
Evaluación del nivel de contaminación por la micotoxina “Ocratoxina” en muestras de *Capsicum Annuum* “Paprika” usando los metodos ELISA y Cromatografía líquida de alta performancia “HPLC”

EVALUATION OF THE LEVEL OF CONTAMINATION BY THE “OCHRATOXINE” MYCOTOXINE IN SAMPLES OF *CAPSICUM ANNUUM* “PAPRIKA” USING ELISA AND HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY “HPLC”

Jesús Rojas-Jaimes *

RESUMEN

OBJETIVO

Las micotoxinas son un problema de salud pública a nivel mundial, como ejemplo las aflatoxinas y las ocratoxinas son carcinogénicas y tóxicas respectivamente a nivel de partes por billon “ppb”, la comunidad europea ha impuesto límites permisibles para la concentración de ocratoxina presente en alimentos, el objetivo del presente trabajo es evaluar la confiabilidad de una prueba barata y eficaz “ELISA” en la medición de la ocratoxina en *Capsicum annuum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se evaluó el parámetro principal de confiabilidad del ELISA Veratox Neogen y el ELISA kit R-Biopharm utilizando la T de Student y los índices de correlación entre los ELISAS y el método referencial HPLC.

RESULTADOS

El resultado de la T de Student fue $t_{0,05(2)(18)} = 0,86 t_{\text{tabla}} = 2,101$ y los coeficientes de correlación entre los ELISAS y el HPL fueron 0.91 y 0.8 para el kit Veratox Neogen y el kit Biopharm © respectivamente

CONCLUSIÓN

La mejor correlación del ELISA respecto al método referencial HPLC fue usando el kit “Veratox” Neogen con un valor de 0.91.

Palabras claves: Micotoxinas, ocratoxina, ELISA, HPLC (Fuente: DeCS Bireme)

SUMMARY

OBJECTIVE

Mycotoxins are important in public health, especially aflatoxin and ochratoxin because they are very toxic at the level of parts per billion (“ppb”).

The objective of this study is to evaluate an inexpensive and reliable method, “ELISA” to measure the level of ochratoxin and compare it with the referential method “High Performance Liquid Chromatography-HPLC”.

MATERIAL AND METHODS

We evaluated the data showed by the ELISA method using the Veratox and R-Biopharm Kits and HPLC using the Student’s t-test and the coefficient of correlation between ELISAS and HPLC.

RESULTS

The Student’s t-test was $t_{0,05(2)(18)} = 0,86 t_{\text{table}} = 2,101$, the coefficient of correlation between the ELISAS and HPLC were 0.91 and 0.8 using the Veratox Neogen and R-Biopharm kits respectively.

* Biólogo
Ejada Export-Laboratorio de Microbiología y Micotoxinas
Lima - Perú

CONCLUSION

The best coefficient of correlation between the referencial method "HPLC" and an ELISA was 0.91 using the "Veratox" Neogen kit.

Key words: Mycotoxins, ochratoxin, ELISA, HPLC
(Source: DeCS Bireme)

INTRODUCCIÓN

Ocratoxina es una toxina fúngica producida por *Aspergillus* y *Penicillium*, esta micotoxina se encuentra en un amplio número de alimentos (2). Estas toxinas son producidas como respuesta al estrés, contrario a las condiciones de crecimiento, esta micotoxina de carácter apolar se divide en A, B y C. Su carácter químico la hace estable a autoclave, observando un residuo de ésta hasta después de 3 horas de haberla sometido a esterilización; sin embargo, es inestable a la luz.⁷

Ocratoxina A ha sido reportada como hepatotóxica, nefrotóxica, carcinogénica e inmunosupresiva en animales de laboratorio.¹¹

En el área patológica, una aguda necrosis hepática fue observada como un efecto de Ocratoxina A, los derivados de Ocratoxina A como el etil éster "Ocratoxina C" ha reportado ser tóxico el derivado dicloro de Ocratoxina A "Ocratoxina B" no se ha reportado toxicidad. A dosis subletales (<100ppb) de ocratoxina A y B, administradas a pollos, se observó degeneración hepática y necrosis focal.¹ Estudios anteriores investigaron las propiedades químicas físicas y biológicas de las ocratoxinas, dentro de estos se determinó la alta toxicidad de la ocratoxina A, en ratas y embriones de pollos.¹³

La validación de un método, es un proceso que se realiza para evaluar si el método en estudio será confiable cuando se realicen los exámenes (8,9).

La validación está basada en varios parámetros como muestreo, especificidad, aplicabilidad, rangos de concentración, agudeza, precisión y selectividad.^{4,5,6,10}

El desarrollo del método referencial para evaluar ocratoxina "HPLC", es costoso y complejo, en ese sentido se han desarrollado técnicas menos costosas pero confiables para evaluar la ocratoxina como los ELISAs.¹⁴

El objetivo de este trabajo es evaluar los kits de ELISAs en el mercado local frente al método referencial cromatografía líquida de alta performance "HPLC".

MATERIALES Y MÉTODOS

MÉTODO DE MUESTREO

- Se tomó muestras de 100 g a cada saco a un total de 80 sacos que equivalen a 2 toneladas.
- Se procedió a la pulverización de los 8 kilogramos.
- Se mandó una muestra de 300 g al laboratorio y una contra muestra, se almacenó.

ELISA VERATOX NEOGEN

- Se analizó 17 muestras de pprika en bolsa debidamente codificadas.
- Se realizó el análisis de las muestras de pprika usando el kit ELISA competitivo Veratox Neogen sin columnas.
- Se realizó la lectura a 650 nm en un espectrofotómetro.
- Los datos obtenidos fueron pasados al Software RIDAWIN EXE multiplicándolos por el factor de dilución 2, generando resultados en ppb.

ELISA FAST OCHRATOXIN (BIOPHARM) USANDO COLUMNAS DE INMUNOPURIFICACIÓN (RIDA-BIOPHARM)

- Se realizó el análisis de 12 muestras debidamente codificadas, usando el kit Fast Ochratoxin Biopharm con columnas de inmunopurificación.
- Se midió los resultados a 450nm a los 3 minutos de parada la reacción.
- Los datos obtenidos fueron pasados al Software RIDAWIN EXE multiplicándolos por el factor 0.6 recomendado por el vendedor, generando resultados en ppb.

PRUEBAS ESTADÍSTICAS

Se realizó una prueba de "T" de Student y una correlación en EXEL entre los métodos ELISA y HPLC.

DETECCIÓN DE OCRATOXINA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)

Las contramuestras de cada muestra analizada por ELISA, se enviaron a los Laboratorios de GBA (Alemania) y Certified Laboratories Inc (Estados Unidos) para el análisis por HPLC.

Evaluación del nivel de contaminación por la micotoxina "Ocratoxina" en muestras de Capsicum Annuum "Paprika" usando los métodos ELISA y Cromatografía líquida de alta perfomancia "HPLC".

RESULTADOS
ELISA Neogen

TABLA 1. COMPARACIÓN ENTRE EL ELISA Veratox Neogen-HPLC

Código	ELISA Neogen	HPLC
1	7.83ppb	0.64ppb
2	7.73ppb	<0.50ppb
3	12.52ppb	<0.50ppb
4	6.99ppb	0.74ppb
5	7.52ppb	1.3ppb
6	254ppb	105ppb
7	1.72 ppb	0.80ppb
8	18.01 ppb	17 ppb
9	0.867 ppb	<10 ppb
10	1.57 ppb	<10 ppb
11	43.18 ppb	62 ppb
12	0.54ppb	<10ppb
13	1.46ppb	<10ppb
14	0.038ppb	<10ppb
15	0.440ppb	<10ppb
16	N.D(Incapaz de ajuste por ser muy alto el O.D)	<0,50ppb
17	12.28ppb	3.6ppb

TABLA 2. VALORES VALIDOS PARA LA COMPARACIÓN ENTRE LOS SISTEMAS ELISA Y HPLC

Código	ELISA NEOGEN	HPLC
1	7.83ppb	0.64ppb
4	6.99ppb	0.74ppb
5	7.52ppb	1.3ppb
6	254ppb	105ppb
7	1.72ppb	0.80ppb
8	18.01ppb	17ppb
11	43.18ppb	62ppb
17	12.28ppb	3.6ppb

T STUDENT

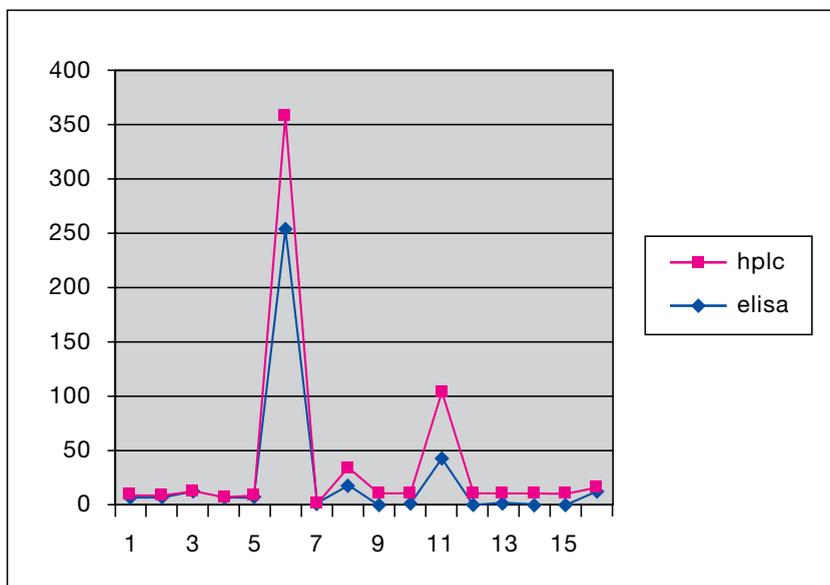
Saco un "T" experimental:

$$t_{0,05(2)(18)} = 0,86$$

$$t_{\text{tabla}} = 2,101$$

Entonces se acepta H_0 y se rechaza H_1 y se concluye que no existen diferencias.

Índice de correlación = 0.91



Índice de correlación = 0.90869664

ELISA Biopharm (C)

TABLA 3. Comparación entre Elisa Biopharm y HPLC

Código	ELISA Biopharm(C)	HPLC
1	2.68ppb	0.64ppb
2	2.41ppb	<0.50ppb
3	0.667ppb	<0.50ppb
4	0.343ppb	0.74ppb
5	6.77ppb	1.3ppb
6	88.73ppb	105ppb
7	3.62ppb	0.80ppb
8	59.56ppb	17ppb
11	75.85ppb	62ppb
17	46.49ppb	3.6ppb
18	1.84ppb	0.60ppb
19	264.08ppb	105ppb

Índice de correlación = 0.8

DISCUSIÓN

- Se observó que los resultados de los kits de ELISAs, en general mostraron una tendencia mayor respecto a los resultados del HPLC, a diferencia del trabajo reportado por Zheng; sin embargo se concuerda que a niveles mayores de ocratoxina los valores entre el HPLC y los ELISAs se alejan.¹⁴
- Es posible que el incremento de la medida de los valores de ocratoxina, medidos por los kits de los ELISAs, en algunos casos, se deba al tiempo en el que se midió y/o al alto grado heterogéneo que se encuentran las ocratoxinas en las muestras, recordando que el almacenaje inadecuado es un factor de riesgo para la producción de las ocratoxinas.¹²
- El uso del kit ELISA Fast Ochratoxin (Biopharm) con columnas de inmunopurificación (Rida-Biopharm) no mostró una ventaja significativa sobre el kit ELISA Veratox Neogen; en el ELISA Biopharm se utilizó columnas de inmunopurificación, además de ser un ELISA competitivo indirecto, esto implica el uso de un ELISA mas caro y complejo frente al ELISA Veratox Neogen que fue un ELISA competitivo directo.
- La prueba estadística de la T de Student para Veratox Neogen dió como resultado que no existían diferencias significativas entre los métodos de análisis para micotoxinas (ELISA-HPLC) donde $t_{0,05(2)}(18) = 0,86$; $t_{\text{tabla}} = 2,101$ aceptando H_0 , en el análisis de correlación entre el ELISA Veratox Neogen y el HPLC se obtuvo el índice de correlación = 0.91, destacando una buena correlación entre métodos analíticos afianzando el resultado que se obtuvo por la T de Student. (Tabla 2).
- Para el análisis de correlación entre el kit Biopharm(C) y el HPLC se obtuvo el índice de correlación = 0.8 (Tabla 3)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Peckhman Jhohn ,Jones Oscar ,Doupnik Jr., Acute Toxicity of Ochratoxins A and B in Chicks'..Applied Microbiology.1971;(21) 492-494.
- 2 Haggblo Per .Production of Ochratoxin A in Barley by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium Effect of Fungal viridicatum*: Growth, Time, Temperature, and Inoculum Size. Applied and Environmental Microbiology .1982; 1205-07.
- 3 Chu F.S,Chang Fred,Hinsdill Ronald.Production of Antibody Against Ochratoxin A.(1976).Applied and Environmental Microbiology.1976;831-35.
- 4 Horwitz William .AOAC International.2003.
- 5 Gillespie J.,Schwarz P.,Mostron M.,Tacke B.,Dong Y.,Hart P.,Munn B.,Update on Uswbsidon Diagnostic Laboratories. National Fusarium Head Blight Forum Proceedings.2003
- 6 Mèlotte L.,Survey on Analysis of Mycotoxins.(2004). EBC Press Report.
- 7 Carrillo L. Micotoxinas. Microbiología Agrícola .2003. (6)1-7
- 8 CIPAC,Guidelines on Method Validation to be performed in Support of Analytical Methods for Agrochemical Formulations. Collaborative International Pesticides Analytical Council. Document No. 3807, Black Bear Press, Cambridge.1999
- 9 FAO/IAEA .Validation of analytical methods for food control.A Report of a Joint FAO/IAEA Expert Consultation.1997
- 10 Mèlotte L..Survey on the Analysis of Mycotoxins . EBC PRESS REPORT.2004
- 11 Xiao H.,Marquardt R.,Abramsom D.,Metabolites of Ochratoxins in Rat Urine and a Culture of *Aspergillus ochraceus* .Applied and Enviromental Microbiology.1996.(62).648-55
- 12 StraumforsHalstensen A.,Nordby K.,Elen O.,Eduard W.,Ochratoxin in a grain dust-Estimated exposure and relations to agricultural practices in grain production. Ann. Agric. Envirom. Med.2004.(11).245-54
- 13 Davis N.,Searcy W.,Dierner U.,Production of Ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in a Semisynthetic Medium. Applied Microbiology.1969.(17).742-44
- 14 Zheng Z.,Hanneken J.,Houchins D.,King R.,Lee P.,Richard J.,Validation of an ELISA test kit for the detection of ochratoxin A in several food commodities by comparison with HPLC.Mycophatologia. 2005. (159).265-72.