

OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES PARA DETECTAR EL CONTAMINANTE EMERGENTE AMOXICILINA EN AGUA RESIDUAL.

Norma Angélica Chávez-Vela, Iliana Ernestina Medina-Ramírez, Juan Jáuregui-Rincón, Mario A. Arzate-Cárdenas, Javier Araiza-Arvilla, E. Verónica Moreno-Córdova, A. Lizbeth Montañez-Flores, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Dpto. de ingeniería Bioquímica, Aguascalientes CP. 20131, nachavez@correo.uaa.mx

Palabras clave: Dot Blot, amoxicilina, contaminante emergente.

Introducción.

Hoy en día, los contaminantes emergentes como los antibióticos son ignorados además de no ser monitoreados. La principal fuente de este tipo de contaminantes, son las aguas residuales de origen hospitalario. Debido a la nula o escasa eliminación de estos contaminantes en plantas tratadoras de agua residual, existe un peligro latente en la generación de cepas bacterianas resistentes a antibióticos (1). Actualmente existen diversos métodos para la detección de antibióticos, tales como microbiológicos, cromatográficos e inmunoquímicos, sin embargo, éstos últimos son métodos sensibles, sencillos y rentables. Debido a lo anterior, el objetivo de este trabajo de investigación fue el de obtener y purificar anticuerpos policlones contra la amoxicilina (AMXC), mismos que pueden ser empleados posteriormente para desarrollar técnicas inmunoquímicas como el sistema ELISA para detectar este contaminante.

Metodología.

Se inmunizaron conejos de la cepa Nueva Zelanda, inoculando amoxicilina (1 mg/ml) acoplada a la proteína hemocianina de lapa californiana (KLH) durante cuatro ocasiones con intervalo de un mes cada uno. A partir del antisero obtenido de la inmunización de conejos con amoxicilina se procedió a la purificación de los anticuerpos policlones.

La producción de anticuerpos anti-amoxicilina se verificó mediante dot blots de muestras de suero obtenidas de los conejos inmunizados. La purificación de anticuerpos policlones anti-amoxicilina se hizo mediante tres etapas:

Primera etapa. Purificación parcial, se realizó un precipitación con una solución saturada al 50% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4.1 M) a 4°C durante toda la noche (6), seguida de una precipitación utilizando ácido caprílico (7), una vez recuperado el sobrenadante, se ultrafiltró en un equipo Amicon 8050, utilizando una membrana de celulosa regenerada de 10 kDa de corte.

Segunda etapa. Purificación total, esta etapa se realizó mediante cromatografía de inmovilización utilizando una columna comercial Hi-Trap NHS-Activada HP (GE Healthcare), a la cual se acoplaron 20 mM de amoxicilina, según indicaciones del proveedor. La pureza de los anticuerpos se verificó mediante electroforesis e Immunoblot, mientras que reactividad y especificidad de los mismos se comprobó por pruebas de Dot Blot. (2).

Resultados.

Se obtuvieron anticuerpos capaces de reaccionar contra la amoxicilina (anticuerpos anti-AMXC), lo cual quedó demostrado mediante Dot Blot, utilizando diferentes concentraciones de antígeno (AMXC) y de anticuerpo primario (anticuerpos anti-AMXC) que fue el que se obtuvo (Fig.1).

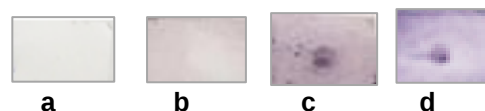


Fig. 1. Las Dot blot para probar reactividad de los anticuerpos policlones anti-amoxicilina. (a) control negativo (agua); (b) suero preinmune; (c) anti suero sin purificar; (d) antisero purificado

Al analizar la reactividad de los anticuerpos frente a antibióticos de diferente familia como es la kanamicina y la estreptomycin, estos no dieron reacción positiva. Ensayos por dot blot, muestras de aguas residuales adulteradas intencionalmente con amoxicilina, mostraron que las condiciones de las muestras de agua (pH, temperatura, contaminantes, etc.) no afecta la reactividad de los anticuerpos anti-AMXC (fig.2).

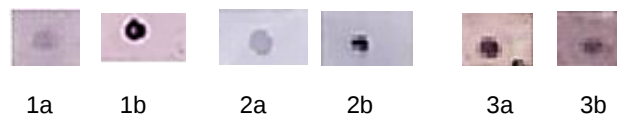


Fig. 2 Las Dot Blot para probar reactividad de anticuerpos policlones anti-amoxicilina en muestras de aguas residuales. Muestras 1) agua residual de hospital; 2 y 3) de agua residual de origen municipal) . Incisos (a) muestras de agua residual sin adicional AMXC, incisos (b) muestras a las que se adicionó AMXC

Conclusiones. En este trabajo se logró purificar anticuerpos policlones anti-amoxicilina, cuya reactividad quedó demostrada mediante dot blot. La detección de amoxicilina fue exitosa en muestras de agua residual, quedando demostrado que las condiciones de estas aguas (pH, T, contaminantes), no afectan la reactividad de los anticuerpos. Esto es importante porque con estos anticuerpos se pueden desarrollar inmunoensayos más precisos como es el sistema ELISA, para detectar AMXC en aguas residuales y así tener un control del tratamiento de estas.

Bibliografía

1. Sauvé, S., Desrosiers, M. (2014). "A review of what is an emerging contaminant" *J Chem Biol*, 8(1), Núm. 8, Vol.1, pp.8-15.
2. Harlow E. y Lane D. 1988. Antibodies a laboratory manual. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. USA. 726