestra y concentración de TTX evaluada. Todos los tratamientos de datos y estudios estadísticos se realizarán mediante el programa Microsoft Office Excel (2013).

4 – Resultados y Discusión

4.1- Calibrado de tetrodotoxina en el mELISA

Como ha sido reportado previamente por el grupo de acogida (Reverté et al., 2018), el nuevo ensayo mELISA que utiliza cisteamina como agente fijador de TTX, presenta ventajas respecto a otras aproximaciones analíticas reportadas con anterioridad en las que se utilizaba carboxilato-ditiol como agente fijador. La cisteamina es un reactivo fácil de conseguir, aproximadamente 1000 veces más barato que el carboxilato-ditiol y que además permite reducir del tiempo de ensayo. A parte de estas características, el uso de cisteamina ha evidenciado un aumento en la sensibilidad en el método. Este aumento se cree que está asociado a una mejora en la orientación de la TTX fijada en la placa. Desde esta perspectiva, esta nueva aproximación del ensayo mELISA es atractiva para el desarrollo de un test rápido de detección de TTX en muestras de mariscos, y por eso se contempla en este estudio.

Aun así, esta aproximación analítica presenta ciertos problemas relacionados con las interferencias provocadas por la presencia de determinados compuestos en los extractos de marisco (efecto matriz). En el caso de Reverté et al., 2018, se intentó eliminar este efecto matriz utilizando columnas SPE para lavar los extractos. De todos modos, los resultados no fueron satisfactorios en todos los mariscos analizados. Además, se planteó la posibilidad de que la composición de los solventes utilizados durante el protocolo de extracción y el protocolo del SPE (todos de naturaleza ácida) pudieran afectar significativamente a la sensibilidad del análisis, induciendo la aparición de resultados no-consistentes.

El nuevo enfoque de extracción, que se pretende evaluar en el presente trabajo, también requiere del uso de solventes ácidos durante la extracción. Además se utiliza un lote de mAb Anti-TTX distinto al utilizado con anterioridad. Por esta razón, se ha querido re-evaluar los parámetros de sensibilidad del método mediante la construcción de una nueva curva de calibrado; la cual se someterá al efecto del solvente de la extracción y al efecto del nuevo lote de anticuerpos.

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

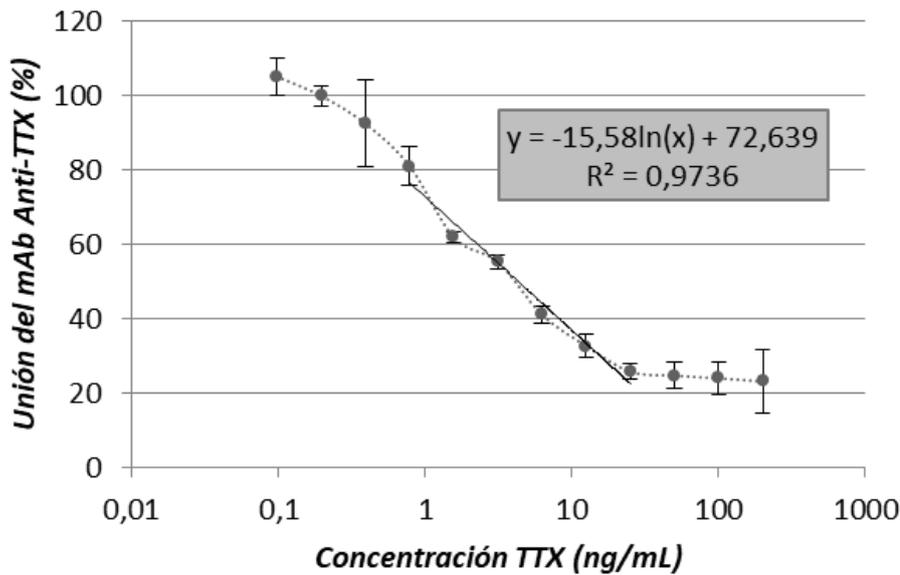


Figura 2 – Curva de calibrado de TTX para el ensayo mELISA

Se muestra la curva de calibrado obtenida del análisis mELISA de estándares de tetrodotoxina pura preparados con Buffer BSA-fosfato. Cada punto de la curva se corresponde con un estándar de tetrodotoxina evaluado, y las barras de error de cada punto describen los valores de desviación estándar para tres réplicas evaluadas. | La ecuación describe la línea de tendencia que delimita el intervalo lineal de la curva mediante un ajuste logarítmico.

La curva obtenida presenta ciertas peculiaridades respecto las curvas de TTX evaluadas por mELISA de Reverté et al., 2015 o Reverté et al., 2018. En estos estudios se reportó que cuando las concentraciones de TTX libre eran muy elevadas, el equilibrio de unión entre el mAb Anti-TTX y la toxina se desplazaban hacia la toxina libre en vez de hacia la fijada. Por esta razón se observaba que, a dichas concentraciones, la curva tendía siempre a cero. Sin embargo, cuando se ha vuelto a construir la curva, el límite inferior no se ha estabilizado al 0 %, sino que se ha estabilizado al 20 % aproximadamente. Este desplazamiento puede ser debido a la presencia de ácido acético en el estándar (como se ha comentado anteriormente). De todos modos, la primera dilución de TTX de la curva se ha preparado a 200 ng/mL, lo que significa, que se ha diluido 5000 veces el stock comercial. Consecuentemente, la concentración de acético presente está igualmente diluida, y es imposible que este desplazamiento tan grande sea debido únicamente al acético. Por esa razón, se piensa que el lote de mAb Anti-TTX utilizado debe de ser mucho más específico hacia la toxina inmovilizada y, por eso, el equilibrio de unión no acaba de desplazarse totalmente hacia la toxina libre.

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

Los valores de desviación estándar de esta nueva curva de calibrado nunca superan el 10%. Considerando esta desviación, se ha establecido un intervalo de confianza del 20%. Bajo las condiciones seleccionadas, se ha calculado un límite de detección (LOD) de 0,62 ng/mL. El LOD se ha establecido como la concentración de TTX que inhibe un 20% la interacción del anticuerpo con la toxina (IC_{20}), es decir, concentración en la que la unión del mAb anti-TTX es del 80%. También se ha calculado un rango de trabajo comprendido entre las concentraciones de toxina de 0,62 y 29,33 ng/mL. Este rango se corresponde a las concentraciones comprendidas entre los límites IC_{20} y IC_{80} , que se corresponden con el intervalo lineal de la curva. Por último, también se ha calculado una concentración inhibitoria media máxima (IC_{50}) de 4,28 ng/mL.

Si se comparan estos resultados con los que se obtuvieron en Reverté et al., 2018, se detecta, claramente, una disminución del LOD de 2 ng/mL a 0,62 ng/mL. Además, el nuevo LOD obtenido, es de los más bajos descritos para inmunoensayos con TTX: 2 ng/mL en Kawatsu et al., 1997, Neagu et al., 2006, Reverté et al., 2015; 5 ng/mL Tao et al., 2010; 10 ng/mL Stokes et al., 2012.

El nuevo LOD evidencia que el ensayo mELISA, realizado con este nuevo lote de mAb anti-TTX, es capaz de detectar concentraciones de TTX superiores a 0,62 ng/mL. Mientras que el ensayo mELISA realizado por Reverté et al., 2018, únicamente podía detectar concentraciones de TTX superiores a 2 ng/mL.

4.2- Estudio del efecto matriz de los extractos de marisco

Cualquier proceso de extracción de un determinado analito conlleva la extracción simultánea de otros componentes moleculares que inducen la aparición del conocido efecto matriz. Por esa razón, durante la validación de un nuevo protocolo de extracción se debe realizar un estudio de los efectos que tiene la matriz sobre el inmunoensayo.

Las matrices de los extractos suelen estar compuestas por azúcares, proteínas complejas y ácidos grasos. Estas grandes biomoléculas inducen la aparición de impedimentos estéricos en la interacción del anticuerpo con su respectivo antígeno. En un inmunoensayo, esto se traduce en una alteración en la respuesta. Por esa razón, es de

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

vital importancia, reducir el efecto de la matriz sobre la interacción del anticuerpo con la toxina.

Con ese objetivo, en el presente estudio se decide hacer diluciones del extracto de marisco, utilizando *buffer* BSA-fosfato, hasta obtener una serie de estándares del extracto a concentraciones de: 200, 150, 100, 75, 50, 25, 10 y 5 mg/mL. Los extractos son libres de TTX, por tanto, cuando sean analizados por mELISA se espera que el porcentaje de unión del mAb anti-TTX sea, aproximadamente, del 100 % (contemplando el margen de error, establecido al 20%). Si la unión de este anticuerpo está inhibida (valores inferiores al 80%), entonces podemos asegurar que la matriz está interfiriendo en la unión del anticuerpo. Este estudio permite identificar qué tipo de extracto es más rico en matriz y también nos permite observar cómo va disminuyendo la cantidad de matriz en función de cómo de disuelto está el extracto. Mediante la interpretación de estas evidencias, mostradas en la Tabla 1, se ha podido establecer las concentraciones de trabajo en las que los extractos no presentan efecto matriz.

En el caso del mejillón, se observa un gran efecto de la matriz. Tal es así que, a una concentración de 200 mg/mL se observan porcentajes de unión del mAb anti-TTX que rodean, en la mayoría de casos, el 50% (cuando en condiciones de no-matriz y no-toxina, deberían ser del 100%). También se observa que a medida que se va disolviendo el extracto, la matriz va reduciendo-se i, por tanto, los porcentajes de unión del mAb anti-TTX van aumentando. A partir de la concentración de 10 mg/mL, se observan porcentajes de no inhibición (superiores al 80%). Por tanto, se establece que 10 mg/mL es la primera concentración de extracto no inhibitoria que se observa, pudiendo ser una concentración de trabajo válida para el análisis del mejillón con mELISA. De todos modos, considerando la variabilidad observada entre los diferentes lotes de mejillón evaluados y la desviación estándar obtenida de este análisis, se decide ser conservador y establecer la concentración de 5 mg/mL como la concentración de trabajo para muestras de mejillón.

El grupo de acogida había estudiado previamente el efecto matriz del mejillón mediante el ensayo mELISA (Reverté et al., 2018). De todos modos, nunca se había establecido una

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

concentración de trabajo porque siempre se observaba inhibición de matriz en las concentraciones de extracto evaluadas (200, 150, 100, 75 y 50 mg/mL). Por esa razón no se puede establecer una comparación de la concentración de trabajo obtenida con el viejo protocolo respecto la obtenida con el nuevo.

Tabla 1 – Estudio del efecto matriz de los extractos de marisco

Se muestran los porcentajes de unión del mAb Anti-TTX y su desviación estándar, obtenidos del análisis mELISA de extractos de mariscos libres de TTX (n=3 réplicas).

Marisco	Código de Muestra	Concentración de matriz (mg/mL)							
		200	150	100	75	50	25	10	5
Mejillón (Mytilus galloprovincialis)	33.19	47 ± 2	49 ± 5	66 ± 5	69 ± 1	69 ± 1	63 ± 3	117 ± 0	93 ± 5
	34.19	41 ± 2	42 ± 1	77 ± 1	74 ± 2	74 ± 5	77 ± 1	108 ± 4	105 ± 3
	37.19	46 ± 1	54 ± 5	77 ± 0	71 ± 3	70 ± 1	77 ± 0	91 ± 2	112 ± 7
	39.19	42 ± 2	54 ± 1	79 ± 8	77 ± 2	76 ± 1	79 ± 8	118 ± 4	102 ± 7
	40.19	62 ± 1	69 ± 1	73 ± 7	74 ± 2	74 ± 0	73 ± 6	113 ± 3	100 ± 8
	53.19	70 ± 5	76 ± 3	78 ± 5	72 ± 4	77 ± 2	71 ± 5	96 ± 2	114 ± 3
Ostra (Crassostrea gigas)	315.16	60 ± 1	68 ± 2	73 ± 5	68 ± 1	103 ± 2	91 ± 5	117 ± 0	-
	347.16	65 ± 2	70 ± 3	77 ± 3	58 ± 1	83 ± 0	93 ± 4	108 ± 4	-
	352.16	60 ± 1	61 ± 23	70 ± 3	74 ± 3	115 ± 3	97 ± 1	91 ± 2	-
	358.16	52 ± 4	64 ± 0	68 ± 4	72 ± 2	83 ± 2	107 ± 5	118 ± 4	-
	360.16	54 ± 4	57 ± 5	60 ± 5	84 ± 7	101 ± 2	106 ± 6	113 ± 3	-
	369.16	64 ± 4	64 ± 2	59 ± 2	85 ± 2	97 ± 2	97 ± 5	96 ± 2	-
Navaja (Solen marginatus)	198.16	108 ± 3	99 ± 2	98 ± 7	109 ± 2	92 ± 5	-	-	-
	234.16	106 ± 3	96 ± 4	96 ± 1	103 ± 5	99 ± 7	-	-	-
	257.16	88 ± 2	88 ± 1	94 ± 3	104 ± 6	88 ± 2	-	-	-
	308.16	89 ± 4	99 ± 8	100 ± 4	102 ± 3	102 ± 1	-	-	-
	318.16	85 ± 3	97 ± 3	99 ± 4	105 ± 2	103 ± 3	-	-	-
	337.16	96 ± 2	97 ± 6	98 ± 6	110 ± 2	94 ± 4	-	-	-

N1. Los valores resaltados cumplen con el intervalo de confianza del 20% establecido y, por tanto, se considera que la unión del mAb Anti-TTX no está inhibida.

N2. El carácter "-" indica valores no testados.

En el caso de la ostra se observan resultados distintos que en el caso del mejillón. El efecto matriz no es tan notorio en esta especie de marisco y, por eso, a concentraciones de 50 mg equiv/mL ya se deja de observar inhibición en la unión del mAb Anti-TTX. Aun así, por las mismas razones anteriormente descritas en el caso del mejillón, se decide ser conservador y establecer 25 mg/mL como concentración de trabajo. Estos resultados son distintos a los descritos en Reverté et al., 2018, en los que se estableció como concentración de trabajo 150 mg/mL. Teniendo en consideración estos resultados, es evidente que nuevo protocolo de extracción obliga a trabajar a concentraciones de extracto más bajas en el caso de las ostras.

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

Por lo referente a la navaja, de la cual no se realizaron estudios previos, se ha observado una menor interferencia de la matriz sobre el método en comparación con los otros dos mariscos analizados. Tal es así, que una concentración de matriz de 200 mg/mL no se observa inhibición en la de la unión del mAb Anti-TTX. Aun así, por las razones previamente expuestas, se prefiere ser conservador y trabajar a concentraciones de matriz de 150 mg/mL.

El nuevo protocolo de extracción continua extrayendo matriz de forma conjunta con la TTX. De todos modos, la nueva extracción es compatible con la disolución de los extractos hasta una concentración de trabajo donde no hay efecto de la matriz sobre la unión del mAb Anti-TTX y la TTX.

4.3- Estudio de recuperación de TTX

Con el mELISA, considerando el valor de LOD obtenido con anterioridad y bajo condiciones de no efecto matriz, se debería de poder detectar hasta 0,62 ng/mL de TTX. Para poder comprobar la veracidad de esa capacidad de detección se plantea el siguiente experimento:

Inicialmente, cómo no se dispone de muestras de marisco contaminadas con TTX, se deben dopar muestras blancas (*spiking*) para la realización de esta parte del estudio. Este dopaje se hace a partir de un estándar de TTX preparado con agua acética al 1% (v/v) a 1 µg/mL. Considerando que únicamente empleamos 1 g de muestra; si, por ejemplo, queremos preparar una muestra a 80 µg/, debemos añadir 80 µL del estándar de TTX al gramo de marisco. Con las otras concentraciones de toxina se debe proseguir de la misma manera.

Después de realizar este dopaje de las muestras, ya se puede proseguir con la obtención de los extractos de marisco siguiendo el nuevo protocolo de extracción anteriormente descrito. Sin embargo, en lugar de añadir 1 mL completo de agua acética al 1% (v/v), únicamente se añadirá la diferencia de volumen entre el volumen empleado en el dopaje y el mililitro total. Después de la extracción, se diluyen los extractos de marisco hasta la concentración de trabajo previamente establecida (Mejillón, 5 mg equiv/mL;

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

Ostra 25 mg equiv./mL; Navaja 150 mg equiv./mL) y, estos extractos diluidos, se evaluarán por mELISA. Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla 2.

Se debe tener en cuenta que con la dilución de los extractos, se produce una dilución proporcional de la concentración de TTX presente en el extracto original. Por esa razón, para conocer la concentración de tetrodotoxina teórica de cada estándar evaluado se debe aplicar el factor de la dilución. Por ejemplo, si se prepara una muestra a 80 µg/Kg y luego, el extracto obtenido, se diluye hasta los 150 mg equiv./mL, la concentración teórica de tetrodotoxina del estándar es de 12 ng/mL.

Tabla 2 – Análisis de mariscos dopados con TTX

Se muestran los porcentajes de unión del mAb Anti-TTX y su desviación estándar, obtenidos del análisis mELISA de extractos de mariscos dopados con TTX (n=3 réplicas).

Marisco	Código de Muestra	[Matriz]	Concentración de TTX teórica (µg/Kg)							
			800	640	320	160	80	40	20	10
Mejillón (Mytilus galloprovincialis)	33.19	5 (mg equiv./mL)	87 ± 4	-	105 ± 3	98 ± 5	-	-	-	-
	34.19		91 ± 7	-	96 ± 4	103 ± 4	-	-	-	-
	37.19		87 ± 3	-	110 ± 5	94 ± 5	-	-	-	-
	39.19		85 ± 1	-	100 ± 5	111 ± 3	-	-	-	-
	40.19		85 ± 6	-	119 ± 1	112 ± 3	-	-	-	-
	53.19		86 ± 7	-	116 ± 3	111 ± 6	-	-	-	-
Ostra (Crassostrea gigas)	315.16	25 (mg equiv./mL)	65 ± 1	70 ± 4	79 ± 2	86 ± 2	-	-	-	-
	347.16		63 ± 1	68 ± 2	79 ± 2	90 ± 4	-	-	-	-
	352.16		67 ± 2	67 ± 5	80 ± 2	92 ± 3	-	-	-	-
	358.16		69 ± 4	69 ± 3	81 ± 1	95 ± 5	-	-	-	-
	360.16		72 ± 7	78 ± 5	86 ± 2	93 ± 3	-	-	-	-
	369.16		62 ± 3	62 ± 2	79 ± 2	86 ± 4	-	-	-	-
Navaja (Solen marginatus)	198.16	150 (mg equiv./mL)	-	-	-	-	66 ± 1	78 ± 3	87 ± 3	105 ± 0
	234.16		-	-	-	-	53 ± 5	78 ± 3	79 ± 7	110 ± 2
	257.16		-	-	-	-	60 ± 3	69 ± 2	91 ± 5	99 ± 3
	308.16		-	-	-	-	57 ± 3	72 ± 3	69 ± 5	97 ± 3
	318.16		-	-	-	-	60 ± 3	71 ± 0	89 ± 6	97 ± 4
	337.16		-	-	-	-	60 ± 2	57 ± 2	82 ± 3	89 ± 3

N1. Los valores resaltados cumplen con el intervalo de confianza del 20% establecido y, por tanto, se considera que la unión del mAb Anti-TTX no está inhibida.

N2. El carácter "-" indica valores no testados.

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

En el caso del mejillón, se decidió dopar las muestras de homogenado con 800, 320 y 160 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, concentraciones teóricas que equivaldrían a 4, 1,6 y 0,8 ng/mL . Estos valores de concentración de TTX son superiores al LOD (0,62 ng/mL), por tanto, debería observarse inhibición en la respuesta del mELISA. Aun así, en todos los casos, se obtuvieron porcentajes de unión del mAb Anti-TTX superiores al 80%. Por tanto, la respuesta del inmunoensayo no estaba inhibida, y esas concentraciones teóricas de TTX no se estaban detectando. En consecuencia de esos resultados, se asume que la validación de la detección de TTX con mELISA en muestras de mejillón no es posible. De todos modos, esto no es indicativo de que la extracción no esté funcionando. Seguramente sí que haya TTX en el extracto, pero como hay que disolver tanto el extracto para suavizar el efecto de la matriz, la concentración final de TTX es inferior al LOD y por eso se imposibilita la detección.

En el caso de la ostra, se decidió evaluar las concentraciones de TTX teóricas de 800, 640, 320 y 160 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, que equivaldrían a 20, 16, 8 y 4 ng/mL . Los extractos de 160 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, en todos los casos, mostraban porcentajes de unión del mAb Anti-TTX superiores al 80%, por tanto, no había inhibición y no se estaba detectando esa concentración teórica de toxina con el mELISA. En el caso de la concentración de TTX teórica de 320 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, ya se empezaba a observar una disminución del porcentaje de unión del mAb Anti-TTX y, en algunos casos, ya se salía del lindar de no inhibición. De todos modos, no es hasta la concentración de 640 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ cuando en todos los casos se observa inhibición y, por tanto, en todos los casos se está detectando la toxina. Considerando estos resultados, se puede validar que, mediante el ensayo mELISA se pueden detectar concentraciones de TTX superiores a 640 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en muestras de ostra.

En el caso de la navaja, se decidió evaluar las concentraciones teóricas de TTX de 80, 40, 20 y 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, que equivaldrían a 12, 6, 3 y 1,5 ng/mL . En este caso se observó que, con el mELISA, se podían detectar concentraciones superiores a 40 ng/mL ; ya que en todas las muestras de navaja evaluadas que presentaban esta concentración teórica de TTX, se observaban porcentajes de unión del mAb Anti-TTX inhibidos.

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

Aunque los resultados obtenidos indicaban que, en el caso de la ostra y la navaja, se podía detectar la TTX, resulta extraño que no todas las concentraciones de TTX muestren inhibición. De hecho, todas las concentraciones de TTX evaluadas eran superiores al LOD de 0,62 ng/mL y además se estaba trabajando a concentraciones de extracto sin efecto matriz, por tanto, en todos los casos debería de haber habido inhibición. Se intuye que estos resultados son consecuencia de una pobre eficiencia en la extracción. Es decir, que la concentración real de TTX presente en los estándares evaluados es inferior a la teórica. Por esa razón se decide calcular la concentración real de TTX presente en cada extracto.

Para determinar la concentración real de TTX presente en el extracto se hace una cuantificación mediante la curva de calibrado. Los resultados de esta cuantificación se muestran en la tabla 3. A partir de los valores de TTX (en ng/mL) obtenidos, se calcula el porcentaje recuperación total de tetrodotoxina (*recovery*) después de todo el proceso de extracción y el ensayo mELISA. La ecuación (2) muestra cómo se debe calcular el porcentaje de recuperación de TTX, y los resultados de este cálculo se muestran en la Figura 3.

$$\text{Ecuación (2)} \quad \frac{\text{Concentración de TTX real en el extracto (ng/mL)}}{\text{Concentración de TTX teórica en el dopaje (ng/mL)}} \times 100$$

Tabla 3 – Cuantificación de la TTX presente en los extractos evaluados

Se muestran las concentraciones de TTX (en ng/mL) y las desviaciones estándar obtenidas después de la cuantificación de extractos de marisco dopados con TTX y evaluados por mELISA (n=3 réplicas).

		Muestra dopada con 16 ng/mL de TTX					
		Código de la muestra					
Ostra (<i>Crassostrea gigas</i>)		315.16	347.16	352.16	358.16	360.16	369.16
		3,2 ± 0,4	1,4 ± 0,2	2,6 ± 0,6	2,8 ± 0,5	2,7 ± 0,1	1,4 ± 0,2
		Muestra dopada con 6 ng/mL de TTX					
		Código de la muestra					
Navaja (<i>Solen marginatus</i>)		198.16	234.16	257.16	308.16	318.16	337.16
		4,5 ± 0,6	4,1 ± 0,9	3,9 ± 0,5	4,4 ± 0,8	3,2 ± 0,4	4,9 ± 0,6

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

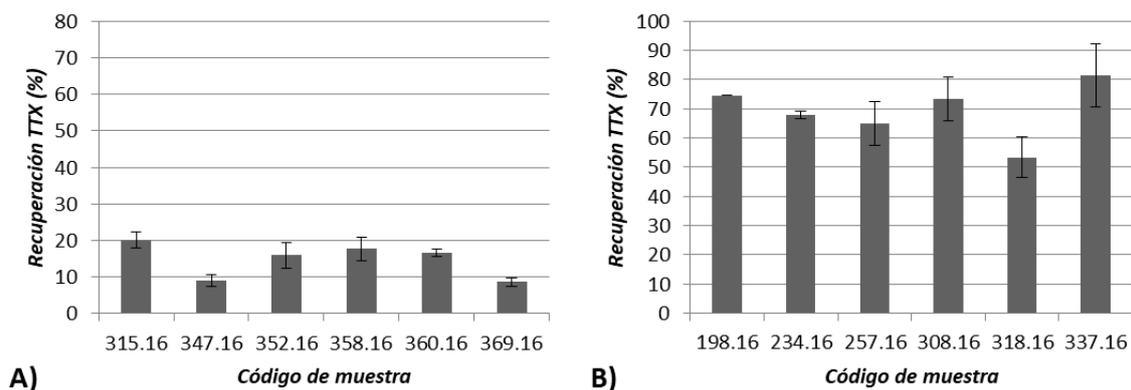


Figura 3 – Porcentajes de recuperación de TTX

Se muestran los porcentajes de recuperación de TTX (%) y la desviación estándar del análisis mELISA de extractos de ostra (A) y de extractos de navaja (B) dopados con diferentes concentraciones de TTX. ($n = 3$ réplicas)

Como se observa en la Tabla 3, tanto en el caso de la ostra como en el de la navaja, hay una variabilidad en lo referente a la concentración de TTX recuperada. Esta variabilidad puede ser debida a pequeñas variaciones en el proceso de extracción (segundos de más de agitación, tiempo de más en el baño de agua, etc.). De todos modos, lo más seguro es que esta variabilidad sea debida a las propias diferencias entre lotes de marisco.

En el caso de la ostra se recuperan 2,35 ng/mL de TTX aproximadamente. Considerando que la concentración de TTX con la que se han dopado estas muestras es de 16 ng/mL, la recuperación de TTX (después del proceso de extracción y análisis) ha sido de, aproximadamente, el 15 %.

En el caso de la navaja, en cambio, la recuperación es mucho más elevada. Aproximadamente, se recuperan un total de 4,16 ng/mL. Considerando que las muestras de han dopado con 6 ng/mL, la recuperación de TTX (después del proceso de extracción y análisis) es de, aproximadamente del 70 %.

En el caso del mejillón, no se ha podido ni cuantificar ni estudiar el porcentaje de recuperación de TTX porque no se observaba inhibición de la unión del mAb Anti-TTX en los valores de TTX testados.

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

Estos porcentajes de recuperación contemplan la totalidad del análisis (extracción + mELISA). Para validar que la pérdida de tetrodotoxina es consecuencia únicamente de la extracción, se plantea un nuevo estudio. En este nuevo estudio el dopaje de la muestra se hace después de la extracción. De esta forma, si la pérdida de tetrodotoxina es provocada únicamente por la extracción, el estudio de recuperación de estas nuevas muestras dopadas debería dar porcentajes del 100%. Los resultados de esta aproximación se muestran en la Figura 4.

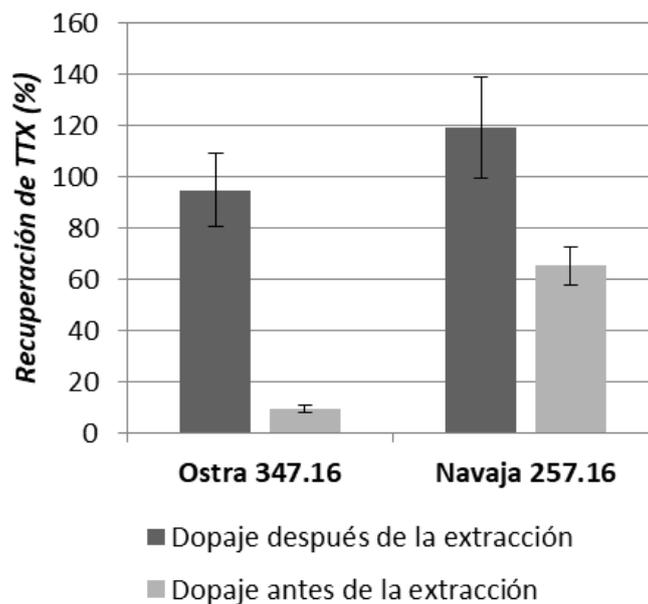


Figura 4 – Diferencias en la recuperación de TTX según el momento del dopaje

Se muestran los porcentajes de recuperación de TTX y su desviación estándar obtenidos del análisis mELISA de muestras dopadas antes y después de la extracción (n = 3 réplicas).

Como se esperaba, los porcentajes de recuperación de TTX en las muestras dopadas después de la extracción son cercanos al 100% (contemplando el intervalo de confianza establecido del 20%). Esto indica que la pérdida de TTX viene dada únicamente por el proceso de extracción.

5 – Conclusiones

Después de la realización de este trabajo se concluye que las hipótesis de partida son válidas en el caso de la ostra y la navaja, y que en el caso del mejillón estas hipótesis no han podido ser validadas.

El ensayo mELISA ha resultado válido para el análisis de TTX ya que se ha podido obtener una curva de calibrado con un LOD de 0,62 ng/mL. El nuevo lote de mAb Anti-TTX ha demostrado tener un impacto en el límite de detección del ensayo. Mismamente, se ha podido relacionar el nuevo lote de mAb Anti-TTX con un desplazamiento del límite inferior de la curva hasta el porcentaje de unión del mAb Anti-TTX del 20%. De todos modos se concluye que todos estos cambios en los parámetros de sensibilidad no han demostrado tener un impacto negativo en la capacidad del ensayo para detectar TTX.

Se concluye que el nuevo protocolo de extracción de TTX de muestras de marisco es compatible con la disolución de los extractos para la eliminación del efecto matriz, pudiendo establecer unas concentraciones de trabajo sin efecto matriz de: 150 mg/mL en el caso de la navaja, 25 mg/mL en el caso de la ostra y 5 mg/mL en el caso del mejillón. De todos modos, en el caso del mejillón, esta concentración de trabajo es contraproducente ya que delimita la capacidad de detección de TTX (que se encuentra demasiado diluida para poder ser detectada con el mELISA).

En el caso de la ostra y el mejillón sí que se ha podido detectar la TTX con el mELISA. En el caso de la ostra la concentración mínima de TTX detectada ha sido de 640 µg/kg, mientras en el caso de la navaja la concentración ha sido de 40 µg/kg. Por tanto se concluye que el nuevo protocolo de extracción está funcionado y los extractos obtenidos tienen TTX. De todos modos, estos resultados evidencian una clara diferencia en la efectividad de extracción de las ostras respecto las navajas. En el caso de la navaja el porcentaje de recuperación después de la extracción es cercano al 70 %, mientras en el caso de la ostra la recuperación es únicamente del 15 %.

Teniendo en consideración todas estas conclusiones expuestas de los distintos experimentos se plantea la siguiente situación: la extracción validada es la más simple

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

que se puede realizar para la obtención de TTX y funciona en el caso de la ostra y la navaja. En el caso del mejillón no ha podido ser validada, pero esto no significa que no funcione. El problema de todo este asunto reside en la necesidad de trabajar a concentraciones de extracto demasiado bajas para poder eliminar el efecto matriz. Si se pudiera trabajar a concentraciones más altas de extracto, la concentración de toxina sería más alta y posiblemente la detección de TTX sería posible en todos los casos analizados. Por esa razón, se propone una nueva aproximación que podría resultar interesante para solucionar este efecto matriz sin necesidad de diluir los extractos.

Se cree que la matriz interfiere tan significativamente sobre la sensibilidad del ensayo porque la TTX unida a la cisteamina se encuentra fija sobre el fondo de los pozos de la placa en vez de estar fijada sobre partículas magnéticas. Si la TTX se fijase sobre partículas magnéticas se reducirían los impedimentos estéricos de la unión anticuerpo-toxina porque, con el movimiento de las partículas, más interacciones favorables entre la TTX y el anticuerpo se producirían, reduciendo el efecto de la matriz. Teniendo en consideración esta hipótesis, la estrategia de las partículas magnéticas podría ser una buena solución y funcionar para el análisis de mariscos, como ya lo hace en el caso del análisis de pez globo (Leonardo, et al., 2019). Por eso se propone esta idea para futuros estudios.

6 – Bibliografía

- Chamandi, S. C., Kallab, K., Mattar, H., & Nader, E. (2009). Human poisoning after ingestion of puffer fish caught from Mediterranean Sea. *Middle East Journal of Anaesthesiology*, 20(2), 285–288.
- Determination of Tetrodotoxin by HILIC-MS/MS EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY FOR MARINE BIOTOXINS.* (2017). Retrieved from: http://www.aecosan.msssi.gob.es/en/CRLMB/docs/docs/metodos_analiticos_de_desarrollo/HILIC-LCMSMS_SOP_for_TTX_in_mussels.pdf
- Doucette, G. J., Powell, C. L., Do, E. U., Byon, C. Y., Cleves, F., & McClain, S. G. (2000). Evaluation of 11-[3H]-tetrodotoxin use in a heterologous receptor binding assay for PSP toxins. *Toxicon*, 38(11), 1465–1474.
- Hamasaki, K., Kogure, K., & Ohwada, K. (1996). A biological method for the quantitative measurement of tetrodotoxin (TTX): Tissue culture bioassay in combination with a water-soluble tetrazolium salt. *Toxicon*, 34(4), 490–495.
- Kawatsu, K., Hamano, Y., Yoda, T., Terano, Y., & Shibata, T. (1997). Rapid and highly sensitive enzyme immunoassay for quantitative determination of tetrodotoxin. *Japanese Journal of Medical Science & Biology*, 50(3), 133–150.
- Kheifets, J., Rozhavsky, B., Girsh Solomonovich, Z., Marianna, R., & Soroksky, A. (2012). Severe Tetrodotoxin Poisoning after Consumption of *Lagocephalus sceleratus* (Pufferfish, Fugu) Fished in Mediterranean Sea, Treated with Cholinesterase Inhibitor. *Case Reports in Critical Care*, 2012, 1–3.
- Knutsen, H. K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüscheiler, B., Ceccatelli, S., ... Petersen, A. (2017). Risks for public health related to the presence of tetrodotoxin (TTX) and TTX analogues in marine bivalves and gastropods. *EFSA Journal*, 15(4).

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

- Leonardo, S., Kiparissis, S., Rambla-Alegre, M., Almarza, S., Roque, A., Andree, K. B., ... Campàs, M. (2019). Detection of tetrodotoxins in juvenile pufferfish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from the North Aegean Sea (Greece) by an electrochemical magnetic bead-based immunosensing tool. *Food Chemistry*,
- Lorentz, M. N., Stokes, A. N., Rößler, D. C., & Lötters, S. (2016). Tetrodotoxin. *Current Biology*, 26(19), R870–R872.
- Magarlamov, T., Melnikova, D., & Chernyshev, A. (2017). Tetrodotoxin-Producing Bacteria: Detection, Distribution and Migration of the Toxin in Aquatic Systems. *Toxins*, 9(5), 166.
- Neagu, D., Micheli, L., & Palleschi, G. (2006). Study of a toxin–alkaline phosphatase conjugate for the development of an immunosensor for tetrodotoxin determination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385(6), 1068–1074.
- Noguchi, T., & Arakawa, O. (2008). Tetrodotoxin--distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication. *Marine Drugs*, 6(2), 220–242.
- Noguchi, T., & Ebesu, J. S. M. (2001). Puffer Poisoning: epidemiology and treatment. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 20(1), 1–10.
- Pratheepa, V., & Vasconcelos, V. (2013a). Microbial diversity associated with tetrodotoxin production in marine organisms. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(3), 1046–1054.
- Pratheepa, V., & Vasconcelos, V. (2013b). Microbial diversity associated with tetrodotoxin production in marine organisms. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(3), 1046–1054.

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the council of 29 April 2004; *laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption*. (2004). Retrieved from:<https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:226:0083:0127:EN:PDF>

Reverté, L., de la Iglesia, P., del Río, V., Campbell, K., Elliott, C. T., Kawatsu, K., ... Campàs, M. (2015). Detection of Tetrodotoxins in Puffer Fish by a Self-Assembled Monolayer-Based Immunoassay and Comparison with Surface Plasmon Resonance, LC-MS/MS, and Mouse Bioassay. *Analytical Chemistry*, *87*(21), 10839–10847.

Reverté, L., Rambla-Alegre, M., Leonardo, S., Bellés, C., Campbell, K., Elliott, C. T., ... Campàs, M. (2018). Development and validation of a maleimide-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of tetrodotoxin in oysters and mussels. *Talanta*, *176*, 659–666.

Rodriguez, P., Alfonso, A., Vale, C., Alfonso, C., Vale, P., Tellez, A., & Botana, L. M. (2008). First toxicity report of tetrodotoxin and 5,6,11-trideoxyTTX in the trumpet shell *Charonia lampas lampas* in Europe. *Analytical Chemistry*, *80*(14), 5622–5629.

Saoudi, M.; Rabeh, F.B.; Jammoussi, K.; Abdelmouleh, A.; Belbahri, L.; Feki, A. E. (2007). Biochemical and physiological responses in Wistar rat after administration of puffer fish (*Lagocephalus lagocephalus*) flesh. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, *5*(2), 107–111.

Stokes, A. N., Williams, B. L., & French, S. S. (2012). An improved competitive inhibition enzymatic immunoassay method for tetrodotoxin quantification. *Biological Procedures Online*, *14*(1), 3.

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Validación de un nuevo protocolo de extracción de tetrodotoxina en muestras de mejillón, ostra y navaja para su aplicación en el ensayo mELISA

- Tao, J., Wei, W. J., Nan, L., Lei, L. H., Hui, H. C., Fen, G. X., ... Rong, J. (2010). Development of competitive indirect ELISA for the detection of tetrodotoxin and a survey of the distribution of tetrodotoxin in the tissues of wild puffer fish in the waters of south-east China. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 27(11), 1589–1597.
- Thattiyaphong, A., Unahalekhaka, J., Mekha, N., Nispa, W., Kluengklangdon, P., & Rojanapantip, L. (2014). Efficiency of a rapid test for detection of tetrodotoxin in puffer fish. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, 35(2), 111–119.
- Tikhonov, D. B., & Zhorov, B. S. (2018). Predicting Structural Details of the Sodium Channel Pore Basing on Animal Toxin Studies. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 880.
- Turner, A. D., Boundy, M. J., & Rapkova, M. D. (2017). Development and Single-Laboratory Validation of a Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for Quantitation of Tetrodotoxin in Mussels and Oysters. *Journal of AOAC International*, 100(5), 1469–1482.
- Turner, A., Powell, A., Schofield, A., Lees, D., & Baker-Austin, C. (2015). Detection of the pufferfish toxin tetrodotoxin in European bivalves, England, 2013 to 2014. *Eurosurveillance*, 20(2), 21009.
- Vlamiš, A., Katikou, P., Rodríguez, I., Rey, V., Alfonso, A., Papazachariou, A., ... Botana, L. M. (2015). First Detection of Tetrodotoxin in Greek Shellfish by UPLC-MS/MS Potentially Linked to the Presence of the Dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Toxins*, 7(5), 1779–1807.
- Yakes, B. J., Kanyuck, K. M., & DeGrasse, S. L. (2014). First Report of a Direct Surface Plasmon Resonance Immunosensor for a Small Molecule Seafood Toxin. *Analytical Chemistry*, 86(18), 9251–9255.

7 – Autoevaluación

De esta estada de prácticas únicamente me puedo llevar cosas positivas, que me han enriquecido como biotecnólogo y que me han dado una visión muy amplia de lo que es la biotecnología.

Siempre había pensado que la biotecnología biomédica era la parte de la biotecnología que más me identificaba. De todos modos, después de realizar las prácticas en una empresa involucrada en el sector agroalimentario mi perspectiva ha cambiado. Durante la carrera, en mi humilde opinión, la parte agroalimentaria no ha sido tratada con la amplitud que debería. Por eso, antes de empezar las prácticas yo pensaba que la rama agroalimentaria únicamente se focalizaba en el mundo de los fermentos y la producción de alimentos. De todos modos, ahora he podido comprobar que esto no es así, y que la rama agroalimentaria envuelve otros sectores como el desarrollo de nuevas tecnologías analíticas para detectar contaminantes alimentarios; descubriendo un nuevo enfoque científico que me apasiona y me da mucha curiosidad.

Durante las prácticas he podido estar en contacto con muchos profesionales del sector y con otros estudiantes en mi misma situación. También he tenido contacto con estudiantes de doctorado que me han animado a continuar mi formación, recomendándome que empiece cuando antes a encaminar mis estudios a aquello que verdaderamente me apasiona y a lo que me quiero dedicar en un futuro.

He estado tan satisfecho de las prácticas y me he sentido tan atraído por esta temática que durante los meses de Julio y Agosto continuaré mi estada de prácticas en el IRTA con el establecimiento de otro convenio de prácticas extracurriculares. Durante esta segunda estada continuaré la línea de investigación plasmada en el trabajo y empezaré a trabajar con las partículas magnéticas para evaluar el impacto de estas sobre el efecto matriz (tal y como se ha propuesto en las conclusiones del TFG).

No puedo sentirme más agradecido por la oportunidad que he tenido. Por esa razón, me gustaría dar las gracias a Mònica Campàs, coordinadora del grupo de biosensores por su colaboración y apoyo; sin ella esto no hubiese sido posible.