

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

Obtención y caracterización de anticuerpos recombinantes (scF y dAb) para la detección de nuez (*Juglans regia*) y pistacho (*Pistacia vera*) en alimentos mediante técnicas inmunoenzimáticas Elisa

Production and characterization of recombinant antibodies (scFv and dAb) for the detection of walnut (*Juglans regia*) and pistachio (*Pistacia vera*) in foods using enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) techniques

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Raquel Madrid García

Directoras

**Teresa García Lacarra
Rosario Martín de Santos
Aina García García**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS
RECOMBINANTES (scFv y dAb) PARA LA DETECCIÓN DE NUEZ
(*Juglans regia*) Y PISTACHO (*Pistacia vera*) EN ALIMENTOS
MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS ELISA**

**PRODUCTION AND CHARACTERISATION OF RECOMBINANT
ANTIBODIES (scFv and dAb) FOR THE DETECTION OF
WALNUT (*Juglans regia*) AND PISTACHIO (*Pistacia vera*) IN
FOODS USING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY
(ELISA) TECHNIQUES**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Raquel Madrid García

DIRECTORAS

Teresa García Lacarra
Rosario Martín de Santos
Aina García García

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos

PROGRAMA DE DOCTORADO EN VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS
RECOMBINANTES (scFv y dAb) PARA LA DETECCIÓN DE NUEZ (*Juglans
regia*) Y PISTACHO (*Pistacia vera*) EN ALIMENTOS MEDIANTE TÉCNICAS
INMUNOENZIMÁTICAS ELISA**

**PRODUCTION AND CHARACTERISATION OF RECOMBINANT
ANTIBODIES (scFv and dAb) FOR THE DETECTION OF WALNUT (*Juglans
regia*) AND PISTACHIO (*Pistacia vera*) IN FOODS USING ENZYME-
LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) TECHNIQUES**

Memoria para optar al título de Doctor con mención honorífica de “Doctorado
Internacional” que presenta la licenciada

Raquel Madrid García

Madrid

A mis padres

"De todas las virtudes que podemos adquirir, ninguna es más útil y esencial que la habilidad de transformar la adversidad en un reto con el que disfrutar".

Mihaly Csikszentmyhaly
(Psicólogo e investigador)

AGRADECIMIENTOS

Después de una larga caminata y unas cuantas zanjas que saltar por el camino, por fin ha llegado el momento de cerrar esta etapa. Y estas primeras páginas van dedicadas a todas las personas que me han acompañado durante este camino.

En primer lugar, quería agradecer a mis directoras de la Tesis Doctoral por acogerme dentro de su grupo de investigación. Teresa, gracias porque siempre has estado motivándome en los buenos y en los malos momentos, resolviéndome dudas, enseñándome a redactar y organizar artículos científicos y esta misma Tesis Doctoral. Admiro tu paciencia detrás de cada una de las correcciones y la delicadeza que muestras en cada detalle. En todos estos años, espero haber aprendido muchas cosas, y la mayoría son gracias a ti. Charo, te agradezco tus conversaciones motivacionales, que siempre estés ahí para dar el visto bueno final, y que me hayas enseñado las buenas formas para con los demás, éstas son muy importantes. Y Aina, ahora como mi directora, siempre serás mi gran compañera de andanzas por el laboratorio y una amiga con la que he podido tener grandes conversaciones, que me ha soportado en mis peores momentos, pero que siempre ha estado ahí, escuchando, apoyando, ayudando y sacándome una sonrisa. Nunca olvidaré los momentos que hemos pasado en nuestras escapadas a congresos. Y tú nunca olvidarás mi desorganización selectiva de objetos en momentos especiales.

A las diferentes entidades públicas que han permitido la financiación de este trabajo mediante los proyectos: AGL2013-48018-R, S2013/ABI-2747, AGL2017-84316-R y P2018/BAA-474, al Ministerio de Economía y Competitividad por la concesión de un contrato predoctoral dentro del Programa de Formación de Personal Investigador (BES-2014-068553) y una ayuda para la realización de una estancia en el extranjero (EEBB-I-17-12714).

Agradecer a Isabel su completa disposición para ayudarme en todo cuanto he necesitado. Contigo tuve el primer contacto en este laboratorio con los MLPA. Tu cercanía me ayudó a abrirme, y mis escapadas a tu despacho siempre me han ayudado a despejarme y desahogarme.

En cuanto a mis predecesoras, Inés, Nicolette y Silvia, gracias por inculcarme la base de mi Tesis, en especial a Silvia, que prácticamente mi Tesis es una continuación de la tuya, y me enseñaste todos los "tips" necesarios para una buena selección. Y a las nuevas incorporaciones al grupo, Edu y Santi, hemos coincidido poco, pero hemos pasado buenos momentos.

Al resto de las personas que prácticamente habitan en este departamento mi más sincero agradecimiento por la cálida acogida recibida. Pablo y Luis, agradeceremos los interminables ánimos a continuar con más fuerza cada vez que os veía por el pasillo y coincidía que algún experimento no había salido. Juan Miguel, mira al final dónde estoy, y tú pensabas que este momento nunca llegaría, irónicamente. Siempre me levantabas una sonrisa a pesar de que tu humor se basaba en mis penurias. Nunca dejes de meterte conmigo. A Ana, Paloma, María y Juan gracias por ser tan atentos. A Santiago, Andrés, Aurora y Alberto por ayudarme cuando lo necesitaba. Y al resto de los profesores, con los que se han compartido historias y momentos inolvidables a la hora de la comida.

A todos los compañeros que estuvieron en este departamento y coincidieron conmigo, Carlos, Sara, Javi, Cristina, Alicia, y a los que continúan compartiendo momentos actualmente, Estefanía, Rebeca, Claudio y Nuria, daros las gracias por haber formado parte de este largo camino que no olvidaré jamás. Y no me olvido de Marina e Irma, el dúo dinámico festivalero, gracias por los consejos y vuestra alegría, hacíais que mis problemas desaparecieran, no habría sido lo mismo sin vosotras. Al resto de los nuevos integrantes de todos los grupos de investigación, agradeceremos los buenos momentos fuera de estos muros.

También quiero dar las gracias a Marcos Alcocer por acogerme en su grupo de investigación en la Universidad de Nottingham, supervisar mi trabajo y hacerme la estancia mucho más agradable, mostrándome la buena comida y los rinconcitos inexplorados de Sutton Bonington. De esa estancia obtuve un regalo, la amistad de Gabriela, juntas hicimos de nuestra estancia un periodo de muchas aventuras, risas y experiencias inolvidables.

A mi familia. Gracias a mis padrinos, mi tía, y mi abuelo que siempre se han preocupado por mi bienestar y felicidad.

A mis padres agradecerles todo lo que me han dado, por su apoyo incondicional, por mi educación y la famosa frase *"estudia lo que te guste que ya trabajarás en lo que puedas, y si es de lo que has estudiado, mucho mejor"* que me ha hecho llegar donde estoy. Ellos siempre me dicen que están orgullosos de mí y eso me da fuerzas para llegar aún más lejos. Sin ellos no sería lo que soy hoy en día. Y a Tarita también, que ella siempre me ha hecho desconectar y mirar todo desde otra perspectiva. Os quiero mucho. HEIYMA.

A mi nueva familia, Mario, Neko y Tsuki, por un futuro lleno de ilusión, diversión y trastadas. En especial agradecer a Mario su incesante transmisión de positivismo para llevar a cabo esta etapa. Has sido un gran apoyo. Y te agradezco enormemente los detalles y las distracciones cuando más lo necesitaba. Sabiendo que nuestra relación comenzó en periodo

Tesis, espero que la nueva "Raquel sin Tesis" te siga gustando y continuemos juntos muchos años más. Junto a él, agradecer la cálida acogida recibida de la nueva familia vallecana, Esther y Emilio, junto sus hijos y numerosos nietos, que, por ellos, tengo cumpleaños casi todos los meses del año.

No puedo terminar sin agradecer a Mercedes su paciencia y serenidad a la hora de escuchar mis problemas. Siempre has estado ahí, desde que comenzamos juntas la carrera, apoyándome, como gran amiga que eres. Y por último, agradecer a mis amigos de Radio Patio, Alex, Vero y Xandra, por las innumerables cenas de parloteo para resetear el cerebro, las inolvidables escapadas rurales para tomar aire fresco y las grandiosas noches de Eurovisión para disfrutar. Que todo esto no se pierda nunca.

PRESENTACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

La presente Tesis Doctoral titulada "Obtención y caracterización de anticuerpos recombinantes (scFv y dAb) para la detección de nuez (*Juglans regia*) y pistacho (*Pistacia vera*) en alimentos mediante técnicas inmunoenzimáticas ELISA" ha sido realizada en el Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid), y se presenta en formato de compendio de artículos científicos.

La detección de alérgenos alimentarios es importante con el fin de verificar el etiquetado de los alimentos y evitar las reacciones adversas para la salud derivadas de la exposición involuntaria de consumidores alérgicos.

Actualmente, aunque las técnicas inmunológicas desarrolladas para el control de alérgenos presentes en los alimentos son muy utilizadas por las industrias y autoridades sanitarias, tienen algunas limitaciones, entre las que se encuentra el hecho de que utilizan anticuerpos policlonales o monoclonales, que requieren la utilización de animales de experimentación. Durante las últimas décadas, el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética ha permitido ofrecer alternativas innovadoras para la obtención de anticuerpos monoclonales que no requieran de la inmunización previa de animales.

En esta Tesis Doctoral se propone el desarrollo y la utilización de anticuerpos recombinantes que no requieren la inmunización de animales de experimentación para la detección de nuez y pistacho en los alimentos, mediante técnicas inmunoenzimáticas de ELISA. Los tres artículos que forman parte de esta Tesis han sido publicados en revistas recogidas dentro del campo *Food Science and Technology* del *Journal Citation Reports* y abordan los siguientes aspectos:

1. Selección y modificación funcional de anticuerpos recombinantes específicos frente a nuez a partir de un repertorio de fragmentos de anticuerpos de tipo scFv. Utilización de los anticuerpos recombinantes obtenidos para la detección de alérgenos de nuez en alimentos mediante técnicas inmunoenzimáticas ELISA.

La primera parte de esta Tesis Doctoral consistió en aislar los primeros fago-anticuerpos recombinantes específicos frente a nuez (*Juglans regia*) recogidos en la bibliografía. Se obtuvieron mediante *phage display* a partir de un repertorio sintético de fago-anticuerpos de tipo scFv (genoteca Tomlinson I). A continuación, se empleó la levadura *Pichia pastoris* como sistema de expresión para la modificación funcional y la producción *in vivo* de un scFv biotinilado específico frente a nuez (JrBSF). El scFv biotinilado y multimerizado en un núcleo de ExtAvidina-peroxidasa (HRP), se utilizó para desarrollar un ensayo inmunoenzimático de

ELISA directo que permite la detección de nuez en matrices alimentarias. Finalmente, se analizaron 100 muestras de alimentos comerciales usando 3 métodos de detección de nuez diferentes: el ELISA directo desarrollado con el scFv multimérico recombinante, un ELISA sándwich basado en anticuerpos policlonales, y una técnica de PCR en tiempo real. El trabajo realizado ha dado lugar a la publicación de 2 artículos en los que la doctoranda aparece como primera autora:

- 1.1. **Raquel Madrid**, Silvia de la Cruz, Aina García-García, Marcos J.C. Alcocer, Isabel González, Teresa García, Rosario Martín (2018). *Multimeric recombinant antibody (scFv) for ELISA detection of allergenic walnut. An alternative to animal antibodies.* Journal of Food Composition and Analysis, 67, 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.01.017>

En este artículo se describe la selección y caracterización de un fago-anticuerpo tipo scFv específico de nuez a partir de la genoteca Tomlinson I, la producción *in vivo* del anticuerpo recombinante biotilado en *Pichia pastoris* y la utilización del scFv multimerizado para la detección de nuez mediante un ELISA directo.

- 1.2. **Raquel Madrid**, Aina García-García, Pablo Cabrera, Isabel González, Rosario Martín, Teresa García (2021). *Survey of commercial food products for detection of walnut (*Juglans regia*) by two ELISA methods and Real Time PCR.* Foods, 10, 440. <https://doi.org/10.3390/foods10020440>

En este trabajo se recoge el estudio comparativo de tres métodos de detección de nuez en alimentos: (1) ELISA directo con el anticuerpo recombinante JrBSF multimerizado, (2) ELISA tipo sándwich con anticuerpos policlonales y (3) PCR en tiempo real. El estudio se completa con el análisis de 100 muestras de alimentos comerciales con diversas menciones sobre el contenido de nuez en su etiquetado.

2. Selección mediante *phage display* de fago-anticuerpos específicos frente a pistacho a partir de una genoteca de fago-anticuerpos de dominio único (dAbs) para la detección de proteínas alergénicas de pistacho en alimentos.

En esta parte de la Tesis Doctoral se trataba de conseguir los primeros anticuerpos recombinantes frente a pistacho (*Pistacia vera*), producidos sin inmunización animal, para ser utilizados en inmunoensayos para la detección del pistacho en productos alimentarios. Con este fin, se evaluaron varias estrategias de *biopanning* para la selección de sondas

específicas frente al pistacho a partir de un repertorio de anticuerpos de dominio único (dAb) de origen humano. Finalmente, se seleccionó el clon PVF4, que produce un fago-anticuerpo dAb que no presenta reacción cruzada con el anacardo pese a su proximidad filogenética y que reconoce una banda única de ~22 kDa relacionada con la subunidad básica de la globulina 11S del pistacho (alérgeno Pis v 2). Además, el método ELISA desarrollado en esta parte de la Tesis Doctoral, que consistía en un ELISA indirecto ligado a fagos, se utilizó para evaluar la aplicabilidad del anticuerpo para el análisis de 77 productos comerciales.

En la última parte de la Tesis Doctoral se presenta la producción de dAbs biotinilados *in vivo* específicos frente a las proteínas de pistacho en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. Debido a la presencia de un codón Ámbar en la secuencia del dAb que truncaba su producción, se llevó a cabo mutagénesis dirigida para modificarlo. Se consiguió la producción del dAb biotinilado pero no el reconocimiento del antígeno.

El trabajo realizado ha dado lugar a la publicación de un artículo en el que la doctoranda aparece como primera autora, aunque los resultados de la última parte todavía no se han publicado:

- 2.1. **Raquel Madrid**, Aina García-García, Isabel González, Rosario Martín, Teresa García (2020). Phage displayed domain Antibodies (dAb) for detection of allergenic pistachio proteins in foods. *Foods*, 9, 1230. <https://doi.org/10.3390/foods9091230>

Este artículo describe la selección de un fago-anticuerpo específico frente a pistacho a partir de una genoteca de dAb, y el desarrollo de un ELISA indirecto ligado a fagos para la detección de pistacho en alimentos.

- 2.2. Producción de un dAb específico frente a proteínas de pistacho, biotinilado *in vivo* en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. (Artículo en preparación).

En esta parte de la Tesis Doctoral se describe el proceso de producción *in vivo* en la levadura *Pichia pastoris* de un anticuerpo recombinante biotinilado tipo dAb para la detección de pistacho en alimentos mediante un ELISA directo.

ÍNDICE

ÍNDICE

Índice de Figuras.....	VII
Índice de Tablas.....	XIII
ABREVIATURAS	XV
RESUMEN	1
SUMMARY	7
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	13
I.1. REACCIONES ADVERSAS A LOS ALIMENTOS	15
I.1.1. Alergia alimentaria	16
I.1.1.1. Alergia alimentaria mediada por IgE	19
I.1.1.2. Prevalencia	21
I.1.1.3. Dosis Umbral	22
I.1.2. Alergia a los frutos de cáscara	24
I.1.3. Marco legislativo: Información alimentaria facilitada al consumidor	27
I.1.3.1. Planes de control de alérgenos.....	29
I.2. MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE ALÉRGENOS.....	31
I.2.1. Técnicas basadas en la detección de proteínas	32
I.2.1.1. Inmunoensayos.....	32
I.2.1.1.1. ELISA	32
I.2.1.1.2. Dispositivos de flujo lateral (DFL)	36
I.2.1.2. Cromatografía y espectrometría de masas	37
I.2.1.3. Biosensores	39
I.2.2. Técnicas basadas en la detección de ADN.....	41
I.2.2.1. PCR y PCR en tiempo real	41
I.2.2.2. MLPA.....	45
I.2.2.3. Biosensores de ADN	46
I.3. PRODUCCIÓN DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS <i>IN VITRO</i>	47
I.3.1. Anticuerpos recombinantes.....	50
I.4. PRESENTACIÓN DE ANTICUERPOS EN FAGOS (<i>PHAGE DISPLAY</i>).....	55
I.4.1. Fago Filamentoso M13	56
I.4.2. Selección por afinidad (<i>Biopanning</i>)	59
I.4.3. Genotecas de scFv y dAb.....	61
I.5. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES.....	63

CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	71
CAPÍTULO III. PLAN DE TRABAJO Y METODOLOGÍA RESUMIDA	77
III.1. PLAN DE TRABAJO.....	79
III.2. METODOLOGÍA RESUMIDA	80
III.2.1. Muestras y preparación de los extractos de proteínas y ADN	80
III.2.2. Selección de scFv y dAb específicos frente a nuez y pistacho mediante presentación en fagos (<i>phage display</i>).....	80
III.2.3. Selección de clones de fago-scFv individuales mediante ELISA monoclonal.....	81
III.2.4. Secuenciación y caracterización de los clones seleccionados.....	82
III.2.5. Producción de scFv biotinilados mediante transformación en <i>Pichia pastoris</i>	82
III.2.6. Producción y caracterización del scFv multimerizado	83
III.2.7. Identificación y caracterización, mediante técnicas cromatográficas, electroforéticas, espectroscópicas e inmunoquímicas, de las proteínas de nuez y pistacho reconocidas por los anticuerpos recombinantes seleccionados	83
III.2.8. Desarrollo de una técnica de ELISA directo para la detección de nuez utilizando un scFv específico frente a nuez multimerizado con ExtrAvidina-HRP	84
III.2.9. Aplicación de diversos formatos de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) utilizando anticuerpos recombinantes para detectar la presencia de alérgenos vegetales en alimentos	85
III.2.10. Comparación del JrBSF-scFv multimerizado en ELISA directo con un kit comercial de ELISA tipo sándwich y una técnica de PCR en tiempo real	85
CAPÍTULO IV. RESULTADOS	87
IV.1. MULTIMERIC RECOMBINANT ANTIBODY (scFv) FOR ELISA DETECTION OF ALLERGENIC WALNUT. AN ALTERNATIVE TO ANIMAL ANTIBODIES	89
IV.2. SURVEY OF COMMERCIAL FOOD PRODUCTS FOR DETECTION OF WALNUT (<i>JUGLANS REGIA</i>) BY TWO ELISA METHODS AND REAL TIME PCR	101
IV.3. PHAGE DISPLAYED DOMAIN ANTIBODIES (DAB) FOR DETECTION OF ALLERGENIC PISTACHIO PROTEINS IN FOODS	119
IV.4. PRODUCCIÓN DE UN DAB ESPECÍFICO FRENTE A PROTEÍNAS DE PISTACHO, BIOTINILADO <i>IN VIVO</i> EN LA LEVADURA METILOTRÓFICA <i>PICHIA PASTORIS</i>	141
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN INTEGRADORA	155
V.1. Obtención de anticuerpos recombinantes específicos frente a nuez (<i>Juglans regia</i>) mediante la técnica de presentación en fagos (<i>phage display</i>) a partir de genotecas de fago-anticuerpos recombinantes tipo scFv.....	157
V.1.1. Enriquecimiento de la genoteca Tomlinson I en clones de fago-scFv específicos de nuez.....	158
V.1.2. Selección de clones de fago-scFv individuales mediante ELISA monoclonal.....	159
V.1.3. Secuenciación y caracterización de los clones seleccionados.....	160

V.1.4.	Producción de scFv biotinilados mediante transformación en <i>Pichia pastoris</i>	161
V.1.5.	Producción y caracterización del scFv multimerizado	164
V.1.6.	Identificación y caracterización, mediante técnicas cromatográficas, electroforéticas, espectroscópicas e inmunoquímicas, de las proteínas de nuez reconocidas por el scFv seleccionado.....	166
V.1.7.	Desarrollo de una técnica de ELISA directo para la detección de nuez utilizando un scFv específico frente a nuez multimerizado con ExtrAvidina-HRP	168
V.1.8.	Aplicación de la técnica de ELISA directo con scFv multimerizado para verificar la presencia de nuez en alimentos comerciales, y comparación con un kit comercial de ELISA y una técnica de PCR en tiempo real	170
V.2.	Obtención de anticuerpos recombinantes específicos frente a pistacho (<i>Pistacia vera</i>) mediante la técnica de <i>phage display</i> a partir de genotecas de fago-anticuerpos recombinantes tipo dAb	177
V.2.1.	Enriquecimiento de la genoteca de dAbs en clones de fago-dAb específicos de pistacho mediante diferentes estrategias de <i>biopanning</i>	177
V.2.2.	Selección de clones de fago-dAb individuales mediante ELISA monoclonal.....	181
V.2.3.	Secuenciación y caracterización de los clones seleccionados	183
V.2.4.	Identificación y caracterización, mediante técnicas cromatográficas, electroforéticas, espectroscópicas e inmunoquímicas, de las dianas moleculares reconocidas por los anticuerpos recombinantes frente a pistacho	184
V.2.5.	Desarrollo de una técnica inmunoenzimática de ELISA indirecto, utilizando un fago-anticuerpo específico para la detección de pistacho en alimentos	186
V.2.6.	Producción de dAb biotinilados <i>in vivo</i> , específicos frente a las proteínas de pistacho en la levadura metilotrófica <i>Pichia pastoris</i>	191
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....		195
CAPÍTULO VII. TRABAJO FUTURO.....		201
CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA		205
Anexo I. OTRAS PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL.....		229

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo I. Introducción

Figura I.1.	<i>Categorías de las reacciones adversas a los alimentos (versión de Sampson et al., 2014).</i>	15
Figura I.2.	<i>Clasificación de alérgenos alimentarios (Adaptación de Smith, 2017).</i>	17
Figura I.3.	<i>Inducción de Inmunoglobulinas E por alérgenos alimentarios y cascada de señalización celular (imagen adaptada de Renz et al., 2018 y Xu et al., 2022).</i>	20
Figura I.4.	<i>Prevalencia de la alergia alimentaria en el mundo (Imagen de Renz et al., 2018).</i>	22
Figura I.5.	<i>Representación de los 14 grupos de ingredientes de declaración obligatoria recogidos en el Reglamento (UE) 1169/2011 (Anexo II) por causar alergias o intolerancias alimentarias.</i>	29
Figura I.6.	<i>Representaciones gráficas de los diferentes tipos de ELISAs.</i>	33
Figura I.7.	<i>Diagrama del dispositivo de flujo lateral (DFL). El dispositivo de flujo lateral consiste en una membrana de nitrocelulosa sobre un material de soporte con un anticuerpo de captura específico del antígeno en una línea de prueba (T) y un anticuerpo anti-conjugado en una línea de control (C). S: muestra.</i>	37
Figura I.8.	<i>Representación esquemática de PCR-ELISA. La PCR-ELISA comienza con la PCR seguida de un ensayo inmunológico y la detección de la producción de color. El gen diana se amplifica en presencia de DIG-dUTP. Empleando la afinidad de la biotina con la avidina, el gen amplificado se inmoviliza en la placa y, finalmente, utilizando el anticuerpo secundario y el sustrato, se visualiza la producción de color.</i>	44
Figura I.9.	<i>Esquema de la técnica de MLPA mediante hemi-sondas empleadas para la detección de secuencias específicas de ADN.</i>	46
Figura I.10.	<i>Estructura básica de una inmunoglobulina (Ig), y de diversos tipos de fragmentos de anticuerpos: un fragmento de unión al antígeno (Fab), un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), fragmento variable estabilizado por enlace disulfuro (dsFv), fragmento variable de cadena pesada (dAbs), scFv unido a fragmento constante (scFv-Fc) y diabody o anticuerpos biespecíficos (bsAB). V_H, región variable de la cadena pesada; V_L, región variable de la cadena ligera; CH1-3, regiones constantes de la cadena pesada; CL, región variable de la cadena pesada. Las cadenas ligera y pesada, y las regiones Fab y Fc se encuentran unidas mediante puentes disulfuro, mientras que las cadenas ligera y pesada de los scFv lo están mediante un conector de serina y glicina.</i>	48
Figura I.12.	<i>Representación esquemática del fago M13 con la localización de las cinco proteínas de superficie (pIII, pVI, pVII, pVIII, pIX).</i>	57

Figura I.13. Representación esquemática del proceso de infección de <i>E. coli</i> por el fago M13 durante la tecnología de phage display. Elaboración propia adaptada de Ledsgaard et al., 2018.....	58
Figura I.14. Representación del proceso de obtención de la genoteca de anticuerpos expresados en fagos (phage display) y de los ciclos de selección por afinidad (biopanning), consistente en un paso de incubación de la genoteca de fago-anticuerpo con la proteína diana, eliminación de los fagos no unidos, elución de los fagos unidos y amplificación de los fagos en <i>E. coli</i> , antes de realizar otro ciclo. Después de 3-5 ciclos se lleva a cabo la etapa de postselección.	60
Figura I.15. Pasos de la purificación de anticuerpos mediante cromatografía de afinidad (figura adaptada de Ayyar et al., 2012). i: preparación de la matriz por activación química generando grupos funcionales reactivos en la superficie (la química puede seleccionarse en función de la elección del ligando a inmovilizar); ii: procedimiento de purificación.	68

Capítulo IV. Resultados*

IV.1. Multimeric recombinant antibody (scFv) for ELISA detection of allergenic walnut. An Alternative to animal antibodies

Figura IV.1.1. pMJA186 vector containing scFv JR35, c-myc epitope and BAP nucleotide sequences constructed in pPICZαB plasmid (Zeor, integrative plasmid carrying the secretion signal sequence from the <i>S. cerevisiae</i> α factor prepro-peptide and functional sites for the integration at the 5' AOX1 locus of <i>P. pastoris</i> X-33).....	97
Figura IV.1.2. Electrophoretic analysis of the polymerase chain reaction (PCR) products obtained from different <i>P. pastoris</i> clones using primers: MJA254/MJA259 (A), and MJA255/ MJA256 (B). Lane 1: non-transformed <i>P. pastoris</i> ; lane 2: pMJA186-G2 clone; lane 3: JrBSF clone. NC=PCR negative control, M=molecular weight marker BioMarker™ Low 50–1000 bp.	97
Figura IV.1.3. Dot-blotting analysis of culture supernatants from the different <i>P. pastoris</i> clones revealed with mouse monoclonal anti-c-myc-antibody (A) or ExtrAvidin-peroxidase (B), induced or non-induced with methanol. NC: negative control, <i>P. pastoris</i> X-33 non-transformed clone; PC: positive control, biotinylated scFv targeting almond protein; pMJA186: <i>P. pastoris</i> clone transformed with pMJA186 plasmid; JrBSF: <i>P. pastoris</i> clone co-transformed with pMJA186 and pMJA180 plasmids; Broth: only culture media.	97
Figura IV.1.4. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in nonreducing conditions of monomeric and multimeric scFv. Lane 1: ExtrAvidin-peroxidase (Mw≈112 kDa); lane 2: scFv (Mw≈30 kDa); lane 3: multimeric scFv (Mw≈220 kDa). Highlighted band was excised and	

* Las Figuras pertenecientes a los artículos científicos van descritas con el número del capítulo, seguido del número del artículo al que corresponde, y del número de orden de la figura.

	<i>analysed by matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF).....</i>	97
Figura IV.1.5.	<i>Amino acid sequence of the JrBSF scFv deduced from the nucleotide sequence by Expaty Web site. Positions of the complementary determining regions for the variable domains of heavy (H-CDR 1–3) and light (L-CDR 1–3) chains are indicated. The amino acid sequences found in matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF) analysis are underlined.....</i>	98
Figura IV.1.6.	<i>Ultracentrifugation analysis of the multimeric-scFv, monomeric scFv and ExtrAvidin-Peroxidase with sedimentation coefficients in PBS at 20 °C. An amplified portion of the figure is shown indicating a peak of ExtrAvidin-peroxidase (A), a first peak of multimeric scFv (B), and second peak of multimeric scFv (C).....</i>	98
Figura IV.1.7.	<i>Standard curves of the multimeric-scFv (■,●) and the phage-scFv (▲) enzymelinked immunosorbent assays (ELISAs) performed with protein extracts obtained from raw (■,▲) and heat treated (●) ground walnut samples in wheat flour binary mixtures. The curves show the average values and the standard deviations corresponding to triplicate experiments performed in six different days.</i>	99
IV.2. Survey of commercial food products for detection of walnut (<i>Juglans regia</i>) by two ELISA methods and real time PCR		
Figura IV.2.1.	<i>ELISA results obtained from experimental walnut/corn flour binary mixtures prepared with raw peeled walnut (RPW, ■), toasted peeled walnut (TPW, ●), raw unpeeled walnut (RUPW, ▲), and toasted unpeeled walnut (TUPW, ▼) using the Alertox® walnut ELISA kit. The protein extracts from binary mixtures were used undiluted (A) or diluted 1:5 (B) or 1:25 (C) in protein extraction buffer, and results were compared with the standard curve obtained with the ready to use standards provided with the kit (STD, ◀). Points represent the mean value ± SD (n = 2; 3 independent experiments).Determination of cross-reactivity with heterologous species using the sandwich ELISA kit for walnut.</i>	109
Figura IV.2.2.	<i>Standard curves obtained from experimental binary mixtures (raw peeled walnut samples in corn flour), analyzed with the Alertox® walnut ELISA kit (■) and the multimeric scFv ELISA (●). Protein extracts were prepared according to directions of each method and diluted 1:25 (ELISA kit) or 1:100 (scFv ELISA) in PBS for comparison. Points represent the mean value ± SD (n = 2; 3 independent experiments).</i>	110
Figura IV.2.3.	<i>SDS-PAGE electrophoresis (A) and JrBSF scFv immunoblots (B, C) of 10 µg walnut extract (W), 10 µg pecan extract (Pe), and 2 µg purified JrBSF (scFv). Mw of the protein marker bands (ColorBurst™ Electrophoresis Protein Marker, Sigma) is indicated. JrBSF scFv in the immunoblots was detected either with Anti-c-Myc monoclonal antibody (9E10) and alkaline phosphatase (AP) conjugated anti-mouse IgG (B) or with horseradish peroxidase (HRP) conjugated Anti-6X His tag® antibody (ab1187) (C).</i>	111

Figura IV.2.4.	<i>Alignment of peptides identified by MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry and the MASCOT Database Search engine in the 11S globulin seed storage protein 2-like (<i>Juglans regia</i>) (Accession Number: XP_018818401.1).</i>	112
IV.3. Phage displayed domain antibodies (dAb) for detection of allergenic pistachio proteins in foods		
Figura IV.3.1.	<i>Phage titers obtained after each round of affinity selection against pistachio extract, following different biopanning strategies (S1–S4).</i>	127
Figura IV.3.2.	<i>Indirect phage-dAb ELISA results obtained with polyclonal phages rescued at each round of selection from strategies S1–S4 against pistachio. Precipitated phages from each round of selection were analysed against pistachio, cashew and peanut extracts and negative controls (betagalactosidase and BSA). Absorbance values are the mean of three independent experiments with duplicates. Error bars show the standard deviation for each set of data.</i>	128
Figura IV.3.3.	<i>Indirect phage-dAb ELISA results obtained with monoclonal phages selected from the second round of biopanning against a set of tree nuts. Absorbance values are the mean of four independent experiments with duplicates. Error bars show the standard deviation for each set of data.</i>	129
Figura IV.3.4.	<i>Amino acid sequences of the pistachio binding dAbs deduced from the nucleotide sequences by SnapGene tool. Positions of the complementarity determining regions of the variable domains (CDR 1–3) and the c-Myc and VSV tags are indicated as determined by IMG/QUEST tool.</i>	130
Figura IV.3.5.	<i>Elution profile of pistachio proteins obtained from preparative FPLC size exclusion column(A) showing absorbance values at 280 nm. (B) Indirect phage-dAb ELISA with some fractions obtained from FPLC (indicated by an orange bar). Absorbance values are the mean of duplicates. Error bars show the standard deviation for each set of data.</i>	131
Figura IV.3.6.	<i>Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in reducing conditions of different fractions obtained in size exclusion chromatography (A) and immunoblot with PVF4 phage-dAb (B) of 10 µg of pistachio extract (T) and 10 µL of each fraction sample. Mw of the protein marker bands (ColorBurst™ Electrophoresis Protein Marker, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) is indicated. Highlighted bands were excised and analysed by matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF). Phage-dAb in the immunoblot was detected with anti-M13 monoclonal mouse antibody conjugated with Horseradish peroxidase (HRP).</i>	131
Figura IV.3.7.	<i>Amino acid sequence of the 11S globulin (<i>Pistacia vera</i>) (accession number: ABU42022). Positions of peptides identified by matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF) from lane 'T' in the Western blot are in red bold font. Positions of the peptides identified from the lane '4' are underlined with green solid lines. Positions of the peptides identified from lanes '6' and '8' are discontinuous underlined.</i>	132

Figura IV.3.8.	<i>The 11S globulins are hexameric proteins with subunits comprising an acidic polypeptide 30–40 kDa in size that is disulphide-linked to a 20 kDa basic polypeptide. (A) SWISS-MODEL of a homo-trimer of pistachio 11S globulin seed storage protein (ABU42022), (B) SWISS-MODEL of the basic subunit homo-trimer recognised by PVF4-dAb, the rectangles show the possible epitope recognition zones.</i>	132
Figura IV.3.9.	<i>Standard curve of the phage-dAb enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) performed with protein extracts obtained from ground defatted pistachio (■) in corn flour binary mixtures. The plot shows the average values and the standard deviations corresponding to duplicate experiments performed in three different days.</i>	133
Figura IV.3.S1.	<i>Secuencias nucleotídicas clones dAb</i>	140
IV.4. Producción de un dAb específico frente a proteínas de pistacho, biotinilado <i>in vivo</i> en la levadura metilotrófica <i>Pichia pastoris</i>		
Figura IV.4.1.	<i>Análisis electroforético de los productos de las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) obtenidos de los clones pRAS002 y pRAS002.BirA de <i>Pichia pastoris</i> usando los primers MJA254/259 que amplifican la secuencia del dAB (A) y MJA255/MJA256 que amplifican la secuencia de la BirA (B). NC=PCR negative control, Mw=molecular weight marker Hyperladder IV.</i>	146
Figura IV.4.2.	<i>Secuencia nucleotídica y aminoacídica del clon dAb PVF4. Recuadro rojo marca la posición del codón Ámbar sin mutar (secuencia naranja) y mutado por cambio de TAG a CAG (secuencia verde).</i>	147
Figura IV.4.3.	<i>Análisis electroforético del producto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) obtenido del clon pRAS002 mutado (PVF4m5) usando los primers MJA254 y MJA253. PC=control positivo de PCR (scFv), NC=control negativo, Mw=molecular weight Biomarker Low Bioventures.</i>	148
Figura IV.4.4.	<i>Análisis electroforético de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) obtenidos de las colonias (de 1 a 10) de <i>Pichia pastoris</i> con el vector pRAS002 mutado (PVF4m5) usando los primers MJA254 y MJA253. PC=control positivo de PCR (dAb), Mw=molecular weight Biomarker Low Bioventures.</i>	148
Figura IV.4.5.	<i>Análisis por dot blot de los sobrenadantes de cultivo de diferentes clones de <i>Pichia pastoris</i> antes y después de la inducción con metanol, revelados con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-c-Myc-AP o con un anticuerpo anti-His-HRP. NC: control negativo, <i>Pichia pastoris</i> X-33 sin transformar; Control positivo: pMJA302 (García-García, 2019) dAb frente a gluten y pMJA181 (de la Cruz et al., 2016) scFv frente a almendra.</i>	149
Figura IV.4.6.	<i>Análisis electroforético en SDS (sodium dodecyl sulphate) 4-20 % bajo condiciones reductoras, de los sobrenadantes de cultivo de diferentes clones de <i>Pichia pastoris</i> inducidos con metanol. Mw: ColorBurst™ Electrophoresis Protein Marker; SN: control negativo, sobrenadante de cultivo de <i>Pichia pastoris</i> X-33 sin transformar; Control positivo: pMJA302 (García-García, 2019) dAb frente a gluten y pMJA186 (Madrid et al., 2018) scFv frente a nuez. Las bandas resaltadas se cortaron y analizaron</i>	

	<i>mediante desorción láser asistida por matriz/espectrometría de masas en tándem de ionización (MALDI-TOF/TOF).....</i>	150
Figura IV.4.7.	<i>Resultados de ELISA indirecto obtenidos con el sobrenadante inducido de los clones transformados con PVF4m5 o pRAS002 en Pichia pastoris. Los valores de absorbancia son la media de duplicados obtenidos en un mismo experimento. Las barras de error muestran la desviación estándar para cada grupo de datos.....</i>	150
Figura IV.4.8.	<i>Análisis electroforético de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) obtenidos de las colonias (de 1 a 10) de Pichia pastoris pRAS002m cotransformado con el vector pMJA180, usando los primers MJA254-MJA253 (A) y MJA256-MJA255 (B). NC=PCR negative control, PVF4m5=clon no transformado con BirA; Mw=molecular weight Biomarker Low Bioventures (A) y 1Kb Ladder (B).</i>	151
Figura IV.4.9.	<i>Análisis dot blot de los sobrenadantes de cultivo de diferentes clones de Pichia pastoris cotransformados con pMJA180 y revelados con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-c-Myc AP (A), con un anticuerpo anti-His-HRP (B) y con ExtrAvidina-HRP (C), mostrándose las diferencias entre los inducidos y sin inducir con metanol. Control positivo: pMJA181 (de la Cruz et al., 2016) scFv frente a almendra.</i>	152
Figura IV.4.10.	<i>Perfil de elución del sobrenadante de PVF4m5.BirA obtenido en el FPLC a partir de columna Ni-NTA, mostrando los valores de absorbancia a 280 nm de las fracciones 1 y 2</i>	153
Figura IV.4.11.	<i>Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS en condiciones reductoras de diferentes fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad Ni-NTA (A) e immunoblot con anti-c-Myc-AP (B) de 20 µg de cada fracción o 10 µL de cada muestra. Mw: ColorBurst™ Electrophoresis Protein Marker; 1, 2 y 3, son las fracciones obtenidas de la cromatografía; BMMY: medio de cultivo; Waste: desecho, muestra que no se ha unido a la columna de afinidad. dAb PVF4m5.BirA en el immunoblot fue detectado por el anticuerpo anti-c-Myc conjugado con AP.</i>	153

Capítulo V. Discusión

V.1.6. Identificación y caracterización, mediante técnicas cromatográficas, electroforéticas, espectroscópicas e inmunoquímicas, de las proteínas de nuez reconocidas por el scFv seleccionado.

Figura V.1.1.	<i>Modelo simulado de una globulina 11S de nuez. A) Homotrímico de 11S de nuez, B) SWISS-MODEL de la subunidad básica reconocida por el scFv JrBSF.....</i>	168
----------------------	---	-----

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo I. Introducción

Tabla I.1.	<i>Proteínas alergénicas de los frutos de cáscara (Fuente: Weinberger y Sicherer, 2018).....</i>	25
Tabla I. 2.	<i>Listado de Kits comerciales en diferentes formatos para la detección de nuez y pistacho (elaboración propia).....</i>	34
Tabla I.3.	<i>Ejemplos de inmunosensores para la detección de alérgenos en alimentos.....</i>	39
Tabla I.4.	<i>Principales aplicaciones de técnicas de PCR para la detección de alérgenos alimentarios.</i>	42
Tabla I.5.	<i>Ejemplos de aplicaciones de biosensores de ADN para el análisis de alimentos.</i>	47

Capítulo IV. Resultados[†]

IV.1. Multimeric recombinant antibody (scFv) for ELISA detection of allergenic walnut. An Alternative to animal antibodies

Tabla IV.1.1.	<i>List of primers employed in this work.....</i>	93
Tabla IV.1.2.	<i>List of heterologous species analysed in the Indirect phage enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....</i>	95
Tabla IV.1.3.	<i>Peptides identified by matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF).</i>	98
Tabla IV.1.4.	<i>Determination of the presence of walnut in various commercial processed food products using walnut multimeric-scFv enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and real-time polymerase chain reaction (PCR).</i>	99

IV.2. Survey of commercial food products for detection of walnut (*Juglans regia*) by two ELISA methods and real time PCR

Tabla IV.2.1.	<i>DNA sequences and description of the pecan (AF303825) and walnut (HE574850) primers and probes to develop a real time PCR.</i>	106
Tabla IV.2.2.	<i>Determination of cross-reactivity with heterologous species using the sandwich ELISA kit for walnut.</i>	108
Tabla IV.2.3.	<i>Peptides identified by MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry and the MASCOT Database Search engine. Protein scores greater than 83 were significant ($p < 0.05$).</i>	112

[†] Las Tablas pertenecientes a los artículos científicos van descritas con el número del capítulo, seguido del número del artículo al que corresponde, y del número de orden de la figura.

Tabla IV.2.4. *Determination of the presence of walnut in commercially processed food products using multimeric scFv ELISA, Alertox® Walnut ELISA kit, and real time PCR.* 113

IV.3. Phage displayed domain antibodies (dAb) for detection of allergenic pistachio proteins in foods

Tabla IV.3.1. *List of heterologous species analysed in the indirect phage enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).* 123

Tabla IV.3.2. *Different biopanning strategies used, and number of specific pistachio-binding clones obtained from each strategy.* 125

Tabla IV.3.3. *Determination of the presence of pistachio in commercial processed food products using PVF4 phage-dAb ELISA and pistachio-specific real-time polymerase chain reaction (PCR).* 134

Tabla IV.3.S1. *Peptides identified by MALDI-TOF/TOF from electrophoretic bands recognised by the PVF4 phage-dAb in the pistachio extract (T) and in the chromatographic fractions 4, 6 and 8.* 139

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AECOSAN	Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
AOX	Alcohol oxidasa (del inglés <i>alcohol oxidase</i>)
AP	Fosfatasa alcalina (del inglés <i>alkaline phosphatase</i>)
APPCC	Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico
ARN	Ácido ribonucleico
BAD	Dominio aceptor de biotina (del inglés <i>biotin acceptor domain</i>)
BDB	Banco de datos de <i>biopanning</i>
BHK	Células de riñón de hámster bebé (del inglés <i>baby hamster kidney</i>)
BirA	Ligasa de biotina (del inglés <i>biotin ligase</i>)
BLAST	Herramienta informática de alineamiento de secuencias de tipo local (del inglés <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
BLI	Interferometría de biocapa (del inglés <i>bio-layer interferometry</i>)
BMGY	Medio complejo tamponado con glicerol y extracto de levadura (del inglés <i>Buffered minimal glycerol-complex yeast extract medium</i>)
BMMY	Medio complejo tamponado con metanol y extracto de levadura (del inglés <i>Buffered minimal methanol-complex yeast extract medium</i>)
BRC	<i>British Retail Consortium</i>
BSA	Albúmina sérica bovina (del inglés <i>bovine serum albumin</i>)
bsAB	Anticuerpos biespecíficos
CAI	Centro de asistencia a la investigación
CDR	Regiones determinantes de la complementariedad (del inglés <i>complementary determining regions</i>)
CEBAS-CSIC	Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura-Consejo Superior de Investigaciones Científicas
CH	Cadena constante pesada (del inglés <i>constant heavy</i>)
CHO	Células derivadas de ovario de hámster chino (<i>Cricetus griseus</i>) (del inglés <i>Chinese hamster ovary</i>)
CL	Cadena constante ligera (del inglés <i>constant light</i>)
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
dAb	Anticuerpo de dominio único (del inglés <i>single domain-antibody</i>)
DBPCFC	Prueba de provocación oral doble ciego controlada por placebo (del inglés <i>double-blind placebo-controlled food challenge</i>)
ddPCR	<i>duplex droplet digital PCR</i>
DFL	Dispositivo de flujo lateral

DNAsas	Desoxirribonucleasa
dNTPs	<i>Deoxynucleotide Triphosphates</i>
DO	Densidad óptica
DPV	Voltimetría de pulso diferencial (del inglés <i>differential pulse voltammetry</i>)
dsFV	Fragmento variable estabilizado por enlace disulfuro
dUTP	Desoxiuridina trifosfato (del inglés <i>deoxyuridine triphosphate</i>)
DVT	Codón degenerado de aminoácidos hidrofílicos ((A/G/T) (A/G/C) T)
EAACI	Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (del inglés <i>European Academy of Allergy and Clinical Immunology</i>)
ECL	Quimioluminiscencia mejorada (del inglés <i>enhanced chemiluminescence</i>)
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (del inglés <i>European Food Safety Authority</i>)
EIS	Espectrometría de impedancia electroquímica
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés <i>enzymed-linked immunosorbent assay</i>)
ELOSA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a oligonucleótidos (del inglés <i>enzymed-linked oligosorbent assay</i>)
EMBOSS	<i>European Molecular Biology Open Software Suite</i>
ESAC	Comité científico asesor de la EURLE CVAM
ESI	Ionización por electroespray (del inglés <i>electrospray ionization</i>)
EU	Unión Europea (del inglés <i>European Union</i>)
EURL ECVAM	Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para alternativas a la experimentación animal.
ExIA	Endoxilanasas A
Fab	Fragmento de unión al antígeno (del inglés <i>fragment-antigen-binding</i>)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FARRP	<i>Food Allergy Research and Resource Program</i>
Fc	Región del fragmento cristalizante (del inglés <i>fragment crystallizable region</i>)
FCεRI	Receptor de alta afinidad de la IgE
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (del inglés <i>Food and Drug Administration</i>)
FDE	Agencia Europea de Alimentos y Bebidas (del inglés <i>FoodDrink Europe</i>)
FIAB	Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas (del inglés <i>fast protein liquid chromatography</i>)
Fv	Fragmento monocatenario de anticuerpos formados por V _H y V _L
GlaA	Promotor de la glucoamilasa
Gln	Glutamina
GRAS	Generalmente reconocido como seguro

HAMA	Anticuerpos humanos anti-ratón (del inglés <i>human anti-mouse antibody</i>)
HCAbs	Anticuerpos solo de cadena pesada (del inglés <i>heavy chain-only antibody</i>)
HCG	Gonadotropina coriónica humana (del inglés <i>human chorionic gonadotropin</i>)
HEK293	Células embrionarias de riñón humano 293 (del inglés <i>human embryonic kidney 293 cells</i>)
His	Histidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (del inglés <i>high-performance liquid chromatography</i>)
HRP	Peroxidasa de rábano (del inglés <i>horseradish peroxidase</i>)
Hly_a	α-hemolisina
Ig	Inmunoglobulina
IgNAR	Inmunoglobulinas con nuevo receptor de antígenos
IL	Interleuquina
IMAC	Cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados
IMGT/V-QUEST	Herramienta de InMunoGeneTics/ funciona con los genes V-J y V-D-J reordenados y la línea germinal V-GENE
INIA	Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria
IRTA	Institut de Recerca I Tecnologia Agroalimentaries
IT	Trampa de iones (del inglés <i>ion trap</i>)
IUIS	Unión Internacional de las Sociedades Inmunológicas (del inglés <i>International Union of Immunological Societies</i>)
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (del inglés <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
LAMP	Amplificación de ADN isotérmica mediada por bucle (del inglés <i>loop-mediated isothermal amplification</i>)
LC-MS	<i>Liquid Chromatography and Mass Spectrometry</i>
LOAEL	Nivel más bajo con efecto adverso observado (del inglés <i>lowest observed adverse effect level</i>)
LOD	Límite de detección (del inglés <i>limit of detection</i>)
LOQ	Límite de cuantificación (del inglés <i>limit of quantification</i>)
LTP	Proteínas transportadoras de lípidos (del inglés <i>lipid transfer proteins</i>)
MAGYP	Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de Argentina
MALDI-TOF/TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz (del inglés <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>) y tiempo de vuelo (del inglés <i>time of flight</i>)
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España
mAu	Mil unidades de Absorbancia
MLPA	Amplificación dependiente de ligasa de múltiples sondas (del inglés <i>multiplex ligation probe amplification</i>)
MPBS	Tampón fosfato salino con leche desnatada (del inglés <i>skimmed milk phosphate-buffered saline</i>)

MRC	<i>Medical Research Council</i>
MS	Espectrometría de masas (del inglés <i>mass spectrometry</i>)
MTD	Dosis máxima tolerada (del inglés <i>maximum tolerated dose</i>)
MYC	Etiqueta del oncogén humano c-myc (EQKLISEEDL)
NGS	Secuenciación de nueva generación
Ni-NTA	Columna de níquel con ligando quelante de ácido nitriloacético
NOAEL	Nivel sin efecto adverso observado (del inglés <i>no observed adverse effect level</i>)
nsLTP	Proteína de transferencia de lípidos no específica
NS0	Células de mieloma de ratón no secretoras
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAL	Etiquetado precautorio de alérgenos (del inglés <i>precautionary allergen labelling</i>)
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés <i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polietilenglicol (del inglés <i>polyethylene glycol</i>)
PTM	Modificaciones postraduccionales (del inglés <i>postranslational modifications</i>)
PVDF	Polifluoruro de vinilideno (del inglés <i>polyvinylidene difluoride</i>)
qPCR	PCR cuantitativa
Real-time PCR	PCR en tiempo real
SAO	Síndrome de alergia oral
scFv	Fragmento variable de cadena sencilla (del inglés <i>single chain variable fragment</i>)
scFv-Fc	ScFv unido a fragmento constante
SD	Desviación estándar (del inglés <i>standard deviation</i>)
SDS-PAGE	Dodecilsulfato sódico (del inglés <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEI	Sociedad Española de Inmunología
SPCE	<i>Screen-printed carbon electrode</i>
SPE	<i>Screen-printed electrodes</i>
SPR	Resonancia de plasmones superficiales (del inglés <i>surface plasmon resonance</i>)
SWV	Voltametría de onda cuadrada (del inglés <i>squarewave voltammetry</i>)
Taq pFU	<i>Taq polymerase Proofreading high-fidelity</i>
TBS	Tampón Tris salino (del inglés <i>Tris buffered saline</i>)
TBST	Tampón Tris salino con Tween
TMB	Tetrametilbenzidina (del inglés <i>tetramethylbenzidine</i>)
TNF-α	Interferón α

TY	Medio de cultivo líquido con triptona y extracto de levadura
TYE	Medio de cultivo con triptona, extracto de levadura y agar
UE	Unión Europea
UPR	Respuesta a proteínas desplegadas (del inglés <i>unfolded protein response</i>)
VH	Cadena variable pesada (del inglés <i>variable heavy chain</i>)
VHH	Cadena variable pesada de anticuerpos de camélidos (del inglés <i>variable heavy chain of a camelid antibody</i>)
VITAL	Etiquetado voluntario de alérgenos traza accidentales (del inglés <i>voluntary incidental trace allergen labelling</i>)
Vk	Cadena variable ligera (kappa) (del inglés <i>variable light chain</i>)
VL	Cadena variable ligera (del inglés <i>variable light chain</i>)
VNAR	Receptor variable de antígeno derivado de tiburón (del inglés <i>shark variable new antigen receptor</i>)
VSV	<i>Vesicular Stomatitis virus epitope</i>
WHO	Organización Mundial de Alergia (del inglés <i>World Allergy Organization</i>)
YPD	Medio de cultivo con dextrosa, peptona y extracto de levadura

RESUMEN

Obtención y caracterización de anticuerpos recombinantes (scFv y dAb) para la detección de nuez (*Juglans regia*) y pistacho (*Pistacia vera*) en alimentos mediante técnicas inmunoenzimáticas ELISA

La alergia alimentaria es un problema de salud pública en auge. La exposición accidental de individuos sensibles a ingredientes alergénicos, incluso en pequeñas cantidades, puede desencadenar reacciones alérgicas severas. Para garantizar un alto nivel de protección de la salud de los consumidores, la Unión Europea obliga a mencionar en el etiquetado de los alimentos los ingredientes que figuran en el Anexo II del Reglamento (UE) 1169/2011, entre los que se encuentran la nuez y el pistacho. Con el fin de cumplir con las normas establecidas, las industrias y agencias encargadas de la seguridad alimentaria han de tener a su disposición métodos analíticos fiables, que permitan la detección en los productos alimenticios de los ingredientes causantes de las reacciones alérgicas, presentes de forma voluntaria o accidental.

Existen multitud de métodos genéticos e inmunológicos para la detección de alérgenos en alimentos, siendo las técnicas de ELISA y PCR las más extendidas. La técnica de PCR permite la detección de una secuencia específica de ADN de la especie diana en el alimento, mientras que la técnica de ELISA consiste en la identificación de una proteína alergénica o un marcador proteico mediante el uso de anticuerpos. Los inmunoensayos son los métodos más utilizados para la detección de alérgenos, debido a su rapidez, sencillez, sensibilidad y capacidad de automatización. Sin embargo, todos los inmunoensayos disponibles se basan en el uso de anticuerpos policlonales o monoclonales desarrollados en animales. La normativa internacional sobre el bienestar animal (Directiva Europea 2010/63/EU) fomenta el desarrollo de alternativas basadas en el principio de las "tres erres": reemplazar, reducir y refinar el uso de animales en los procesos de investigación y experimentación. En este contexto, el desarrollo de anticuerpos recombinantes y técnicas inmunoenzimáticas basadas en ellos, que no dependen de la inmunización animal, es una alternativa novedosa y prometedora para la detección de alérgenos.

La tecnología del *phage display* permite la selección de sondas de afinidad a partir de genotecas (repertorios) de fagos recombinantes que expresan en su superficie fragmentos de anticuerpos (tipo Fab, scFv o dAb). El proceso de selección por afinidad, conocido como *biopanning*, implica la exposición de la genoteca de fagos al antígeno de interés, seguida de la recuperación de los fagos unidos a la molécula diana y su posterior amplificación en

Escherichia coli. Para mejorar la sensibilidad y la avidéz de los anticuerpos seleccionados, la fusión con un dominio aceptor de biotina permite, en presencia de la enzima biotín ligasa, unirse a una molécula de biotina. La adición de una molécula de ExtrAvidina-peroxidasa (HRP) a los anticuerpos biotinilados, induce la formación de anticuerpos multiméricos.

Teniendo en cuenta los aspectos anteriores, en esta Tesis Doctoral se han empleado diferentes metodologías para la detección de nuez y pistacho en alimentos. En primer lugar, se ha abordado la obtención de anticuerpos recombinantes frente a las proteínas de nuez (*Juglans regia*) y pistacho (*Pistacia vera*) mediante la técnica de *phage display* a partir de genotecas comerciales, y su empleo en el desarrollo de técnicas de ELISA para la detección de nuez y pistacho en alimentos. Asimismo, se ha llevado a cabo la identificación y caracterización de las proteínas reconocidas por los fago-anticuerpos, empleando técnicas electroforéticas, cromatográficas y espectrométricas. Además, se ha llevado a cabo una modificación funcional de los anticuerpos recombinantes mediante su biotinilación y multimerización, empleando el organismo eucariota *Pichia pastoris*, para mejorar la sensibilidad y la aplicabilidad de la técnica de ELISA desarrollada. Por último, se ha elaborado un estudio comparativo sobre la sensibilidad y especificidad entre el ELISA directo con los anticuerpos multimerizados, un ELISA tipo sándwich con anticuerpos policlonales y una PCR en tiempo real.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

1) A partir de la genoteca Tomlinson I se seleccionaron, en la segunda y tercera rondas de selección, 11 clones de fago-anticuerpos de tipo scFv que reconocían nuez y no cacahuete. De ellos, el clon denominado JR35 presentó el tamaño de banda esperado tras el análisis por PCR.

2) Se insertó el dominio aceptor de biotina (BAD) en el extremo C-terminal del scFv con el vector de expresión pPICZαB con el que se transformó *Pichia pastoris*. Posteriormente, la levadura se cotransformó con un vector que contenía la secuencia de la enzima biotín ligasa, dando lugar al clon JrBSF. Tras la inducción con metanol de *Pichia pastoris*, la producción del scFv biotinilado JrBSF fue de 6 mL a una concentración de 2 mg/mL.

3) Dado que la avidina es una proteína tetramérica que puede unir hasta 4 moléculas de biotina, se demostró la unión del anticuerpo scFv biotinilado específico de nuez a ExtrAvidina-HRP mediante pruebas de *dot blot*, espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF)

y experimentos de velocidad de sedimentación. Se comprobó que un núcleo de ExtrAvidina-HRP podía incorporar al menos 2 moléculas de scFv biotiniladas.

4) El scFv multimérico específico de nuez se utilizó para el desarrollo de un ELISA directo cuyo límite de detección (LOD) de nuez cruda en mezclas binarias con harina de trigo se estableció en 1616 mg Kg^{-1} , siendo de 2466 mg Kg^{-1} en las mezclas binarias con nuez horneada, y mejorando el LOD del ELISA indirecto empleando el fago-scFv JR35 que fue de 6378 mg Kg^{-1} . Además, este scFv mostró solo un 2,25 % de reacción cruzada frente a la pacana, muy cercana filogenéticamente a la nuez.

5) La aplicabilidad del ELISA directo desarrollado se demostró mediante el análisis de 30 productos comerciales.

6) El scFv JrBSF reconoció una banda de 15 kDa en el extracto de nuez utilizando técnicas electroforéticas e *immunoblots*. Mediante espectrometría de masas MALDI TOF/TOF se identificó esa banda como globulina 11S (alérgeno Jug r 4) de *Juglans regia* con un 31 % de cobertura de la secuencia.

7) En un estudio comparativo en el que se analizaron 100 muestras de alimentos comerciales con el ELISA directo basado en el scFv-JrBSF multimerizado, un kit comercial de ELISA tipo sándwich y una técnica de PCR en tiempo real, la técnica más sensible resultó ser la de PCR en tiempo real, seguida del kit ELISA y del ELISA multimérico. El kit ELISA se vio menos afectado por el procesado de los alimentos, pero mostró más reacción cruzada con la pacana, produciendo falsos positivos. De todas las muestras analizadas, entre un 7-12,6 % de las muestras contenían nuez, pero no la declaraban. Hubo una muestra que declaraba nuez, pero no se detectó por ninguna metodología. Por lo tanto, para una verificación fiable del etiquetado de alimentos que contengan nuez es conveniente emplear una combinación de técnicas genéticas e inmunoenzimáticas.

8) Para la obtención de anticuerpos específicos de pistacho a partir de un repertorio (genoteca) comercial de dAbs se llevaron a cabo varias estrategias de selección hasta obtener candidatos que no mostraron reacción cruzada con el anacardo y el cacahuete. El proceso de *biopanning* incluyó 2 rondas de selección con extractos de proteína sin desengrasar (S1 y S2) o extractos desengrasados (S3 y S4) de pistacho, anacardo y cacahuete. Las estrategias S3 y S4 presentaron un mayor enriquecimiento en fago-dAbs que reconocen al pistacho. De los 8 clones seleccionados y tras el análisis de su secuencia, se observó que todos eran diferentes menos el clon PVF4-dAb procedente de la S4 y el clon PVC12-dAb obtenido de la S3. La presencia de un codón Ámbar en la CDR1 de 6 clones

impedía la expresión del dAb en *Pichia pastoris*, pero en cepas supresoras de *E. coli* este codón de stop se interpreta como glutamina (Gln).

9) La identificación de las proteínas de pistacho reconocidas por el fago-dAb PVF4 se realizó mediante la separación cromatográfica del extracto desengrasado del pistacho, seguida del análisis de las fracciones obtenidas del FPLC mediante *Western blot* y ELISA indirecto con el fago-dAb PVF4. Las fracciones reconocidas por el fago-dAb tenían un tamaño entre 20-35 kDa, confirmándose mediante MALDI-TOF/TOF que se correspondían con la secuencia aminoacídica de la proteína 11S (alérgeno Pis v 2) de *Pistacia vera*, con una cobertura del 45 %. El análisis de las secuencias peptídicas obtenidas indicó que principalmente pertenecían a la subunidad básica de la proteína.

10) La técnica de ELISA indirecto desarrollada con el fago-dAb precipitado del clon PVF4, permitió reconocer al pistacho en matrices alimentarias con un límite de detección de 3983 mg Kg⁻¹ y sólo presentó reacción cruzada con la yema de huevo en un 4,30 %.

11) En el análisis de 77 productos comerciales para valorar la aplicabilidad de la técnica de ELISA indirecto, el límite de detección y el procesado a altas temperaturas de algunas muestras provocaron que no se detectara pistacho en 14 muestras que lo declaraban en su etiquetado. Por otro lado, las muestras que declaraban contener frutos de cáscara diferentes al pistacho o trazas de frutos de cáscara, y contenían anacardo (filogenéticamente cercano al pistacho) fueron negativas tanto para el ELISA indirecto como para la técnica de PCR en tiempo real, demostrando la especificidad del fago-anticuerpo.

SUMMARY

Production and characterisation of recombinant antibodies (scFv and dAb) for the detection of walnut (*Juglans regia*) and pistachio (*Pistacia vera*) in foods using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) techniques

Food allergy is a growing public health problem. Accidental exposure of sensitive individuals to allergenic ingredients, even in small amounts, can trigger severe allergic reactions. To ensure a high level of consumer health protection, the European Union requires food labelling to mention ingredients listed in Annex II of Regulation 1169/2011, including walnuts and pistachio nuts. To comply with the established rules, food safety industries and agencies must have reliable analytical methods at their disposal, to allow the detection of ingredients causing allergic reactions, which may be present, either intentionally or accidentally, in foodstuffs.

There are a multitude of genetic and immunological methods for the detection of allergens in food, with ELISA and PCR methods being the most widespread. PCR allows the detection of a specific DNA sequence of the target species in the food, while the ELISA method involves the identification of an allergenic protein or protein marker using antibodies. Immunoassays are the most widely used methods due to their speed, simplicity, sensitivity, and automation capability. However, all available immunoassays are based on the use of polyclonal or monoclonal antibodies developed in animals. International animal welfare regulations (European Directive 2010/63/EU) encourage the development of alternatives based on the "3Rs" principle: replace, reduce, and refine the use of animals in research and experimental processes. To this end, the development of recombinant antibodies and enzyme-linked immunosorbent techniques without animal immunisation is a novel and promising alternative for allergen detection.

Phage display technology allows the selection of affinity probes from recombinant libraries expressing antibody fragments on their surface (Fab, scFv or dAb type). The selection process (biopanning) involves exposure of the phage library to the antigen of interest, followed by recovery of the phage bound to the target molecule and subsequent amplification in *Escherichia coli*. To improve the sensitivity and avidity of the selected antibodies, attachment of a biotin acceptor domain allows binding to a biotin molecule, in the presence of the enzyme biotin ligase. The formation of multimeric antibodies is induced with the addition of an avidin-peroxidase (HRP) molecule.

Taking into account the above mentioned aspects, in this PhD Thesis different methodologies have been used for the detection of walnut and pistachio in food. Firstly, recombinant antibodies against walnut (*Juglans regia*) and pistachio (*Pistacia vera*) proteins have been obtained from commercial phage-antibody libraries by means of the phage display, and they have been used in the development of ELISA methods for the detection of walnut and pistachio in food. Likewise, the identification and characterisation of the proteins recognised by the phage-antibodies have been carried out using electrophoretic, chromatographic and spectrometric techniques. In addition, to improve the sensitivity and applicability of the ELISA method developed, a functional modification consisting of biotinylation and multimerization of the recombinant antibodies has been carried out in *Pichia pastoris*, a eukaryotic organism. Finally, a comparative study on the sensitivity and specificity between a direct ELISA with the multimerised antibodies, a sandwich ELISA with polyclonal antibodies and a real-time PCR has been carried out.

The results obtained were as follows:

1) Eleven clones were selected from the Tomlinson I library, which recognised walnut but not peanut, after the second and third rounds of selection. However, only the clone JR35 produced a band of the expected size after PCR analysis.

2) The biotin acceptor domain (BAD) was inserted at the C-terminus of the scFv in the expression vector pPICZαB, which was transformed in *Pichia pastoris* and then, a cotransformation with a vector codifying for the biotin ligase enzyme was developed to obtain the JrBSF clone. After methanol induction of *Pichia pastoris*, 6 mL of biotinylated JrBSF scFv were produced at a concentration of 2 mg mL⁻¹.

3) Since avidin is a tetrameric protein that can bind up to four biotin molecules, the binding of the walnut-specific biotinylated scFv antibody to ExtrAvidin-HRP was demonstrated by dot blot assays, mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF) and sedimentation rate experiments. Thus, it was demonstrated that, a ExtrAvidin-HRP core molecule could incorporate at least 2 biotinylated scFv molecules.

4) The walnut-specific multimeric scFv was used for the development of a direct ELISA with a limit of detection of 1616 mg Kg⁻¹ for raw walnut in binary mixtures of wheat flour, being 2466 mg Kg⁻¹ in binary mixtures with baked walnut, and improving the LOD of the indirect ELISA with the phage-scFv JR35 (6378 mg Kg⁻¹). Furthermore, it showed only 2.25 % cross-reactivity with pecan, which is phylogenetically very close to walnut.

5) The applicability of the developed direct ELISA was demonstrated with the analysis of 30 commercial products.

6) Electrophoretic and immunoblot analysis demonstrated that the JrBSF scFv bound to a 15 kDa band in walnut extracts. This band was identified as 11S globulin (allergen Jug r 4) from *Juglans regia*, with 31 % sequence coverage using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry.

7) In a comparative study where 100 commercial food samples were tested by a direct ELISA using scFv-JrBSF, a commercial sandwich ELISA kit and a real-time PCR, the most sensitive method was the real-time PCR, followed by the ELISA kit and the multimeric ELISA. The ELISA kit was less affected by food processing, but showed a higher cross-reactivity to pecans, giving false positives. Of all samples tested, 7-12.6 % contained walnuts, but did not declare it. There was one sample that claimed to contain walnut but it was not detected by any methodology. Therefore, the use of genetic and enzyme-linked immunosorbent techniques is necessary for a reliable labelling verification of walnut containing foods.

8) Several screening strategies were carried out to obtain pistachio specific antibodies from a commercial library of dAbs, which did not show cross-reactivity with cashew and peanut. The *biopanning* process included two rounds of screening with whole protein extracts (S1 and S2) or defatted extracts (S3 and S4) from pistachio, cashew and peanut. Strategies S3 and S4 showed a higher enrichment of pistachio-binding phage-dAbs. After sequence analysis, all the 8 clones selected were different, except PVF4-dAb from S4 and PVC12-dAb from S3. The presence of an Amber codon in CDR1 of six clones prevented the expression of dAb in *Pichia pastoris*, but this stop codon is translated as glutamine (Gln) in *E. coli* suppressor strains.

9) Identification of pistachio proteins recognised by the phage-dAb PVF4 was performed by chromatographic separation of defatted pistachio extract, followed by Western blot analysis and indirect ELISA of the fractions obtained from FPLC with the phage-dAb PVF4. The phage-dAb bound fractions with a size between 20-35 kDa and MALDI-TOF/TOF analysis identified the amino acid sequence of the bands as the 11S protein (allergen Pis v 2) from *Pistacia vera*, with a sequence coverage of 45 %. Following analysis of the peptide sequences obtained, it was determined that the basic subunit of the protein was preferentially recognised.

10) The indirect ELISA technique developed using precipitated phage-dAb from the clone PVF4, recognised pistachio with a detection limit of 3983 mg Kg⁻¹, and cross-reacted only 4.30 % with egg yolk.

11) In the analysis of 77 commercial products to assess the applicability of the indirect ELISA method, the limit of detection and the high processing temperature resulted in the lack of detection of pistachio in 14 samples that declared it in their labelling. On the other hand, the samples that declared to contain nuts other than pistachio or traces and thereof contained cashew nuts (phylogenetically close to pistachio), tested negative in the indirect ELISA and real-time PCR, demonstrating the specificity of the method.

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

I.1. REACCIONES ADVERSAS A LOS ALIMENTOS

Las personas están constantemente expuestas a un gran número de proteínas alimentarias, ya que una alimentación saludable consta de una dieta variada, completa y equilibrada. Sin embargo, algunos componentes de la dieta pueden actuar como factores desencadenantes de reacciones adversas. Las reacciones adversas a los alimentos incluyen a las alergias y a las intolerancias alimentarias, lo que ha dado lugar a la aparición de multitud de términos en este campo. La Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI, *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*) clasifica las reacciones adversas a los alimentos como tóxicas y no tóxicas (Figura I.1). Las reacciones tóxicas son las provocadas por alimentos que contienen compuestos tóxicos, como toxinas microbianas, metales pesados, plaguicidas o sustancias con actividad farmacológica. En este caso, a todos aquellos que consuman ese alimento les afectará en mayor o menor medida, dependiendo del individuo y de la cantidad ingerida. Las reacciones no tóxicas se describen como hipersensibilidad alimentaria y dependen de la susceptibilidad de cada individuo. A su vez, las reacciones no tóxicas pueden dividirse en dos tipos: si no están mediadas por mecanismos inmunitarios se clasifican como intolerancias alimentarias, y cuando hay una base inmunitaria se clasifican como alergias alimentarias. Las intolerancias alimentarias se dividen a su vez en metabólicas, farmacológicas o producidas por mecanismos desconocidos. En el grupo de alergias alimentarias podemos distinguir las mediadas por IgE y las no mediadas por IgE (Muraro *et al.*, 2014; Sicherer y Sampson, 2018).

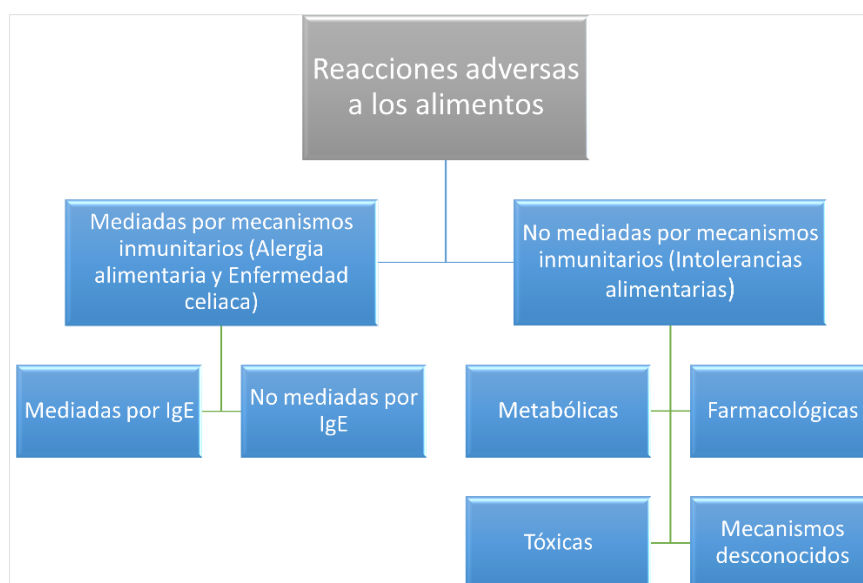


Figura I.1. Categorías de las reacciones adversas a los alimentos (versión de Sampson *et al.*, 2014).

I.1.1. Alergia alimentaria

La alergia alimentaria es la reacción adversa a los alimentos que hace referencia a cualquier respuesta anormal desde el punto de vista clínico, mediada por el sistema inmunitario, producida tras la ingestión, contacto o inhalación de un alimento o de un aditivo alimentario contenido en el mismo, que en la mayoría de las personas no provoca ningún efecto perjudicial.

La única forma posible de prevenir una reacción alérgica en individuos sensibles consiste en evitar por completo los alimentos que la desencadenan, lo que implica una restricción de la dieta. Históricamente, para prevenir que la alergia alimentaria apareciera en los niños con mayor riesgo de padecerlas se les recomendaba evitar esos alérgenos. Actualmente, se está estudiando la posibilidad de evitar la aparición de alergias alimentarias aplicando estrategias para facilitar el aumento de la tolerancia inmunológica y la reducción de los síntomas mediante la incorporación precoz de los posibles alérgenos en la alimentación de los niños (de Silva *et al.*, 2020; Muraro *et al.*, 2014), pero su efectividad es muy limitada. Se han llevado a cabo numerosas investigaciones sobre diversas formas de inmunoterapia alimentaria, como las vías de administración oral, sublingual y epicutánea. La inmunoterapia oral es la más prometedora en cuanto a la cantidad de proteína que puede ingerirse, pero también ha demostrado ser menos tolerable y tener un perfil de seguridad menos favorable (con más efectos secundarios) en comparación con la inmunoterapia sublingual y la inmunoterapia epicutánea, que ofrece una menor protección, pero es muy tolerable y tiene el mejor perfil de seguridad. Sin embargo, ninguna de las opciones ofrece tolerancia permanente (Burks *et al.*, 2018).

Los alérgenos alimentarios son cualquier proteína presente en el alimento que es susceptible de sensibilizar el sistema inmune. Se distinguen dos clases de alérgenos alimentarios según sus diferentes mecanismos inmunológicos. Los alérgenos alimentarios de clase I son los más comunes y los principales sensibilizadores de las enfermedades alérgicas, pudiendo provocar reacciones en individuos sensibles. Mayoritariamente, las proteínas implicadas son las glicoproteínas solubles en agua con pesos moleculares entre 10-70 kDa. Los alérgenos alimentarios de clase I son estables al calor, al ácido y a las proteasas, lo que los hace especialmente resistentes a la digestión gástrica. Los alérgenos alimentarios de clase II se refieren a los aeroalérgenos que pueden causar una variedad de síntomas diferentes en individuos previamente sensibilizados, por reactividad cruzada de las IgE (Figura I.2). En la actualidad, el diagnóstico de alergias alimentarias solo es satisfactorio para los alérgenos alimentarios de clase I, ya que los extractos estandarizados

de los alérgenos alimentarios de clase II son difíciles de aislar y muy lábiles (Aas, 1978; Breiteneder y Ebner, 2000; Jones y Burks, 2008; Sampson *et al.*, 2014).

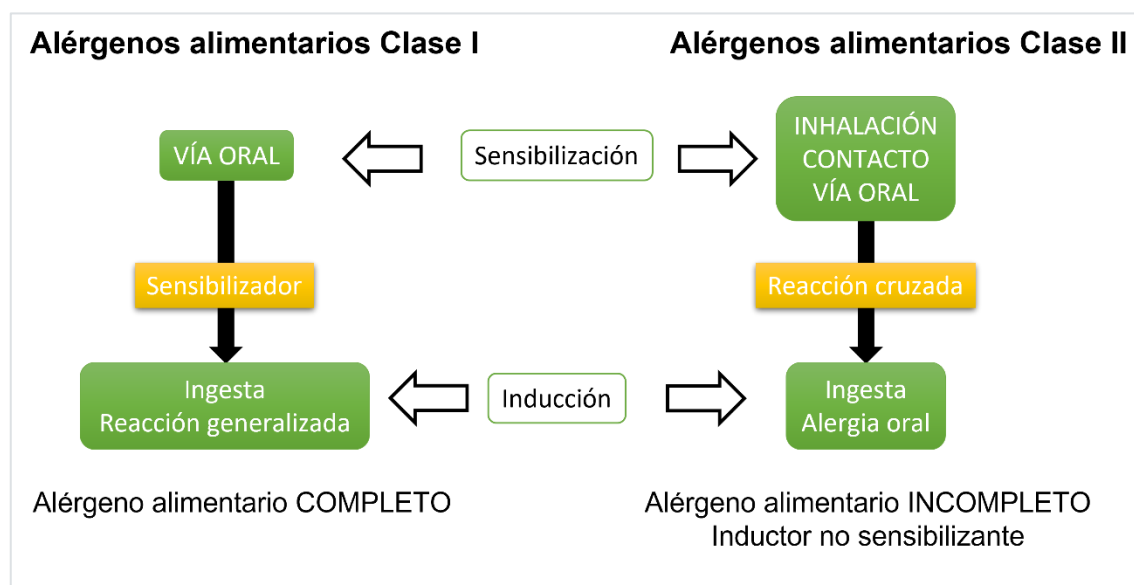


Figura I.2. Clasificación de alérgenos alimentarios (Adaptación de Smith, 2017).

Atendiendo a secuencias de aminoácidos compartidas, propiedades moleculares y estructuras tridimensionales conservadas, los alérgenos se agrupan en un número limitado de familias proteicas. En el caso de proteínas alergénicas de alimentos vegetales, el 65 % pertenece a cuatro familias dominantes: las prolaminas, las cupinas, las profilinas y la familia Bet v 1. La superfamilia de las prolaminas comprende tres grandes grupos de alérgenos alimentarios vegetales, las albúminas 2S, las proteínas de transferencia de lípidos no específicas (nsLTP) y los inhibidores de la alfa-amilasa/tripsina de los cereales. La superfamilia de las cupinas comprende las globulinas, principalmente de las legumbres y los frutos de cáscara, dividiéndose en la vicilina 7S y en la legumina 11S. Las profilinas son proteínas citosólicas muy conservadas en plantas, que se encargan de la reorganización de microfilamentos en diversos procesos. Tanto las profilinas como los homólogos de Bet v 1 presentan reacción cruzada con los alimentos, ya que personas con alergia al polen suelen padecer síntomas alérgicos después de ingerir ciertos alimentos vegetales. Por ejemplo, los alérgenos de las frutas de la familia Rosaceae o tejidos somáticos de la familia Apiaceae presentan reacción cruzada con los alérgenos presentes en el polen de abedul, en particular Bet v 1. Finalmente, las principales familias de alérgenos de origen animal son las tropomiosinas, las caseínas y las parvalbúminas (Breiteneder y Mills, 2005, 2009; Breiteneder y Radauer, 2004; Mills *et al.*, 2002).

Las manifestaciones clínicas de las alergias alimentarias son extremadamente variables, desde pequeños trastornos digestivos e irritaciones de la piel hasta síntomas más graves como la anafilaxia que, en algunos casos, puede poner en peligro la vida del consumidor. En la actualidad, la alergia alimentaria es una de las principales causas de anafilaxia tratada en los servicios de urgencias de los países desarrollados, especialmente en los niños (Sicherer y Sampson, 2018). Las manifestaciones clínicas de la alergia alimentaria pueden afectar a la piel, las vías respiratorias, el tracto gastrointestinal y el sistema cardiovascular y nervioso. En los pacientes alérgicos, la piel es uno de los órganos diana más comunes en las reacciones de hipersensibilidad alimentaria mediadas por IgE. En el 80 % de las reacciones alérgicas a los alimentos se producen manifestaciones clínicas que incluyen prurito y urticaria. Pero también, la piel es un lugar importante de sensibilización primaria a los alérgenos alimentarios, por lo que la dermatitis atópica se considera un factor de riesgo para el desarrollo de una alergia alimentaria, especialmente durante la infancia y la niñez temprana. Los alimentos más comunes asociados a la dermatitis atópica son la leche de vaca, el huevo, el cacahuete, la soja, el trigo, el pescado y los frutos secos. (De Martinis *et al.*, 2020; Jones y Burks, 2008; Perry *et al.*, 2004).

Las alergias alimentarias se han convertido en un importante problema de salud en todo el mundo. Por ese motivo, varios países han introducido en su legislación la obligación de indicar la presencia de determinados ingredientes alergénicos en las etiquetas de los alimentos. Sin embargo, un importante factor de riesgo para las personas sensibilizadas es la presencia de alérgenos por contaminaciones cruzadas que ocurren durante el procesamiento de las materias primas o durante el almacenamiento del producto finalizado. Se ha corroborado cómo en la manipulación de alimentos alergénicos, las partículas se desplazan en mayor o menor medida en función de su forma, siendo el desplazamiento mayor de las partículas esféricas, favoreciendo la contaminación cruzada (Meima *et al.*, 2021). Entre otros problemas asociados al procesado de alimentos se encuentran la pérdida de trazabilidad o la sustitución fraudulenta de ingredientes. Por ello, en el etiquetado se debe distinguir claramente entre la información de alérgenos presentes en la lista de ingredientes y un etiquetado de alérgenos preventivo para aquellos alérgenos que puedan estar presentes o de los que se puedan encontrar trazas. Además, para garantizar el cumplimiento de la normativa sobre el etiquetado de los alimentos hay que incluir la evaluación del riesgo de alérgenos no declarados en las materias primas que se compran a los proveedores (FIAB, 2016; Sicherer y Sampson, 2014). Por otra parte, para evitar un uso excesivo del etiquetado precautorio de alérgenos (PAL) y aumentar el número de productos seguros a disposición de las personas alérgicas, es importante el establecimiento de dosis

umbrales en esta población (Allen y Taylor, 2018; DunnGalvin *et al.*, 2015). Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), aunque se están empleando pruebas sensibles para la detección de alérgenos, siguen existiendo problemas importantes, como límites de detección fuera del rango de sensibilidad clínica, y especificidad y reproducibilidad insuficientes (EFSA, 2014).

I.1.1.1. Alergia alimentaria mediada por IgE

Los 8 alimentos responsables de la mayoría de las reacciones alérgicas más importantes en Europa y EE. UU., son el cacahuete, los frutos de cáscara, la leche, el huevo, el pescado, el marisco, la soja y el trigo. En los primeros años de vida, las alergias mediadas por IgE más frecuentes son las causadas por la leche de vaca, el huevo, el cacahuete, el trigo, la soja, el pescado y los frutos de cáscara. Sin embargo, en la edad adulta, la mayoría de las alergias están causadas por la ingestión de cacahuetes, frutos de cascara, marisco y pescado. Estas diferencias se deben principalmente a la inmadurez del sistema inmune en edades tempranas, así como a una exposición distinta a determinados grupos de alimentos en los diferentes grupos de edad (Burks *et al.*, 2001). La hipersensibilidad de tipo I mediada por IgE se considera el tipo más común de alergia alimentaria (Figura I.3).

La alergia alimentaria mediada por IgE puede dividirse en dos fases. En la fase inicial, llamada fase de sensibilización, se produce una exposición al alérgeno a través del sistema gastrointestinal, la mucosa o la piel. En estas zonas, las células dendríticas son las encargadas de capturar a los alérgenos, procesarlos y presentarlos a las células de linfocitos T, para la diferenciación de estas células en diferentes subtipos de células T *helper* (Th), como las células CD4+ Th2, para iniciar una respuesta inmunitaria adaptativa (Walsh y Mills, 2013). La alergia es impulsada por las células CD4+ Th2 específicas del alérgeno, que producen las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13. En el caso de los individuos susceptibles, las citoquinas tienen una función importante en la diferenciación de las células Th2, que conduce a la secreción de IgE específicas del alérgeno por parte de las células de linfocitos B específicas del alérgeno. Las IgE desempeñan un papel fundamental en la alergia alimentaria. Una vez producidas, las IgE se unen a la forma tetramérica del receptor de alta afinidad de la IgE (FcεRI) en los mastocitos y los basófilos. En la fase de inducción, tras una nueva exposición al alérgeno alimentario, se produce el reconocimiento del alérgeno por parte de las IgE unidas al receptor FcεRI, lo que promueve la cascada de señalización que desencadena la liberación de histamina, prostaglandinas y leucotrienos y otros factores

que provocan los síntomas relacionados con la alergia (Kim y Burks, 2015; Monaci *et al.*, 2020; Renz *et al.*, 2018; Stone *et al.*, 2010; Wambre *et al.*, 2017).

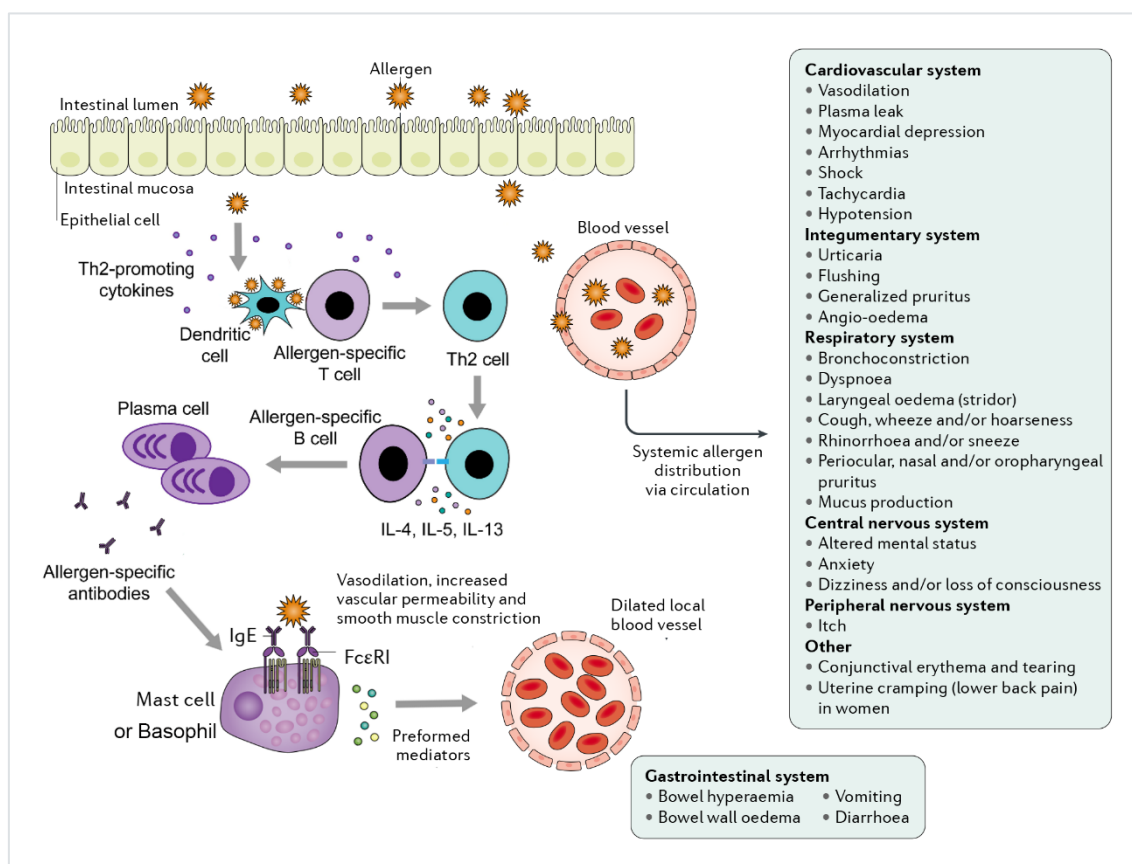


Figura I.3. Inducción de Inmunoglobulinas E por alérgenos alimentarios y cascada de señalización celular (imagen adaptada de Renz *et al.*, 2018 y Xu *et al.*, 2022).

Existen diversas rutas de sensibilización, pero una misma familia de alérgenos suele compartir la misma ruta. La sensibilización a los alérgenos alimentarios ocurre principalmente a través del tracto gastrointestinal, pero aquellos que poseen reactividad cruzada con el polen de algunas plantas producen sensibilización por vía pulmonar (Uzzaman y Komarow, 2014). Cuando la sensibilización ocurre a nivel gastrointestinal, los alérgenos alimentarios presentan unas propiedades moleculares que incrementan su estabilidad térmica y su resistencia a la acción desnaturizante de las proteasas. Sorprendentemente, en este sentido solo existen 2 familias de alérgenos: las caseínas y las cupinas, que mantienen su alergenidad después de haber sido digeridas (Breiteneder y Mills, 2005). Así, la primera barrera defensiva frente a los alérgenos y los microorganismos es la mucosa intestinal. Ésta posee ácido gástrico, mucus, un epitelio intestinal íntegro, enzimas digestivas, peristaltismo intestinal, así como otros factores inespecíficos que constituyen la barrera no inmunológica. Si los alérgenos y microorganismos consiguen

atravesar esa primera barrera, a continuación, se enfrentan a la barrera inmunológica que engloba a los mecanismos de respuesta innatos (péptidos antimicrobianos, células inmunes que expresan receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, etc.) y a los mecanismos adaptativos (linfocitos, IgA). En algunas ocasiones, los antígenos no digeridos o parcialmente digeridos y los microorganismos pueden detectarse finalmente en la mucosa y en los nódulos linfáticos, y los antígenos solubles también pueden encontrarse en la sangre y llegar hasta otros tejidos. La captación de antígenos está regulada por el paso a través de células epiteliales y células M, o mediante la captación directa de las células dendríticas transepiteliales. Este fenómeno puede resultar beneficioso, permitiendo la inducción de tolerancia inmunitaria frente a los antígenos ambientales. Pero las personas con alergias alimentarias presentan debilitada la barrera no inmunológica e incrementada la permeabilidad intestinal. Esto es debido a que la neutralización del ácido gástrico aumenta el paso de proteínas a través de la mucosa, produciendo una respuesta adaptativa intensa que conlleva la aparición de células T productoras de citoquinas Th2, IgE específicas del alérgeno, y en casos de reiteradas exposiciones, desgranulación de basófilos y mastocitos (Bischoff y Sellge, 2014; Salvo-Romero *et al.*, 2015; Sellge *et al.*, 2010; Untersmayr y Jensen-Jarolim, 2006).

I.1.1.2. Prevalencia

La verdadera prevalencia de la alergia alimentaria es difícil de establecer, debido a la heterogeneidad en la metodología y diseño de los estudios epidemiológicos disponibles. A pesar de estas limitaciones, se ha llegado a la conclusión de que la prevalencia de las alergias alimentarias varía según edad y región, reflejando las diferencias de las dietas en las diferentes culturas. En los países desarrollados se ha observado un incremento en la prevalencia de las alergias alimentarias, aunque está comenzando a aumentar también en los países en vías de desarrollo (Figura I.4) (McWilliam *et al.*, 2020; Sicherer y Sampson, 2018). La alta prevalencia en el mundo desarrollado es especialmente alarmante en el caso de la población infantil ya que mientras en adultos es de aproximadamente un 2-4 %, se estima que alrededor del 6-8 % de los niños padecen alergias alimentarias y hasta un 3 % ha experimentado complicaciones sanitarias (Gupta *et al.*, 2011; Rona *et al.*, 2007; Taylor-Black y Wang, 2012; Zuidmeer *et al.*, 2008).

En España, la mayor prevalencia de alergia alimentaria se localiza en Extremadura y en el centro de la península (de la Hoz, 2015). La alergia a los frutos de cáscara es infrecuente en el primer año de vida, probablemente debido al limitado consumo de frutos secos. A los

6 años, la prevalencia de la alergia a los frutos de cáscara es similar a la de la alergia a los cacahuetes. Más de un tercio de los niños con alergia al cacahuete y al huevo en la infancia tienen alergia a los frutos secos a los 6 años (McWilliam *et al.*, 2019).

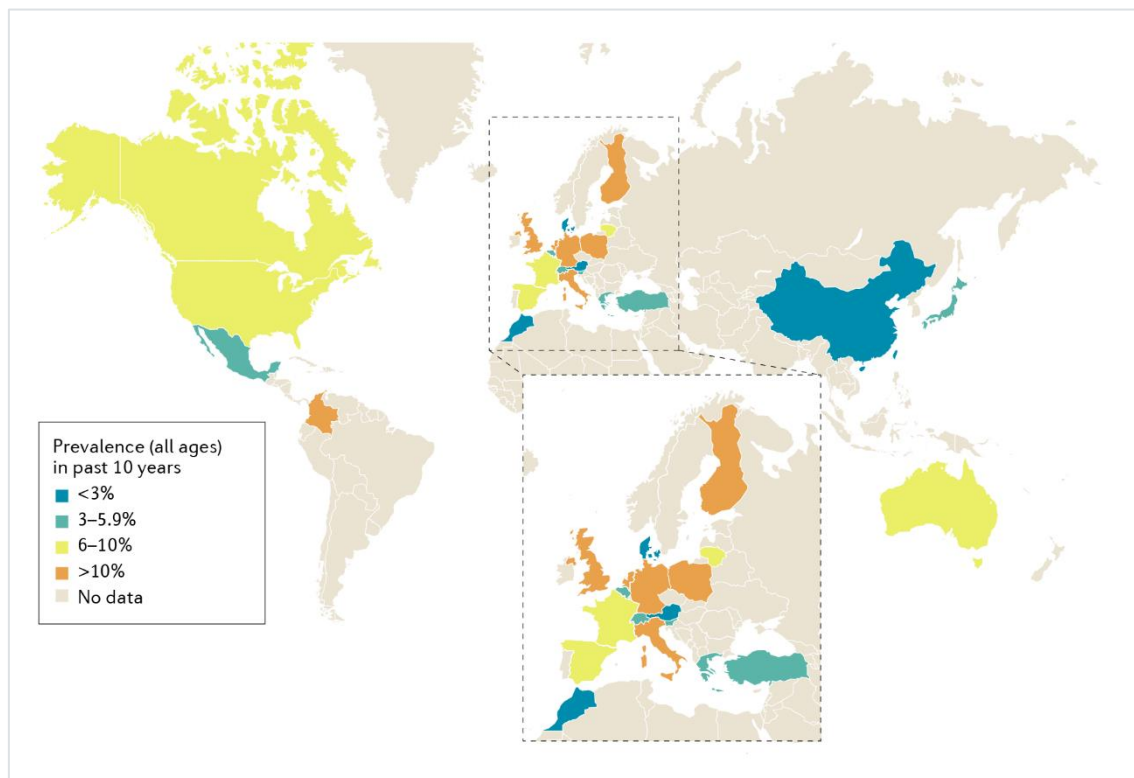


Figura I.4. Prevalencia de la alergia alimentaria en el mundo (Imagen de Renz *et al.*, 2018).

Aún con estos datos, la EFSA concluyó que las alergias alimentarias afectan a una proporción relativamente pequeña de la población. Pero considerando que las reacciones alérgicas pueden ser graves, incluso potencialmente mortales, y que las personas con intolerancias alimentarias también pueden ver afectada su calidad de vida, la EFSA propone el fomento de las buenas prácticas en la manipulación de alimentos, así como controles de calidad exhaustivos en las industrias alimentarias. No se conocen exactamente los factores desencadenantes de las alergias alimentarias, pero sí se ha corroborado que los factores genéticos, ambientales (como la luz solar e insuficiencia de vitamina D o dietas ricas en ácidos grasos) o el exceso de higiene pueden influir en la aparición y aumento de las alergias alimentarias (EFSA, 2014).

I.1.1.3. Dosis Umbral

Los umbrales pueden definirse como la cantidad máxima de un alimento alergénico que puede tolerarse sin producir ninguna reacción adversa. Un umbral individual es la cantidad

máxima de un alimento alergénico que puede ser tolerada por un individuo específico alérgico a los alimentos, mientras que un umbral poblacional es la cantidad máxima de un alimento alergénico que puede tolerar toda la población (o una subpoblación representativa) de individuos con un tipo específico de alergia alimentaria. Los umbrales también pueden denominarse NOAEL (niveles sin efecto adverso observado) o MTD (dosis máxima tolerada). La dosis más baja que provoca una reacción se denomina LOAEL (nivel más bajo observado con efecto adverso). Existen datos clínicos sobre las dosis umbrales de varios alimentos alergénicos obtenidos a partir de pruebas orales para el diagnóstico o para inmunoterapia. Los datos umbrales individuales obtenidos pueden utilizarse para modelar estadísticamente los umbrales de distribución de la población para los alérgenos (FARRP, 2021). Sin embargo, la mayoría de las personas alérgicas a los alimentos no conoce su dosis umbral individual porque nunca se les ha realizado la provocación oral a doble ciego controlada con placebo (DBPCFC), prueba diagnóstica "gold standard" en alergia de alimentos como parte de su diagnóstico. El conocimiento del NOAEL y LOAEL es bastante beneficioso para el individuo, porque dictará el grado de cuidado necesario en la aplicación de una dieta de evitación segura y eficaz. A su vez, se amplía la dieta y se mejora la nutrición y la calidad de vida del paciente tras la confirmación de la alergia alimentaria por la DBPCFC (Cerecedo *et al.*, 2014). En España se estima que solo el 13 % de los pacientes con alergias alimentarias son diagnosticados de forma rutinaria mediante DBPCFC debido a que al ser una técnica laboriosa no se realiza en la práctica clínica habitual (de la Hoz, 2015). Por ello, normalmente se aconseja a los alérgicos a los alimentos que eviten por completo el alimento o los alimentos agresivos, asumiendo esencialmente que la dosis umbral es cero. Pero este hecho no mejora la calidad de vida del paciente alérgico y actualmente existen datos suficientes para establecer las dosis umbrales que puedan usarse como referencia en la industria alimentaria. Por ejemplo, Japón y Suiza son los únicos países que han adoptado un umbral/nivel de acción reglamentario para los alérgenos alimentarios. Japón establece el límite de 10 µg/g de proteína para el etiquetado y Suiza de 1000 µg/g de alimento (Ballmer-Weber *et al.*, 2015). A pesar de la dificultad de determinar dicho valor, existe cierto consenso científico en establecer los límites de detección para diferentes ingredientes alergénicos entre 1 y 100 mg Kg⁻¹, dependiendo del alimento (Johnson *et al.*, 2011; Remington *et al.*, 2020; Taylor *et al.*, 2014). En este sentido, la EAACI y el programa VITAL (*Voluntary Incidental Trace Allergen Labeling*) de la industria australiana establecieron las dosis de referencia mínima o dosis umbrales de algunos alérgenos principales para provocar una reacción alérgica que no causarían efectos adversos en el 95 % de los consumidores sensibles, con el fin de animar a la industria alimentaria a utilizar

una aplicación de un etiquetado precautorio creíble, proporcionando una mayor confianza al consumidor y una mejora de su seguridad. (Allen *et al.*, 2014; Allen y Taylor, 2018).

I.1.2. Alergia a los frutos de cáscara

Los frutos de cáscara han demostrado ser beneficiosos para la salud debido a su alto contenido de ácidos grasos insaturados y a la presencia de otros compuestos biológicamente activos, como tocoferoles, esteroides vegetales y compuestos fenólicos. Con el fin de mejorar las características nutricionales de los alimentos comerciales, es frecuente la incorporación de frutos de cáscara a ciertos productos, lo que supone un riesgo para el consumidor alérgico. Entre los frutos de cáscara de mayor consumo se encuentran las almendras, nueces, anacardos, pacanas, pistachos, avellanas, nuez de Brasil, macadamia, piñones y castañas. Y de ellos, el 90 % son responsables de alergias alimentarias (Geiselhart *et al.*, 2018; Ros, 2010).

Los frutos de cáscara se encuentran entre los alimentos que con mayor frecuencia causan reacciones alérgicas agudas y casi todos ellos se han asociado a reacciones alérgicas mortales. A pesar de su importancia clínica, la epidemiología de la alergia a los frutos de cáscara sigue siendo poco conocida y la prevalencia en diferentes regiones del mundo aún no está bien caracterizada. En un estudio de McWilliam *et al.* (2015) la prevalencia de la alergia a los frutos secos confirmada por IgE fue inferior al 2 %, mientras que la prevalencia de la alergia probable a los frutos secos osciló entre el 0,05 % y el 4,9 %. Las estimaciones de prevalencia de reacciones de síndrome de alergia oral (SAO) a los frutos de cáscara fueron más altas (8-11,4 %) y procedían predominantemente de Europa. La prevalencia varió significativamente según la región, siendo la avellana el fruto de cáscara que más reacciones alérgicas produce en Europa, la nuez y el anacardo en los EE.UU y la nuez de Brasil, la almendra y la nuez en el Reino Unido (McWilliam *et al.*, 2015).

Los frutos de cascara tienen dos tipos principales de proteínas, las metabólicas y las de almacenamiento. Las proteínas de almacenamiento de las semillas (Tabla I.1) son los alérgenos asociados a muchos casos de reacción anafiláctica grave a los frutos de cáscara. Estas incluyen la superfamilia de las prolaminas (incluidas las albúminas 2S) y la superfamilia de las cupinas, formada por las proteínas del grupo de las leguminas (las globulinas 11S) y las vicilinas (las globulinas 7S). Otras proteínas de los frutos de cascara son las conocidas como panalérgenos, donde se incluyen las proteínas de transferencia de lípidos (LTP), las profilinas (proteínas estructurales), las proteínas relacionadas con la patogénesis y las heveínas. Estas proteínas son similares a las del polen, las semillas, las

frutas y las verduras, y están asociadas a la reactividad cruzada mediada por la IgE. La sensibilización a estas proteínas puede dar lugar al Síndrome de Alergia alimentaria Oral (SAO), aunque también es posible que se produzcan reacciones sistémicas, especialmente en el caso de las LTP y albúminas 2S (Weinberger y Sicherer, 2018).

Tabla I.1. Proteínas alergénicas de los frutos de cáscara (Fuente: Weinberger y Sicherer, 2018).

FC	Familia	Nombre	Tipo	Relevancia Clínica
Avellana	Panalérgenos	Cor a 1	PR-10	Homólogo de Bet v 1; SAO
		Cor a 2	Profilina	Homólogo de Bet v 2; SAO
		Cor a 8	LTP	Reacciones sistémicas en niños de áreas Mediterráneas
	PA	Cor a 9	Globulina 11S	Reacciones sistémicas
		Cor a 11	Globulina 7S	
		Cor a 14	Albúmina 2S	Reacciones sistémicas
Anacardo	PA	Ana o 1	Globulina 7S	
		Ana o 2	Globulina 11S	
		Ana o 3	Albúmina 2S	Reacciones sistémicas
Pistacho	PA	Pis v 1	Albúmina 2S	Homólogo de Ana o 3; Reacciones sistémicas
		Pis v 2	Globulina 11S	Homólogo de Ana o 2; Reacciones sistémicas
		Pis v 3	Globulina 7S	
		Pis v 5	Globulina 11S	Homólogo de Ana o 1
		Jug r 1	Albúmina 2S	Reacciones sistémicas
Nuez	PA	Jug r 2	Globulina 7S	Reacciones sistémicas
		Jug r 4	Globulina 11S	Reacciones sistémicas
		Jug r 6	Vicilin-like cupin 7S	
		Jug r 3	nsLTP1	Reacciones sistémicas en individuos del Mediterráneo
	Panalérgenos	Jug r 5	Profilina	
		Jug r 7	Profilina	
		Jug r 8	nsLTP2	
		Jug r 1	Albúmina 2S	Homólogo de Jug r 1
Pacana	PA	Car i 2	Globulina 7S	Reacciones sistémicas
		Car i 4	Globulina 11S	Homólogo de Jug r 4
		Car i 1	Albúmina 2S	
Almendra	Panalérgenos	Pru du 6	Globulina 11S	
		Pru du 3	LTP	
		Pru du 4	Profilina	
Piñón	PA	Pin p 1	Albúmina 2S	Reacciones sistémicas
Nuez de Brasil	PA	Ber e 1	Albúmina 2S	Reacciones sistémicas
		Ber e 2	Globulina 11S	

PA, proteína de almacenamiento; SAO, síndrome de alergia oral; nsLTP, proteína de transferencia de lípidos no específica.

Esta Tesis se centra en el estudio de las proteínas alergénicas de nuez y pistacho, así como su detección en alimentos.

El primer alérgeno identificado en la nuez fue Jug r 1, una proteína perteneciente a la familia de las albúminas 2S y que es similar a los alérgenos presentes en la nuez de Brasil (Ber e 1, 82 %), el ricino (89 %), la semilla de algodón (59 %) y la semilla de mostaza (45 %). El segundo alérgeno identificado fue Jug r 2, una globulina 7S que a pesar de tener un 70 % de secuencia de aminoácidos idéntica a Ara h 1, no presenta reactividad cruzada con las proteínas homólogas del cacahuete. En 2004 se identificó el alérgeno Jug r 3, una proteína de transferencia de lípidos (LTP) del extracto de nuez que se une mediante inmunotransferencia a la IgE del 91,3 % de los pacientes alérgicos a las nueces. Otra proteína alergénica de la nuez perteneciente a la familia de las leguminas, una globulina 11S, fue identificada por Teuber *et al.* (1999) y denominada Jug r 4, que ha demostrado tener reacción cruzada con pacana, anacardo y avellana. Además, el 75 %, 78 % y 65 % de los sueros con IgE de pacientes alérgicos se unen a los alérgenos de la nuez, Jug r 1, Jug r 3 y Jug r 4, respectivamente, siendo Jug r 3 y Jug r 1 los alérgenos más potentes de la nuez (Pastorello *et al.*, 2004; Rangsithienchai *et al.*, 2013; Robotham *et al.*, 2009; Roux *et al.*, 2003; Teuber *et al.*, 1999; Wallowitz *et al.*, 2006).

En el caso del pistacho, los alérgenos principales son Pis v 1 (albúmina 2S) y Pis v 2 (globulina 11S). Pis v 1, que pertenece a la familia de las albúminas 2S, muestra una similitud estructural con los alérgenos del anacardo con un 64 % de identidad de secuencia con Ana o 3 y un 48 % con Ana o 2 (Robotham *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2003). Pis v 2 tiene homología con Jug r 4 de la nuez (50 %), Cor a 9 de la avellana (47 %) y Ber e 2 de la nuez de Brasil (46 %). El 68 y el 50 % de los pacientes con alergia al pistacho muestran reacción cruzada de IgE frente a Pis v 1 y Pis v 2, respectivamente. Por otra parte, Pis v 3 (similar a una vicilina 7S) y Pis v 5 (subunidad ácida de la globulina 11S) están reconocidas como alérgenos menores del pistacho, ya que su unión a IgE no supera el 40 % en pacientes alérgicos (Ahn *et al.*, 2009; Beyer *et al.*, 2002; Geiselhart *et al.*, 2018; Noorbakhsh *et al.*, 2011; Wallowitz *et al.*, 2006; Willison *et al.*, 2008).

Como se ha comentado, la sensibilización alimentaria es un paso previo al desarrollo de la alergia alimentaria. La sensibilización suele comenzar en la infancia y da lugar a la producción de anticuerpos específicos de tipo inmunoglobulina E contra determinados alimentos. Los patrones de sensibilización y cosensibilización a los componentes de la nuez o el pistacho muestran claras diferencias geográficas en la población alérgica europea. La sensibilización a la nuez relacionada con el polen de abedul (Jug r 5) predomina en el norte y centro de Europa, mientras que la sensibilización a la proteína de transferencia de lípidos (Jug r 3) predomina en el sur de Europa. La sensibilización a la profilina (Jug r 7) es

frecuente en toda Europa. Finalmente, la sensibilización a las proteínas de almacenamiento (Jug r 1, 2, 4 y 6) se ha detectado hasta en el 10 % de los sujetos analizados (Lyons *et al.*, 2021). Con respecto al pistacho, los estudios disponibles se realizaron en grupos muy pequeños, en pacientes con alergia al anacardo y al pistacho, en los que se investigó la reactividad cruzada entre el principal alérgeno del anacardo (Ana o 1) y Pist v 3. Estos estudios sugieren que el anacardo es el principal sensibilizador, pero al encontrar un paciente alérgico al pistacho y no al anacardo, se planteó la posibilidad de que el pistacho pueda ser ocasionalmente el principal sensibilizador (Andorf *et al.*, 2017; Van der Valk *et al.*, 2017). Los fenómenos de cosensibilización y/o reactividad cruzada entre los alérgenos del pistacho y del anacardo son bastante frecuentes, ya que los pacientes sensibilizados presentan IgE específicas frente a ambos frutos de cáscara, que reconocen proteínas homólogas en el pistacho y el anacardo (Uotila *et al.*, 2016).

I.1.3. Marco legislativo: Información alimentaria facilitada al consumidor

Todo consumidor tiene derecho a que los alimentos que compre cumplan con la normativa de seguridad alimentaria en cuanto al etiquetado de los alimentos, indicando la presencia de alérgenos en ellos. El *Codex Alimentarius*, creado en 1962 por la Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), establece las normas y directrices que deben aplicarse en todos los países a fin de garantizar la seguridad alimentaria. Sin embargo, la aplicación concreta de dicha normativa difiere en los distintos países/continentes. Los principales alérgenos o grupos de alérgenos (leche, huevo, pescado, cacahuetes, frutos secos, soja, crustáceos, mariscos y cereales con gluten) contenidos en los productos comerciales en cualquier cantidad deben declararse en las etiquetas en Europa, Estados Unidos, Canadá, Australia, Nueva Zelanda, China, Sudamérica y Sudáfrica. Debido a que los frutos secos son uno de los 8 grupos responsables de un gran número de reacciones alérgicas, están incluidos en la lista de alimentos alergénicos con etiquetado obligatorio en la mayoría de los países/regiones (por ejemplo, EE.UU., Canadá, UE), a excepción de Japón y Corea. Sin embargo, algunos alimentos como el altramuz, los cereales, el apio, la mostaza, el sésamo, el melocotón o el tomate solo deben declararse en determinados países o continentes (Fierro *et al.*, 2017; Gendel, 2012; López, 2018; Taylor y Baumert, 2015; Taylor y Hefle, 2006).

Debido a la falta de consenso existente para determinar cuál es la dosis umbral de los alérgenos, se ha producido cierto abuso por parte de la industria alimentaria en el uso del etiquetado precautorio como las advertencias del tipo "puede contener". Esto, junto con el

hecho de que no existen directrices homologadas para determinar el nivel de riesgo del alérgeno en la industria, provoca que cada fabricante tenga diferentes métodos para identificar e interpretar el riesgo de la presencia de alérgenos. Además, dependiendo del país de donde proceda el alimento, el etiquetado de alérgenos varía considerablemente. Globalmente, los países y zonas pueden caracterizarse por tener un etiquetado obligatorio de alérgenos alimentarios, un etiquetado voluntario de alérgenos alimentarios o ninguna regulación. En los países que tienen requisitos de etiquetado de alérgenos alimentarios estrictos, identifican diferentes alérgenos prioritarios basándose, en su mayoría, en investigaciones científicas sobre la prevalencia de alérgenos realizadas en esos países. Otros países utilizan un "proceso de adopción" adoptando total o parcialmente una o varias regulaciones bien reconocidas, como las regulaciones establecidas por la autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en la Unión Europea, el *Codex Alimentarius* o la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA)(Diao, 2017).

En septiembre de 2020, la Comisión del *Codex Alimentarius* (CXC 80-2020) publicó la versión revisada de su Norma mundial sobre principios generales de higiene de los alimentos (CXC 1-1969). Como principio general se introdujo el concepto de cultura de seguridad alimentaria, que promueve la seguridad alimentaria mejorando la toma de conciencia y el comportamiento de los empleados en las empresas alimentarias. Además, se ha añadido al *Codex Alimentarius* que los alimentos no preenvasados en los comercios minoristas de alimentación también deben incorporar el etiquetado de alérgenos, y que se deben conocer y declarar los alérgenos importantes de otros países donde se exportan los productos (FAO *et al.*, 2020). Finalmente, el concepto de cultura de seguridad alimentaria para la reducción de los alérgenos alimentarios se introdujo en el Reglamento (UE) 2021/382 (Comisión Europea, 2021).

En Europa, la alergia alimentaria es un problema creciente de salud pública que afecta a más de 17 millones de personas, sobre todo niños y jóvenes, con consecuencias que pueden variar desde benignas hasta potencialmente mortales. Por ello, la EFSA considera la investigación en métodos para la detección y cuantificación de alérgenos en alimentos una línea prioritaria de actuación, con el fin de facilitar el análisis del riesgo y poder establecer en el futuro umbrales de concentraciones de alérgenos en los alimentos que protejan a la población sensible (EFSA, 2017). Teniendo en cuenta que la única medida eficaz para evitar las reacciones alérgicas a los alimentos en personas predispuestas es la exclusión estricta de los alérgenos de la dieta, el Reglamento Europeo (UE) 1169/2011 y el Real Decreto 126/2015 sobre información alimentaria facilitada al consumidor, establecen

los 14 alérgenos que obligatoriamente deben declararse en el etiquetado de los alimentos, estén o no envasados (Figura I.5). Éstos deben destacarse del resto de los ingredientes listados en los alimentos procesados, independientemente de su cantidad. Sin embargo, esta lista puede incorporar en un futuro próximo nuevas dianas que las evidencias científicas relacionen con un aumento de la prevalencia de procesos alérgicos (European Union, 2011; Ministerio de la Presidencia, 2015).

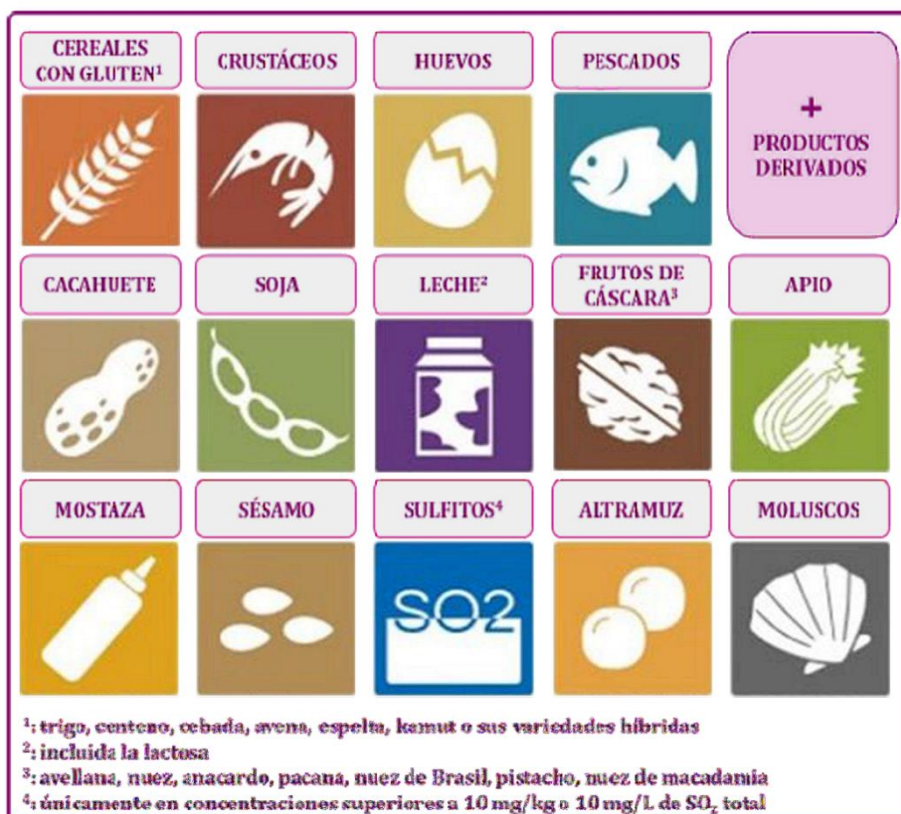


Figura I.5. Representación de los 14 grupos de ingredientes de declaración obligatoria recogidos en el Reglamento (UE) 1169/2011 (Anexo II) por causar alergias o intolerancias alimentarias.

I.1.3.1. Planes de control de alérgenos

Teniendo en cuenta el alto número de personas alérgicas, la confección de un plan para controlar los alérgenos en cualquier industria alimentaria, incluidas las de hostelería, es una labor imprescindible. Este plan debe inculcar tanto a la industria alimentaria como al personal de cocina y de sala, la importancia de formar y concienciar sobre el tema de los alérgenos y sus implicaciones a nivel sanitario y económico, así como el peligro que supone la contaminación cruzada por una incorrecta manipulación de los alimentos. Los objetivos principales del plan de control de alérgenos son garantizar: (1) que los productos que contienen alérgenos están correctamente etiquetados, y (2) que ningún producto contiene

alérgenos no declarados. A su vez, es imprescindible conocer cuáles son los alérgenos en cada materia prima que se va a emplear para preparar los alimentos o productos comerciales. Igualmente importante y necesario es implementar una gestión específica de proveedores relacionada con alérgenos, contar con listas de compra de alimentos alérgenos y requerir toda la información relacionada con la presencia de alérgenos en todos los productos que se suministran. Es decir, se debe exigir a los proveedores que certifiquen la ausencia de alérgenos en las materias primas, ya que la correcta gestión de los alérgenos depende de su autenticidad.

Para facilitar la gestión de alérgenos en las industrias alimentarias y el cumplimiento de la normativa sobre declaración de alérgenos en el etiquetado, diversas instituciones, como la Agencia Europea de Alimentos y Bebidas (FDE, *FoodDrink Europe*), el *British Retail Consortium* (BRC), la Agencia Española de Seguridad alimentaria y Nutrición (AESAN) y la FDA (*Food and Drug Administration*), ofrecen guías para el control de alérgenos. Las industrias registradas ante la FDA deben realizar controles preventivos adecuados y evitar la inclusión de alérgenos no declarados en los alimentos. Además, deben monitorizar la correcta implementación de las medidas preventivas y formular acciones correctivas si esto no sucede. El BRC publicó una guía de buenas prácticas para el manejo de alérgenos en 2014, cuyo objetivo es ayudar a desarrollar un sólido sistema de manejo de alérgenos. La Agencia Española de Consumo, Seguridad alimentaria y Nutrición (AECOSAN) publicó en 2015 una guía cuyo objetivo es ayudar a los operadores alimentarios y autoridades responsables a comprender y aplicar el Real Decreto 126/2015 por el que se aprueba la norma general relativa a la información alimentaria de los alimentos que se presenten sin envasar para la venta al consumidor final y a las colectividades, de los envasados en los lugares de venta a petición del comprador, y de los envasados por los titulares del comercio al por menor (Ministerio de la Presidencia, 2015). Por último, el Diario Oficial de la Unión Europea ha publicado recientemente la comunicación de la Comisión Europea (2022/C355/01) sobre la aplicación de sistemas de gestión de la seguridad alimentaria que contemplan buenas prácticas de higiene (BPH) y procedimientos basados en los principios del APPCC. Su finalidad es facilitar y armonizar la aplicación de los requisitos de la UE sobre las BPH y los principios del APPCC como parte de los sistemas de gestión de la seguridad alimentaria y hace especial énfasis en la gestión de alérgenos. Además, establece las medidas de control para prevenir la contaminación cruzada por alérgenos tanto en la producción primaria como en las fases posteriores de la cadena alimentaria y da pautas acerca de la utilización del etiquetado precautorio de alérgenos, que solo debe utilizarse en el caso de que no pueda aplicarse de manera eficiente una estrategia preventiva y el

producto pueda presentar un riesgo para los consumidores alérgicos (Comisión Europea, 2022).

Por otro lado, la aparición de métodos de detección cada vez más sensibles está aumentando el número de alimentos en los que se detectan alérgenos y a niveles muy bajos. Esto ha resultado en una reducción en el número de alimentos etiquetados como "libres de alérgenos", lo que significa que la variedad de alimentos disponibles para los consumidores alérgicos se ve reducida.

I.2. MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE ALÉRGENOS

Para las personas alérgicas, la presencia de alérgenos no declarados en los alimentos, incluso la presencia de trazas de alérgenos debida a la contaminación durante el procesamiento de los alimentos supone una gran amenaza para su salud. Por lo tanto, a falta de tratamientos eficaces para evitar el desencadenamiento de una reacción adversa potencialmente grave, los pacientes alérgicos y los proveedores de alimentos deben disponer de métodos de detección rápidos y sencillos para asegurar el cumplimiento de la legislación sobre el etiquetado de alérgenos en los alimentos. Un método eficaz debe tener una especificidad y una sensibilidad excelentes, ya que una gran variedad de componentes alimentarios puede interferir con el ensayo, y para algunas personas una dosis baja es suficiente para provocar reacciones graves (Monaci *et al.*, 2020). Los métodos analíticos rápidos son necesarios para facilitar la detección fiable de alérgenos por parte de los laboratorios de control de las industrias alimentarias y determinar si un alimento ha sufrido contaminación cruzada y, además, para identificar cómo y cuándo se ha producido esta contaminación (Prado *et al.*, 2016). La detección de ingredientes alergénicos puede basarse en una detección directa de las proteínas alergénicas, principalmente mediante métodos inmunoquímicos como las técnicas inmunoenzimáticas ELISA y dispositivos de flujo lateral (DFL). Otros métodos que también se pueden emplear son los biosensores de proteína, la espectrometría de masas y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). También se puede realizar detección indirecta de alérgenos mediante la detección de fragmentos de ADN/ARN específicos de la especie de interés, por técnicas como PCR convencional o en tiempo real, biosensores de ácidos nucleicos o técnicas de MLPA (amplificación múltiple dependiente de ligación).

Los métodos de detección más empleados en la industria incluyen los ensayos de inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

y la espectrometría de masas, métodos que están actualmente disponibles comercialmente para la detección alérgenos (Flanagan, 2015). No obstante, hay que tener en cuenta que, dependiendo de la diana elegida, la capacidad de la técnica para detectar proteínas puede verse afectada por el procesado al que se somete el alimento.

I.2.1. Técnicas basadas en la detección de proteínas

I.2.1.1. Inmunoensayos

Los inmunoensayos están basados en la alta afinidad y las interacciones específicas de los anticuerpos con sus correspondientes dianas proteicas (antígenos, en este caso alérgenos). Los ensayos inmunoenzimáticos como la técnica de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) han sido los métodos analíticos más utilizados por la industria alimentaria y las agencias reguladoras para controlar los residuos de alérgenos de forma rutinaria, debido a su sensibilidad y especificidad y a tener un manejo sencillo (Jayasena *et al.*, 2015). El dispositivo de flujo lateral (DFL) es un formato ideal como prueba de campo, muy utilizado por la industria alimentaria, ya que permite determinar rápidamente la presencia de alérgenos.

I.2.1.1.1. ELISA

Debido a su simplicidad y alta sensibilidad, ELISA es la técnica más comúnmente empleada en la gestión de riesgos de seguridad alimentaria para la detección de alérgenos alimentarios. La técnica ELISA se basa en el reconocimiento y la unión de regiones específicas de los antígenos (epítomos) a anticuerpos específicos. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales, obtenidos a partir de animales inmunizados, o recombinantes (obtenidos *in vitro*). La unión del antígeno y el anticuerpo se detecta utilizando una enzima unida al antígeno, al anticuerpo específico o a un anticuerpo secundario, que convierte el complejo antígeno-anticuerpo en un producto coloreado cuando se añade el sustrato enzimático. Las enzimas más utilizadas son la peroxidasa de rábano (HRP) o la fosfatasa alcalina, que pueden actuar sobre sustratos específicos para producir cambios de color dependientes de la concentración (Sena-Torralba *et al.*, 2020). Los analitos pueden ser cualquier alérgeno alimentario o una mezcla de varios alérgenos y pueden detectarse y cuantificarse en matrices alimentarias complejas. Sin embargo, los métodos ELISA, que se basan en la interacción específica entre los anticuerpos y los antígenos, pueden dar en ocasiones resultados inexactos debido a la reacción cruzada del

anticuerpo con las proteínas de otros alimentos. Por lo tanto, la elección del anticuerpo y de la proteína objetivo son los factores determinantes para la eficacia de la detección (Holzhauser *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2022).

Existen diversos formatos de ELISA, que se pueden clasificar en competitivo y no competitivo (Figura I.6). Estos dos tipos de ensayos se utilizan dependiendo del propósito de los experimentos y también de los tipos de anticuerpos y antígenos (Konstantinou, 2017).

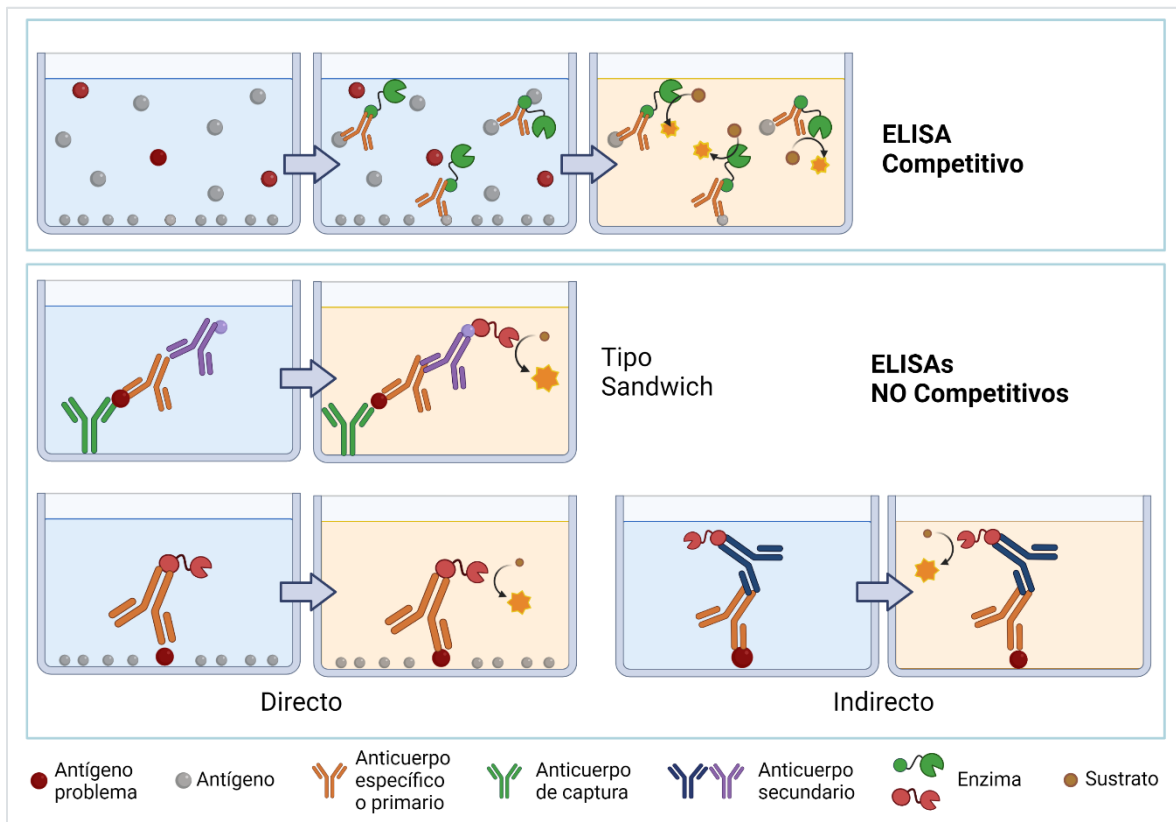


Figura I.6. Representaciones gráficas de los diferentes tipos de ELISAs.

Se han desarrollado numerosos ELISAs para la detección y cuantificación de proteínas alergénicas en varios productos alimentarios, como un ELISA tipo sándwich que detecta el alérgeno 2S de soja mediante un anticuerpo monoclonal altamente específico y sin reacciones cruzadas, cuyo límite de detección (LOD) se encuentra entre 1-10 ppm (o mg Kg^{-1}) (Ueberham *et al.*, 2019). Otro ELISA tipo sándwich fue desarrollado para detectar residuos de pistacho tanto crudos como tostados en alimentos, utilizando antisueros de oveja como reactivo de captura y antisueros de conejo como reactivo detector marcado con fosfatasa alcalina. El ELISA optimizado tenía un límite de cuantificación (LOQ) de <1 ppm, con una reactividad cruzada con el anacardo equivalente a 4 ppm de pistacho tostado (Lim, 2010).

También se han desarrollado multitud de kits comerciales para la detección de alérgenos de frutos de cáscara (Sena-Torralba *et al.*, 2020). Un ejemplo de ello, es el kit de ELISA directo Monotrace mediante anticuerpo monoclonal específico de pacana, que no presenta reacciones cruzadas y un LOD de 0,5 ppm (Liu *et al.*, 2017).

Conviene señalar que el método de extracción y la solución estándar de alérgenos son aspectos cruciales en la aplicación de cualquier ELISA, y estos carecen de estandarización, lo que dificulta la comparación de los resultados entre diferentes kits. A su vez, la solubilidad de la proteína difiere significativamente si se trata de ingredientes crudos o después del procesamiento de los alimentos, debido a la formación de agregados de proteína, la desnaturalización o la modificación química que sufren las proteínas (Monaci *et al.*, 2020; Verhoeckx *et al.*, 2015). En la Tabla I.2. se recogen los kits comerciales disponibles para la detección de nuez y pistacho, y sus principales características.

Tabla I. 2. Listado de Kits comerciales en diferentes formatos para la detección de nuez y pistacho (elaboración propia).

Kit Comercial	Formato	Código	Reactividad Cruzada	LOD ppm	Analito
Romer Labs AgraQuant	Sandwich ELISA	COKAL0948		0,35	Nuez
Romer Labs AgraStrip	<i>Lateral flow device</i>	COKAL0910AS		10	Nuez
RIDASCREEN R-Biopharm	<i>Lateral flow device</i>	BL607-10/-25	Pacana 100, Anacardo 1, Pistacho 0,1	10	Nuez
Biofront technologies	<i>monoclonal antibody-based ELISA assay</i>		Pacana (0,0023 %), judía adzuki (0,002 %), colza (0,0014 %), y nuez moscada (0,0018 %)	0,22	Nuez
Cortez Diagnostics, INC.	Sandwich ELISA		Soja 0,003 %, Piñón 0,003 %, Pistacho 0,003 %, Sésamo 0,003 %, Nuez de Brasil 0,003 %, Avellana 0,022 %, Castaña 0,11 %, Pecan 0,80 %	0,35	Nuez
Arigo Biolaboratories	ELISA Kit	ARG80818		0,35	Nuez

Tabla I.2. Continuación.

Antibodies online	ELISA Kit	ABIN997097		0,35	Nuez
Elution technologies-Equilabo	ELISA Kit			LOQ 2	Nuez
Astorilab	ELISA Kit	AST601396			Nuez
BioKits Neogen	Assay Kit	902085J		0,25	Nuez
Biosystems	ELISA kit			0,35	Nuez
Aler-tox Biomedal		KT-5909		0,6	Nuez
RIDASCREEN Biopharm	Lateral flow device	BL611-10/-25	Nuez de brasil 0,1, anacardo 4, avellana 0,1, calabaza 0,1, nuez 0,8	1	Pistacho
Romerlab AgraQuant Plus	Sandwich ELISA	COKAL2748F	anacardo (12 %), avellana (0,17 %), nuez (0,0008 %), pacana (0,0005 %), girasol (0,0002 %)	1	Pistacho
Romerlab AgraQuant	Sandwich ELISA	COKAL2748	anacardo (12 %), avellana (0,17 %), nuez (0,0008 %), pacana (0,0005 %), girasol (0,0002 %)	0,13	Pistacho
Romerlab Agrastrip	Lateral flow device	COKAL1310AS		2	Anacardo/ Pistacho
Cortez Diagnostics	ELISA Kit	Rapidtest	12 %	0.13	Pistacho
Arigo Bio	ELISA Kit	ARG80811		0,13	Pistacho
Antibodies online	ELISA Kit	ABIN2683231	12 %	1-40	Pistacho
Elution techonologies	ELISA Kit		< 1 %	1	Pistacho
Astorilab	ELISA kit	AST601996	12 %	--	Pistacho
Biosystems	ELISA kit	cod14127	12 %	0,13	Pistacho
Biomedal Alertox	Sandwich ELISA		12 %	0,13	Pistacho
Biofront technologies	ELISA Kit 96 wells		0,001 % pacana	0,12	Pistacho
Immunolab		PIS-E01	Anacardo 4 %	0,13	Pistacho
Equilabo Generon	well strips 12x8	ETE-75PST	< 1 %	3,249	Pistacho

I.2.1.1.2. Dispositivos de flujo lateral (DFL)

Se trata de una herramienta semicuantitativa para la detección de alérgenos alimentarios, que utiliza señales visuales para indicar los resultados de las pruebas de forma rápida y sencilla. Es la forma de inmunoensayo más utilizada dentro de la industria alimentaria. Al igual que el ELISA, el DFL funciona según el principio de la interacción específica entre los alérgenos y los anticuerpos, pero la señal visual se basa en las partículas coloreadas recubiertas de anticuerpos (Figura I.7).

El DFL consiste en una membrana con un depósito donde se aplica la muestra líquida que contiene los anticuerpos o antígenos que queremos detectar, y una ventana de reacción que generalmente consta de una línea de prueba (línea T) y una línea de control (línea C). Tras dejar caer una solución en el depósito sobre la membrana, el líquido se difunde por la membrana hacia las zonas T y C. Para garantizar la validez del dispositivo, el anticuerpo de detección se conjuga con oro y se seca en una almohadilla de fibra (almohadilla de oro). La almohadilla donde va la muestra proporciona los tampones optimizados necesarios para la realización de la prueba. La tira también contiene una almohadilla de mecha que proporciona la difusión necesaria para que los fluidos se muevan a través de la membrana. Cuando se aplica una muestra positiva a la tira, el antígeno objetivo de la muestra se une primero al anticuerpo marcado con oro y fluye a través de la membrana, formando un sándwich con el anticuerpo de captura presente en la línea de prueba. Esto da lugar a la formación de una línea visible, y el resultado se interpreta como positivo. El exceso de anticuerpo marcado con oro se desplaza y se une al anticuerpo anti-conjugado en la línea de control y se desarrolla la segunda línea. Esta segunda línea, a menudo denominada línea de control, sirve como control interno. El resultado es negativo si sólo está presente la línea de control (Baumert y Tran, 2015; Grothaus *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2022).

La primera aplicación, y una de las más populares, de este formato fue el uso de la gonadotropina coriónica humana (HCG) para la detección del embarazo. Actualmente, la principal aplicación de los DFL es en la gestión de alérgenos, para la detección de residuos de éstos en superficies y poder evaluar el riesgo de contaminación cruzada en líneas de producción compartidas en las industrias alimentarias. La primera versión aplicada al campo de los alérgenos alimentarios fue ideada por Mills, Potts, Plumb, Lambert y Morgan (1997) para detectar proteínas de cacahuete. Desde entonces, se han desarrollado y comercializado numerosos DFL para la detección de alérgenos alimentarios en productos crudos y también en productos procesados. Actualmente se dispone de algunos kits comerciales para la detección de almendras, avellanas, mariscos, gluten, cacahuetes, leche,

soja y huevo, con LODs que van de 1 a 25 ppm. Sin embargo, al igual que en el ELISA, el rendimiento de los DFL se puede ver afectado por los efectos del procesamiento y de la matriz (Mills *et al.*, 1997; Monaci *et al.*, 2020; Prado *et al.*, 2016; Schubert-Ullrich *et al.*, 2009).

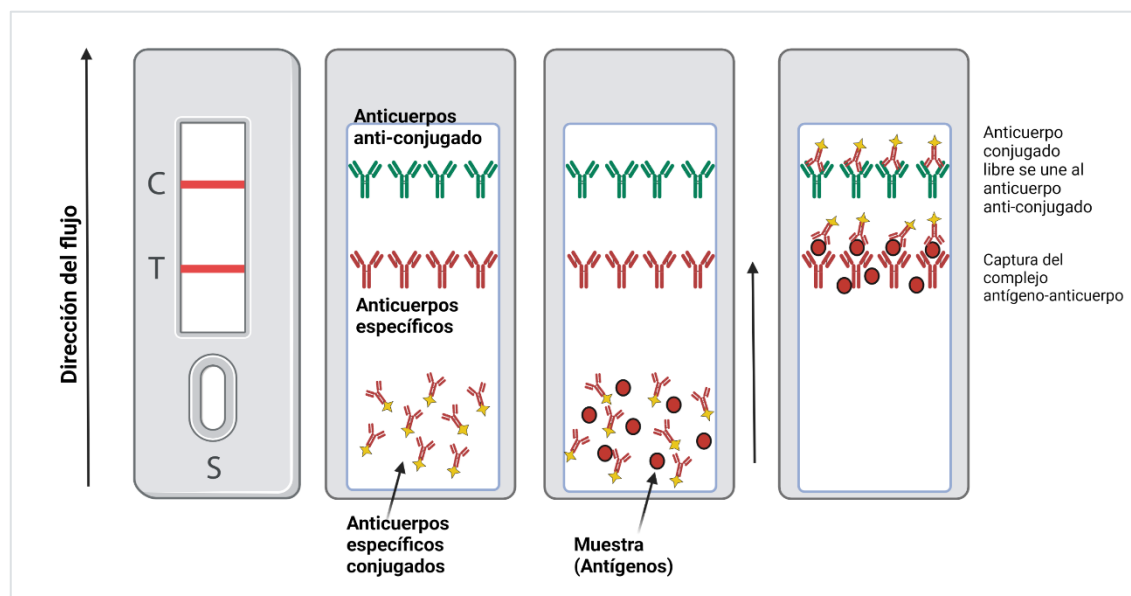


Figura I.7. Diagrama del dispositivo de flujo lateral (DFL). El dispositivo de flujo lateral consiste en una membrana de nitrocelulosa sobre un material de soporte con un anticuerpo de captura específico del antígeno en una línea de prueba (T) y un anticuerpo anti-conjugado en una línea de control (C). S: muestra.

Los DFL pueden ser tan sensibles como los ELISA. Son pruebas de naturaleza cualitativa, baratas, rápidas y fáciles de usar por lo que no requieren personal especializado. Una ventaja adicional de los DFL es que su uso no requiere una instrumentación compleja, lo que los hace adecuados para su uso sobre el terreno, como en instalaciones de equipos industriales y de restauración. Sin embargo, no están diseñados para la automatización en el laboratorio de análisis e identificación de un gran número de muestras (Popping *et al.*, 2010).

I.2.1.2. Cromatografía y espectrometría de masas

La cromatografía y la espectroscopia de masas (MS) representan esencialmente la combinación de métodos de separación y detección, basados en las diferencias de las propiedades físicas y químicas de los componentes de los alimentos. Es un sistema potencialmente adecuado para la detección múltiple de alérgenos alimentarios, por su alta precisión, reproducibilidad, eficiencia y especificidad (Costa *et al.*, 2016; Holzhauser *et al.*,

2020). La MS es capaz de detectar con precisión rastros de frutos de cáscara horneados a temperaturas que alcanzan 150 °C, evitando los problemas de desnaturalización parcial, disminución de solubilidad y reactividad cruzada de las muestras que aparecen en ocasiones en los inmunoensayos (Perner *et al.*, 2019). Los métodos basados en la espectrometría de masas representan la alternativa más reciente a los enfoques convencionales basados en anticuerpos. En particular, el acoplamiento entre la espectrometría de masas y la cromatografía líquida ha demostrado ser un éxito en la detección y cuantificación de alérgenos alimentarios. Sin embargo, su aplicación requiere el uso de equipos costosos, altos costes de mantenimiento y requiere personal cualificado. Por lo tanto, la tecnología MS no es adecuada para el análisis de rutina de alérgenos en los alimentos. Sin embargo, se puede utilizar como método auxiliar para confirmar los resultados obtenidos por otros métodos. El procedimiento experimental incluye la extracción/purificación de proteínas de alimentos potencialmente contaminados, su digestión con tripsina y la detección por LC-MS de los péptidos prototípicos en condiciones instrumentales adecuadas. Cada paso necesita una optimización adecuada durante el desarrollo del método para garantizar el mejor rendimiento en términos de sensibilidad, especificidad y robustez (Monaci *et al.*, 2020; Monaci y Visconti, 2009).

Las técnicas más empleadas en espectrometría de masas para generar iones son las de MALDI (desorción/ionización láser asistida por matriz, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) y ESI (ionización por electroespray, *Electrospray Ionization*). A continuación, los iones generados se separan en función de su relación masa/carga (m/z). El analizador puede ser de tiempo de vuelo (TOF, *Time of Flight*), cuadrupolo (Q, *quadrupole*) o de trampa iónica (IT, *Ion Trap*) (Johnson *et al.*, 2011; Monaci y Visconti, 2009). Finalmente, el detector registra el número de iones para cada valor m/z . La técnica de espectrometría de masas requiere una etapa de separación previa, que puede ser electroforesis en gel o cromatografía líquida, para simplificar la mezcla compleja de péptidos y proteínas que constituyen la muestra, y que se van a analizar en el espectrómetro. En función del procesado de la muestra se distinguen dos estrategias diferentes conocidas como *bottom up* y *top down*, dependiendo del nivel de información que se necesite obtener. Mientras que el primer enfoque requiere una etapa de digestión con una o más enzimas proteolíticas para aumentar la cobertura de péptidos, el segundo analiza las proteínas intactas y sus productos de fragmentación (Monaci y Visconti, 2009; Prado *et al.*, 2016).

Utilizando péptidos digeridos con tripsina con una secuencia y tamaño específicos de múltiples alérgenos alimentarios como péptidos distintivos de cada alérgeno, New et al

(2018) desarrollaron una técnica de LC-MS/MS que puede analizar simultáneamente la clara de huevo, la leche desnatada, el cacahuete, la soja y los frutos secos. La técnica mostró una alta recuperación (60-119 %), repetibilidad (CV <20 %) y sensibilidad, con un LOD de 10 ppm para cada alérgeno en galletas y pan procesados, cumpliendo así los requisitos mínimos de rendimiento establecidos por la *Association of Official Analytical Chemists International* (New *et al.*, 2018).

I.2.1.3. Biosensores

Un biosensor es un dispositivo que emplea propiedades de reconocimiento biológico para un bioanálisis selectivo (Kumar, 2008). El principal objetivo de la investigación en este campo es el desarrollo de sistemas *lab-on-a-chip* que permitan el análisis rápido, sensible y económico de las muestras. Este hecho convierte a los biosensores en una alternativa interesante para ser utilizada por pequeños laboratorios de control o para realizar análisis rápidos *in situ* por la industria. En la Tabla I.3 se presentan algunos ejemplos de biosensores desarrollados para la detección de alérgenos en alimentos.

Tabla I.3. Ejemplos de inmunosensores para la detección de alérgenos en alimentos.

Sensor	Diana	LOD	Referencia
SPCE-nAu (electrodos cabono)	Ara h 1 (cacahuete)	3,8 ng mL ⁻¹	Alves, Pimentel, Nouws, Marques, <i>et al.</i> , 2015
SPCE-nAu	Ara h 6 (cacahuete)	0,27 ng mL ⁻¹	Alves, Pimentel, Nouws, Correr, <i>et al.</i> , 2015
SPCE	Ara h 1 (cacahuete)	3,5 ng mL ⁻¹	Freitas, Nouws y Delerue-Matos, 2021
SPCE-nanodiamantes	Ara h 1 (cacahuete)	0,78 ng mL ⁻¹	Freitas <i>et al.</i> , 2022
Electroquímico COOH-MBs-HRP	Sin a 1 (mostaza)	0,82 ng mL ⁻¹	Gamella <i>et al.</i> , 2020
Au-SPR + prisma cristal y Au-SPE	Cor a 14 (avellana)	1 mg Kg ⁻¹	Costa <i>et al.</i> , 2021
Au-SPEs (individual y array de 8×SPEs)	Gliadina, Ara h 1, Cor a 1, Caseína, Ovoalbúmina/Gluten, cacahuete, avellana, leche y huevos	Gliadina: 0,075 mg Kg ⁻¹ Ara h 1: 0,007 mg Kg ⁻¹ Cor a 1: 0,089 mg Kg ⁻¹ Caseína: 0,170 mg Kg ⁻¹ Ovoalbúmina: 0,003 mg Kg ⁻¹	Lin <i>et al.</i> , 2017

Los biosensores constan de tres componentes: un receptor biológico específico para el analito que se va a detectar, un transductor para convertir el elemento de reconocimiento

en una señal adecuada y un dispositivo lector con la electrónica asociada o los procesadores de señales que son responsables de la visualización de los resultados. Las moléculas diana, como las proteínas o el ADN, pueden inmovilizarse en la superficie de un chip sensor y la actividad de unión entre las moléculas reconocidas puede monitorizarse cuantitativamente, es decir, permite medir una interacción molecular específica en tiempo real (Schubert-Ullrich *et al.*, 2009). La detección y la cuantificación se logran mediante diversas técnicas fisicoquímicas, por ejemplo, la resonancia de plasmón superficial (SPR), la absorción mejorada por resonancia (REA) o los sensores de fluorescencia de onda evanescente, por nombrar algunas. En función de la naturaleza del transductor empleado, los biosensores se pueden clasificar en: ópticos, electroquímicos, piezoeléctricos y termométricos.

Los biosensores ópticos se basan en la medición del cambio que se produce en la superficie del sensor cuando el analito se une al elemento de reconocimiento del dispositivo. Dentro de este grupo destacan los biosensores basados en la resonancia de plasmones superficiales (SPR, *surface plasmon resonance*). Esta técnica mide el ángulo SPR producido por una reducción abrupta en la intensidad de luz reflejada cuando un haz de luz incide con un ángulo específico sobre la lámina delgada de oro donde se encuentra el analito y a través de un prisma, interactúa con los electrones libres del metal (plasmones de superficie). El ángulo SPR varía en función del índice de refracción del medio dieléctrico. Este tipo de biosensores son especialmente atractivos en el ámbito de la seguridad alimentaria, puesto que permiten la detección del analito en matrices alimentarias complejas con un mínimo procesado de la muestra (Narsaiah *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2010).

Los sensores electroquímicos presentan una alta sensibilidad, especificidad y sencillez de funcionamiento, y su tiempo de detección es en la mayoría de los casos tan corto como el de los DFL, lo que demuestra su potencial para el control de alérgenos en los alimentos. Los sensores electroquímicos pueden clasificarse en función del modo de transducción de la señal electroquímica en amperométricos, voltamétricos y de impedancia. Los sensores amperométricos para la detección de alérgenos suelen basarse en partículas magnéticas y electrodos de carbono serigrafiados desechables (Ruiz-Valdepeñas Montiel *et al.*, 2016). En los sensores impedimétricos, un procedimiento clave es la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) que consiste en la aplicación de un leve estímulo de voltaje de corriente alterna, pudiendo reflejar las propiedades eléctricas de la superficie del electrodo del sensor, permitiendo la monitorización directa de la interacción entre el biorreceptor y su diana (Trashin *et al.*, 2015). Al igual que los sensores de impedancia, los sensores voltamétricos pueden monitorear la unión de biomoléculas en la superficie del electrodo

utilizando técnicas voltamétricas, como la voltametría de onda cuadrada (SWV) y la voltametría de pulso diferencial (DPV) (Eissa *et al.*, 2013; Kilic *et al.*, 2020).

En los últimos años, los biosensores han encontrado una atención creciente en el análisis de alimentos y la detección de alérgenos alimentarios, debido a la disponibilidad comercial de plataformas y kits SPR especiales (por ejemplo, Biacore Q, GE Healthcare y Spreeta, Texas Instruments). Los LODs conseguidos con estos biosensores son comparables a los de los ELISA tradicionales y están en el rango de 1 a 10 mg Kg⁻¹ (Xu *et al.*, 2022).

I.2.2. Técnicas basadas en la detección de ADN

Las técnicas basadas en el ADN presentan la ventaja de que el ADN se ve menos afectado que las proteínas por las operaciones de procesado, encontrándose normalmente intacto tras someterse a temperaturas de cocinado. Además, para el ADN se pueden emplear tampones de extracción más agresivos que los usados para la extracción de proteínas evitando afectar a su integridad. Por otra parte, el contenido de ADN suele ser más estable que los niveles de proteínas de la muestra, que pueden variar entre distintas especies o variedades. Un inconveniente citado con frecuencia en esta metodología es que algunos componentes de la matriz alimentaria pueden afectar al análisis y a la amplificación del ADN (López-Calleja, de la Cruz, González, *et al.*, 2015b; Poms *et al.*, 2004).

I.2.2.1. PCR y PCR en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es capaz de amplificar y detectar específicamente secuencias de ácidos nucleicos de plantas o animales que se utilizan en la fabricación de alimentos. Aunque las proteínas son las que provocan las reacciones alérgicas de tipo inmediato a los alimentos, la detección basada en ácidos nucleicos permite al analista identificar y cuantificar de forma indirecta la presencia del alimento alérgico en el que se encuentran, para cumplir con los requisitos de etiquetado de los alimentos o para identificar los llamados alérgenos ocultos. Las dianas de ADN para estos casos pueden ser los genes que codifican una proteína alérgica o cualquier otro marcador de ADN específico (Prado *et al.*, 2016).

Tabla I.4. Principales aplicaciones de técnicas de PCR para la detección de alérgenos alimentarios.

Alérgeno	Método	Gen diana	LOD	Matriz	Ref
Nuez	RT PCR, SybrGreen	Jug r 3	100 ppm	Productos comerciales	Linacero <i>et al.</i> , 2016
Pistacho	RT PCR, SybrGreen	Pis v 1	100 ppm	Productos comerciales	Sanchiz <i>et al.</i> , 2017
	LAMP (<i>loop mediated isothermal amplification</i>)	Pis v 1	10 ppm	Productos comerciales	Mao <i>et al.</i> , 2020
Anacardo	LNA y TaqMan	Ana o 1	10 ppm	Productos comerciales	Sanchiz, Ballesteros, <i>et al.</i> , 2018
Piñón	RT PCR, TaqMan	Chloroplast tRNA-Leu	0,1 ppm	Productos comerciales	Garino <i>et al.</i> , 2016
Cacahuete	RT PCR, TaqMan	ITS-1 de trigo, trigo sarraceno y cacahuetes	10 ppm	Comida procesada	Miyazaki <i>et al.</i> , 2019
	RT PCR, TaqMan	Ara h 6	10 mg/Kg	Cacahuetes tratados	Sanchiz <i>et al.</i> , 2021
Nuez y Almendra	RT PCR, SybrGreen	Jug r 1, Jug r 3 y Jug r 4 (matK) y almendra (Pru av 1)	1 pg (1,6 copias)	Productos comerciales	Houhoula <i>et al.</i> , 2019
Anacardo y Macadamia	RT PCR, TaqMan	ITS de anacardo y macadamia	0,1 mg/Kg	Productos comerciales	López-Calleja, de la Cruz, González, <i>et al.</i> , 2015a
Nuez y Pacana	RT PCR, TaqMan	ITS de nuez y pacana	0,1 mg/Kg	Productos comerciales	López-Calleja, de la Cruz, González, <i>et al.</i> , 2015b
Pistacho	RT PCR, TaqMan	ITS de pistacho	0,1 mg/Kg	Productos comerciales	López-Calleja <i>et al.</i> , 2014
Avellana	RT PCR, TaqMan	ITS de avellana	0,1 ppm	Matrices alimentarias	Lopez-Calleja <i>et al.</i> , 2013
Gluten	RT PCR, TaqMan	ITS de trigo, cebada y centeno	10-50 mg/Kg	Mezclas binarias	García-García <i>et al.</i> , 2019
Sésamo y Lino	RT PCR, TaqMan	ITS de sésamo y lino	1,3-1,4 mg/Kg	Productos comerciales	López-Calleja, de la Cruz, Martín, <i>et al.</i> , 2015
Colza y Soja GMO	duplex droplet digital PCR (ddPCR)	Fat A y Lectina	0,10 %	Semillas	Demeke, Lee y Eng, 2022
Tetraplex	RT-PCR	ITS1 o ITS2 de almendra, nuez de Brasil, anacardo, avellana, macadamia, pacana, pistacho y nuez	1 pg	Frutos de cáscara no procesados	Ito <i>et al.</i> , 2018
Multiplex	End point PCR	Cor a 1, 2S albumin, Avenin, Ara h 2, Ana o3, B1 hordein, Gliadin, Gly, m Bd28K, 11S-1	50.000 µg/L 50ppm	Avellana, pistacho, avena, sésamo, cacahuete, anacardo, cebada, trigo, soja y pacana	Cheng <i>et al.</i> , 2016

Se han utilizado varios enfoques basados en la técnica de PCR para la detección de ingredientes alergénicos, como la PCR a punto final, la PCR en tiempo real o cuantitativa y la PCR-ELISA.

La PCR a punto final es el método más sencillo y probablemente el menos costoso para la amplificación del ADN. Sus principales inconvenientes son que este método de PCR requiere un paso adicional para la detección del producto de amplificación, que tradicionalmente se ha realizado mediante electroforesis en gel, y que este método es una técnica meramente cualitativa.

La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR o *real-time PCR*) permite controlar la amplificación del ADN mientras se produce, ya que las señales (generalmente fluorescentes) pueden controlarse a medida que se generan durante la amplificación del ADN objetivo. Sin embargo, al tratarse de un método de detección indirecta, los resultados de la cuantificación se expresan como número de copias de ADN o concentración de ADN, por lo que deben diseñarse factores de conversión al contenido de proteínas para proporcionar información útil sobre el nivel real de contaminación de los ingredientes alergénicos. Además, aunque en menor medida que las proteínas, su precisión en el rastreo de ingredientes alergénicos en los alimentos también se ve afectada por el procesamiento de los alimentos que perjudica la estabilidad del ADN. Por último, también la composición de la matriz alimentaria plantea retos a la detección basada en el ADN, ya que los componentes, como la grasa, el azúcar, las proteínas y los metabolitos vegetales secundarios, pueden inhibir la reacción de la PCR (Higuchi *et al.*, 1992; Linacero *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2016). Estas técnicas se ven limitadas por la necesidad de equipos de laboratorio, por ejemplo, un termociclador, la complejidad de la operación y el grado de experiencia requerido (Xu *et al.*, 2022). Aun así, es una de las técnicas más empleadas para la detección de ADN de alérgenos, virus, bacterias, etc., (Tabla I.4).

La PCR-ELISA o ELOSA (*enzyme-linked oligosorbent assay*) es un ensayo híbrido que combina la PCR como primer paso y utiliza el ELISA como sistema de detección de los amplicones marcados (Figura I.8). Para ello, el gen de interés se amplifica mediante PCR en presencia de desoxiuridina trifosfato (dUTP) marcada con digoxigenina. Posteriormente, los productos de PCR se unen a sondas oligonucleotídicas específicas que están marcadas con biotina en su extremo 5'. Después, los amplicones biotinilados se unen a una placa de microtitulación recubierta de estreptavidina, donde se formarán complejos y solo los productos de PCR que contengan la secuencia de interés es la que se unirá, mientras que el resto se eliminará tras los lavados. Por último, se utiliza un anticuerpo anti-digoxigenina

marcado con enzimas para producir una señal colorimétrica que puede medirse con un lector de ELISA. Este método se ha aplicado con éxito a la detección de <10 ppm de avellana en alimentos procesados e ingredientes alimentarios, lo que eliminó el potencial de reactividad cruzada observado en ELISA (Holzhauser *et al.*, 2002; Popping *et al.*, 2010; Sue *et al.*, 2014).

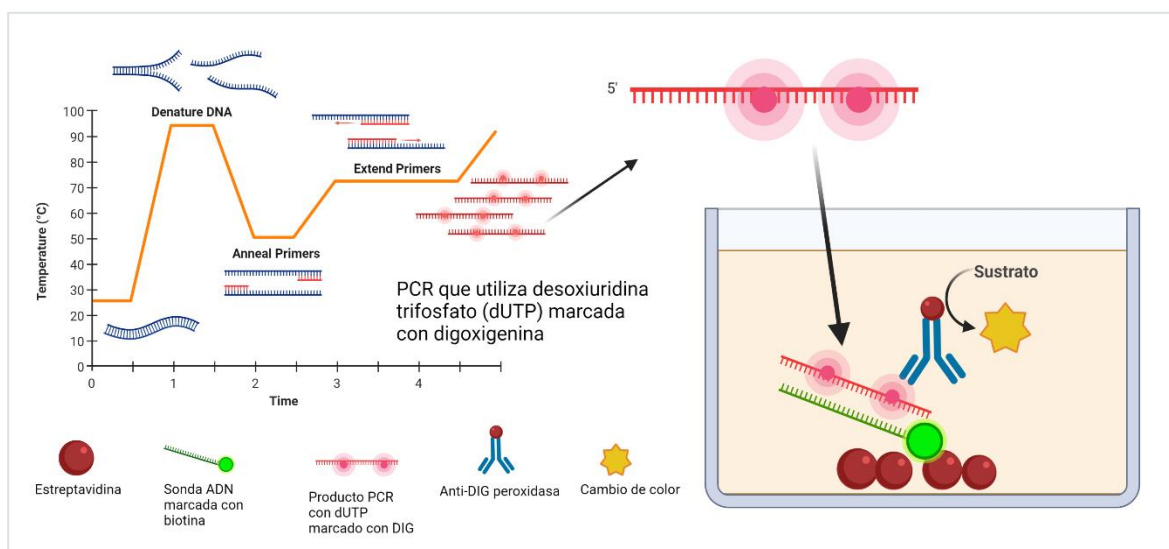


Figura 1.8. Representación esquemática de PCR-ELISA. La PCR-ELISA comienza con la PCR seguida de un ensayo inmunológico y la detección de la producción de color. El gen diana se amplifica en presencia de DIG-dUTP. Empleando la afinidad de la biotina con la avidina, el gen amplificado se inmoviliza en la placa y, finalmente, utilizando el anticuerpo secundario y el sustrato, se visualiza la producción de color.

Debido al número de alérgenos alimentarios que pueden encontrarse en un alimento, la detección simultánea de diferentes ingredientes alergénicos es de gran interés para los laboratorios de control. Con este objetivo, se ha desarrollado una PCR múltiple donde se puede observar un tamaño de amplicón distinto para cada alérgeno. Como algunos termocicladores para PCR en tiempo real tienen la capacidad de detectar varias sondas fluorescentes, pueden adaptarse fácilmente para detectar varios alérgenos alimentarios simultáneamente. Los métodos de PCR múltiple tienen varias ventajas, como el ahorro de tiempo, la reducción del coste del análisis y la disminución de la probabilidad de contaminación cruzada (Schöringhumer *et al.*, 2009).

La técnica de PCR-ELISA también puede ser útil para detectar y diferenciar entre múltiples secuencias/objetivos que podrían ser amplificados por un conjunto común de cebadores, lo que es una ventaja para la detección de múltiples ingredientes alergénicos. La concentración del ADN puede cuantificarse por la reacción de color enzima-sustrato. Sin embargo, este enfoque sólo puede considerarse semicuantitativo porque dicha

cuantificación se realiza al final de la reacción de PCR y no durante la fase de crecimiento exponencial, como en la qPCR (Poms *et al.*, 2004).

I.2.2.2. MLPA

La amplificación dependiente de ligasa de múltiples sondas (MLPA, *Multiplex Ligation dependent Probe Amplification*) fue descrita por Schouten *et al.* (2002), y está condicionada por un paso previo de ligación, que solo tiene lugar si la secuencia de ADN diana está presente en la muestra. Es una técnica capaz de detectar hasta 50 secuencias genómicas de ADN en una única reacción. Para ello, se diseñan dos hemi-sondas adyacentes de modo que una contenga el cebador directo y la otra el inverso. Uno de los cebadores estará marcado con un fluoróforo que permite su detección mediante electroforesis capilar. Además, las sondas poseen otro oligonucleótido que será responsable de hibridar con la secuencia diana. Asimismo, una de las dos hemi-sondas posee un fragmento de relleno que permite modificar la longitud de la sonda en función de las necesidades del experimento. Únicamente cuando las dos hemi-sondas han hibridado puede producirse la ligación en una etapa posterior, y solo las sondas ligadas se amplificarán durante la reacción de PCR, por lo que el número de productos de ligación de sonda es una medida del número de secuencias diana presentes en la muestra. Por tanto, la cantidad de producto de PCR es proporcional a la cantidad de ADN diana presente en la muestra.

La reacción de MLPA se divide en 5 etapas: 1) Desnaturalización del ADN e hibridación con las hemi-sondas MLPA; 2) reacción de ligación; 3) PCR; 4) separación de los productos amplificados mediante electroforesis capilar; 5) análisis de los datos (Figura I.9).

En las publicaciones de Ehlert *et al.* (2009) y Mustorp, Drømtorp y Holck (2011), aplicaron la técnica de MLPA para detectar múltiples alérgenos al mismo tiempo. El primero aplica la tecnología MLPA a la detección de cacahuets, anacardos, nueces, pistachos, avellanas, semillas de sésamo, nueces de macadamia, nueces, almendras y nueces de Brasil, alcanzando un LOD de 5 mg Kg⁻¹, mientras que los segundos emplean la técnica para la detección de sésamo, soja, avellana, cacahuete, altramuz, gluten, mostaza y apio, y su LOD fue de 10 mg Kg⁻¹, dependiendo del componente analizado. En nuestro grupo investigador, también se empleó la técnica MLPA para la detección de cereales en un modelo de pastel al que se añadieron experimentalmente diferentes niveles de cada una de las semillas de trigo, cebada, centeno y avena. En este caso, la técnica mostró una especificidad óptima frente a un número representativo de especies vegetales y animales y se logró un LOD de 50 mg Kg⁻¹ (García-García *et al.*, 2018). Asimismo, se empleó la MLPA para la detección

simultánea de ADN de girasol, amapola, lino, sésamo y soja en productos comerciales obteniendo un LOD de 10 mg Kg⁻¹ y específico frente a 50 especies animales y vegetales (López-Calleja *et al.*, 2017).

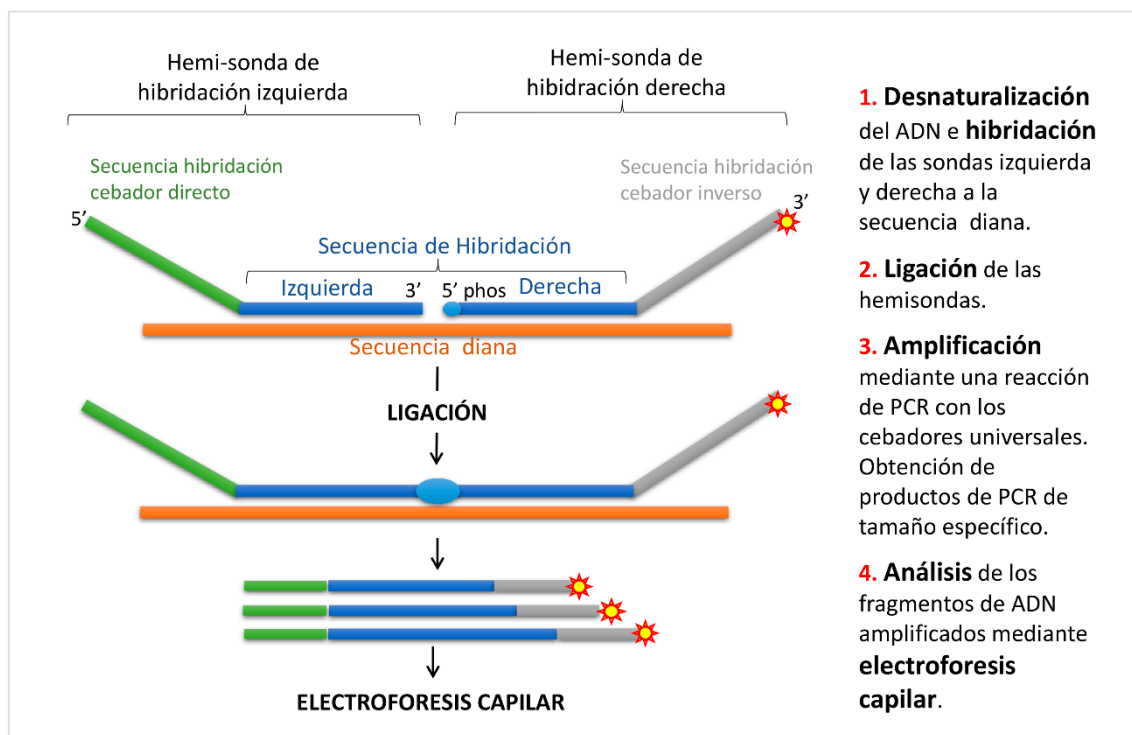


Figura 1.9. Esquema de la técnica de MLPA mediante hemisondas empleadas para la detección de secuencias específicas de ADN.

I.2.2.3. Biosensores de ADN

La detección de material alergénico en los alimentos mediante la tecnología de biosensores ha tenido poca repercusión en las aplicaciones basadas en anticuerpos. Sin embargo, tiene el potencial de desarrollarse para la detección de ADN o productos de PCR. En este sentido, se ha desarrollado un genosensor basado en principios electroquímicos para la detección de productos de PCR resultantes de la amplificación de los genes correspondientes a las principales isoformas de alérgenos de la avellana, Cor a 1.03 y Cor a 1.04 (Bettazzi *et al.*, 2008). Este dispositivo tiene varias ventajas, como la portabilidad, la rentabilidad y la disponibilidad. Por ejemplo, en el trabajo desarrollado por Sun *et al.* (2012) se utilizó un sensor electroquímico de ADN basado en una sonda marcada con 5'-SH y 3'-biotina, utilizada para la detección de un fragmento del gen Ara h 1 del cacahuete. En este caso, el biosensor se evaluó previamente con diferentes concentraciones del ADN diana y proporcionó un LOD de 0,35 fM. Finalmente, el biosensor de ADN se probó con un

extracto de ADN de una bebida láctea de cacahuete sin necesidad de una amplificación previa por PCR y dio una respuesta cuantitativa.

Tabla I.5. Ejemplos de aplicaciones de biosensores de ADN para el análisis de alimentos.

Electrodo	Inmovilización	Diana	LOD	Ref.
Oro	Uniones Au-S	Ara h 2	10 pM	López <i>et al.</i> , 2014
SPCE	Strep-MBs	Cor a 9	20 pg	Montiel <i>et al.</i> , 2017
Oro	Au-thiol	Ara h 1	0,35 fM	Sun <i>et al.</i> , 2012
Microbeads de poliestireno	Uniones NH ₂	Cacahuete, avellana y nuez	1,4 pM	Christopoulou, Karaïskou y Kalogianni, 2018
Carbón/Carbón/ Ag SPCEs	Esferas magnéticas	Sola I 7	0,2 pM	Pereira-Barros <i>et al.</i> , 2019
AuPd NWS/D-GQDs	Aerogel de grafeno	Ara h 1	4.7×10^{-23} M	Li <i>et al.</i> , 2018
Óxido de grafeno	Hairpin probes	Cacahuete y soja	1 nM	Yuan <i>et al.</i> , 2019

Los biosensores de ADN y los chips de genes son de gran interés debido a su potencial para obtener información específica de la secuencia de una manera más rápida, sencilla y barata en comparación con la hibridación tradicional. Además, cabe esperar que el interés por los sensores basados en el ADN aumente en un futuro próximo junto con la producción comercial de estos dispositivos y su uso generalizado (Tabla I.5). Sin embargo, la investigación básica sigue siendo necesaria para mejorar las tecnologías de los sensores, las estrategias de detección y los instrumentos y procedimientos analíticos (Kavita, 2017).

I.3. PRODUCCIÓN DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS *IN VITRO*

Las técnicas inmunológicas desarrolladas hasta ahora para el control de alérgenos presentes en los alimentos son muy utilizadas por las industrias y autoridades sanitarias, tienen algunas limitaciones, como la utilización de anticuerpos policlonales o monoclonales que requieren de animales de experimentación para su producción. El avance de técnicas de ingeniería genética ha permitido ofrecer alternativas innovadoras para la obtención de anticuerpos monoclonales que no requieran de la inmunización previa de animales.

La estructura básica de una inmunoglobulina (Figura I.10) tiene la forma característica de una "Y". Está constituida por dos cadenas peptídicas largas e iguales (H, pesadas) y dos cadenas peptídicas cortas e iguales (L, ligeras) interconectadas por varios puentes disulfuro.

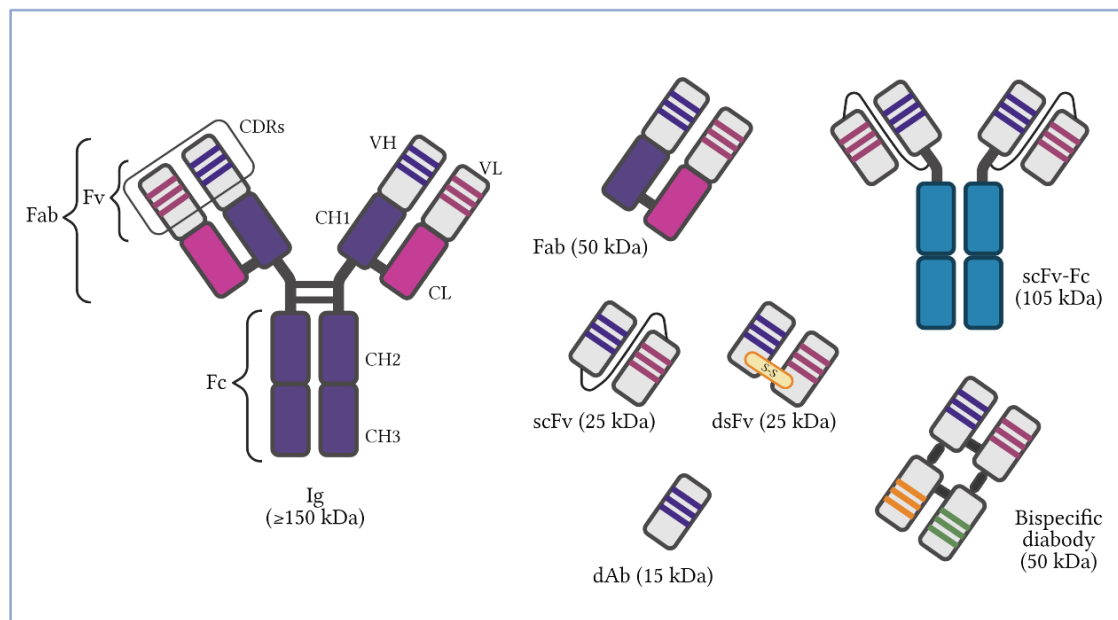


Figura I.10. Estructura básica de una inmunoglobulina (Ig), y de diversos tipos de fragmentos de anticuerpos: un fragmento de unión al antígeno (Fab), un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), fragmento variable estabilizado por enlace disulfuro (dsFv), fragmento variable de cadena pesada (dAbs), scFv unido a fragmento constante (scFv-Fc) y diabody o anticuerpos biespecíficos (bsAB). V_H , región variable de la cadena pesada; V_L , región variable de la cadena ligera; $CH1-3$, regiones constantes de la cadena pesada; CL , región variable de la cadena pesada. Las cadenas ligera y pesada, y las regiones Fab y Fc se encuentran unidas mediante puentes disulfuro, mientras que las cadenas ligera y pesada de los scFv lo están mediante un conector de serina y glicina.

Los vertebrados expresan cinco clases o isotipos de anticuerpos en función del tipo de cadena pesada que contengan: alfa (IgA), delta (IgD), épsilon (IgE), gamma (IgG) y mu (IgM) que presentan diferencias en el peso molecular, función y ubicación. Por otro lado, hay dos tipos de cadenas ligeras (κ y λ) y cada cadena ligera contiene un dominio variable (V_L) y un dominio constante (C_L). Las cadenas pesadas de la IgG contienen un dominio variable (V_H) y tres dominios constantes (C_{H1} , C_{H2} y C_{H3}). Si la estructura de la inmunoglobulina se somete a la acción de la enzima papaína, se divide por la zona de bisagra y separa el fragmento Fab (*Fragment antigen binding* o fragmento de unión al antígeno) del fragmento Fc o Fragmento de región cristalizable. El fragmento Fab determina la especificidad, la diversidad y la afinidad de la unión al antígeno (paratopo) y está formado por las regiones variables de las cadenas H y L (V_H y V_L), situadas en el extremo N terminal,

y la primera región constante (C_{H1} y C_L). Dentro de cada dominio V_H y V_L hay tres regiones hipervariables que reciben el nombre de regiones determinantes de la complementariedad (CDR, *Complementary Determining Regions*). Estas regiones hipervariables son las responsables del reconocimiento del antígeno y confieren a las inmunoglobulinas una gran especificidad y diversidad. Los dominios constantes de la región Fc (Fragmento de región cristalizante) son responsables de la formación de la estructura del anticuerpo y de sus funciones efectoras, así como de la determinación de la vida media *in vivo* de la inmunoglobulina (García-Merino, 2011; Weisser y Hall, 2009).

El uso de los primeros anticuerpos con fines terapéuticos se remonta a 1890 cuando Emil von Behring describió que la administración de suero de animales inoculados con pequeñas dosis de toxinas era capaz de neutralizar a éstas. Pero no fue hasta 1986 cuando se aprobó por la FDA el primer anticuerpo monoclonal murino, denominado muromonab, para el tratamiento del rechazo en pacientes transplantados, dirigido frente al antígeno CD3 que se expresa en la superficie de los linfocitos T (Langjahr y Sotelo, 2016).

En la primera mitad de la década de 1970, Milstein y Köhler investigaban en el laboratorio de biología molecular de Cambridge (Reino Unido) los mecanismos moleculares de la generación de la diversidad de los anticuerpos. Para ello, necesitaban producir una célula B inmortal con especificidad conocida para así poder analizar las mutaciones presentes en los genes de las inmunoglobulinas. Cuando fusionaron células de mieloma murino con células obtenidas del bazo de un animal inmunizado, consiguieron seleccionar solamente células híbridas (hibridomas) que pueden propagarse de manera indefinida en cultivo. Posteriormente, de entre todos los hibridomas, se seleccionaban los mejores clones para producir los anticuerpos monoclonales específicos de la diana. Su trabajo fue publicado en *Nature* y después recibieron el premio Nobel por este descubrimiento (García-Merino, 2011; Köhler y Milstein, 1975). La llegada de la tecnología del hibridoma ha sido fundamental para el desarrollo de la investigación y la comercialización de anticuerpos monoclonales, ya que proporcionó un potente método para producir anticuerpos definidos a nivel molecular, con calidad constante y en grandes cantidades contra cualquier tipo de antígeno (Ahmad *et al.*, 2012; Shim, 2017). Pero los anticuerpos monoclonales se enfrentan a varias dificultades para su aplicación clínica en personas, ya que su origen es exclusivamente murino y podrían generar anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA, *human anti-mouse antibody*) cuando se introducen en personas, provocando una rápida eliminación del anticuerpo monoclonal de la circulación sanguínea, lo que limita sus aplicaciones clínicas. Además, la tecnología de producción de anticuerpos monoclonales es lenta y laboriosa, y los ratones no siempre

proporcionan la respuesta de anticuerpos de alta afinidad frente a un antígeno concreto necesaria para el desarrollo de ensayos sensibles.

Para solventar estos problemas y teniendo en cuenta las características de las inmunoglobulinas, se recurrió a la ingeniería genética con el fin de obtener anticuerpos monoclonales recombinantes, es decir, de origen murino pero con porciones del anticuerpo reemplazadas por proteínas de origen humano. Así es como surgieron los anticuerpos monoclonales quiméricos (65-90 % de cadena humana) que permitieron disminuir la respuesta HAMA y aportaron nuevas funciones a los anticuerpos. Con el objetivo de producir anticuerpos con un alto porcentaje de secuencia humana, surgieron los anticuerpos monoclonales humanizados (90-95 % de cadena humana) donde las CDR de un anticuerpo murino se incorporan a un anticuerpo humano (Ahmad *et al.*, 2012; García-Merino, 2011; Langjahr y Sotelo, 2016; Shim, 2017). Más recientemente, se han desarrollado tecnologías que son capaces de generar anticuerpos completamente humanos, como el uso de ratones transgénicos en los que se introducen los genes de las inmunoglobulinas humanas (Lonberg, 2008), o mediante la tecnología de *Phage Display* (presentación de proteínas en la superficie de fagos filamentosos) que permite obtener anticuerpos monoclonales sin utilizar ratones (Hoogenboom y Chames, 2000).

I.3.1. Anticuerpos recombinantes

Los anticuerpos derivados de animales no han mejorado significativamente en los últimos 40 años. Tanto los anticuerpos policlonales como monoclonales son producidos a partir de inmunización animal, y tienen limitaciones tanto en la especificidad como en la reproducibilidad (Figura I.11).

Los anticuerpos policlonales reconocen varios epítopos de un solo antígeno y los anticuerpos monoclonales producen una única especie de anticuerpo. Sin embargo, los anticuerpos recombinantes son producidos por células transfectadas con ADN que codifica para un determinado anticuerpo. Por consiguiente, al tener una secuencia conocida, su afinidad y especificidad pueden ser definidas, es decir, aportan repetibilidad y reproducibilidad a los experimentos. Los anticuerpos recombinantes pueden ser de origen animal (por clonación del ADN de hibridomas o de repertorios genéticos de anticuerpos de células B de animales inmunizados), de origen humano (generados a partir de repertorios genéticos de anticuerpos de donantes humanos) o de origen sintético (a partir de genes sintéticos), que se transforman y expresan a gran escala en sistemas procariontes o

eucariotas, por ejemplo, en bacterias, líneas celulares de mamíferos o levaduras (Frenzel *et al.*, 2013).

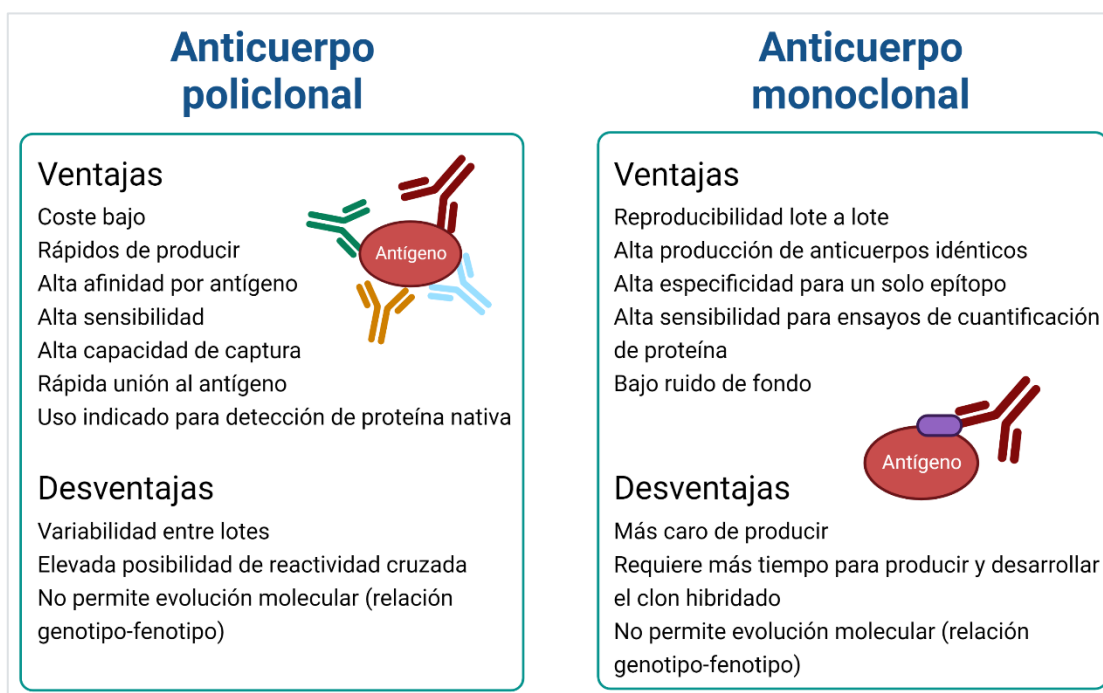


Figura I.11. Ventajas y limitaciones de los anticuerpos policlonales y monoclonales.

A partir de la generación de los anticuerpos recombinantes, se desarrollaron los anticuerpos no derivados de animales. Son anticuerpos derivados de repertorios de fragmentos de anticuerpos recombinantes generados *in vitro* sin utilizar en ningún momento la inmunización animal y pueden utilizarse en las técnicas habituales de análisis inmunológico, como *Western blot*, inmunohistoquímica, citometría de flujo, ensayos de inmunoabsorción, inmunoprecipitación, etc. Estos anticuerpos pueden ser idénticos en estructura a la inmunoglobulina G (IgG) completa, o pueden consistir en partes de un anticuerpo (Figura I.10), como el fragmento de unión al antígeno (Fab), fragmento variable de cadena única (scFv), fragmento variable de cadena única dimerizado por el dominio constante del fragmento (Fc)(scFv-Fc), fragmento variable estabilizado por enlace disulfuro (dsFv), diabody o anticuerpos biespecíficos (bsAB), fragmento variable de cadena pesada (V_H) derivado de camélidos (V_{HH}), receptor variable de antígeno derivado de tiburón (VNAR), entre otros (Kumar *et al.*, 2019; Ma y O’Kennedy, 2017).

Un scFv está compuesto por las regiones V_H y V_L unidas por un conector flexible (de entre 15-20 residuos de aminoácidos). Los scFv suelen producirse bien en sistemas bacterianos y son el formato preferido para los repertorios de presentación de anticuerpos

sobre fagos (*phage display*). El scFv es uno de los formatos de anticuerpos recombinantes más populares, debido a su pequeño tamaño (25-27 kDa), facilidad de penetración en los tejidos, corto tiempo de generación, capacidad de ser expresado en *E. coli*, alta afinidad por el antígeno y relativa estabilidad estructural (Ahmad *et al.*, 2012; Crivianu-Gaita y Thompson, 2016; Davies *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2015; Shim, 2017).

A principios de la década de 1990, el grupo de Hamers-Casterman descubrió que en el suero de especies de la familia Camelidae, había tres tipos de anticuerpos completamente funcionales (IgG1, IgG2 e IgG3). De ellos, las IgG2 e IgG3 carecían de la cadena ligera y suponían el 25-40 % del total de inmunoglobulinas séricas, dependiendo de la especie, lo cual denota su importancia en la respuesta inmune de estos animales (Arbabi-Ghahroudi, 2017; Blanc *et al.*, 2009; Hamers-Casterman *et al.*, 1993). En este tipo de anticuerpos, únicamente el dominio variable de la cadena pesada es el responsable del reconocimiento del antígeno, y esa afinidad no se ve disminuida con respecto a un anticuerpo convencional. Finalmente, se desarrollaron los denominados anticuerpos de dominio único dAbs (*single domain antibody*), que se caracterizan por presentar únicamente la región variable de la cadena pesada de los anticuerpos, y tener alta afinidad por los antígenos a pesar de ser muy pequeños (~12-15 kDa), con pesos moleculares de aproximadamente una décima parte de los anticuerpos monoclonales de tamaño completo (Davies *et al.*, 2000; Muyldermans, 2013; Shim, 2017). Las dos formas mejor estudiadas de dAbs son el V_{HH} (fragmentos de V_{HH}) y el VNAR (fragmentos de VNAR). Son versiones manipuladas de anticuerpos de solo cadena pesada, en las que el V_{HH} deriva de los HCABs de los camélidos y el VNAR de las inmunoglobulinas con nuevo receptor de antígenos (IgNAR) de los tiburones. Los V_{HH} y VNAR parecen tener una evolución convergente y contienen regiones CDR largas, a menudo más grandes que los anticuerpos humanos y murinos convencionales, lo que les permite penetrar más fácilmente en los sitios activos del antígeno diana (Flajnik *et al.*, 2011; Henry y MacKenzie, 2018).

Entre los anticuerpos de nueva generación que han demostrado un gran potencial como fármacos biológicos se encuentran los biespecíficos. Un anticuerpo biespecífico (BsAb) puede dirigirse y unirse simultáneamente a dos antígenos diferentes (o a diferentes epítomos del mismo antígeno) y, por tanto, proporcionar una mayor especificidad de unión. Los BsAbs han tenido un gran éxito en el campo de la inmunoterapia contra el cáncer (Kumar *et al.*, 2019; Nelson, 2010; Sedykh *et al.*, 2018).

Los anticuerpos recombinantes ofrecen numerosas ventajas con respecto a los anticuerpos convencionales (Kumar *et al.*, 2019; Ma y O'Kennedy, 2017; Manoutcharian

et al., 2016; Nelson, 2010; Wesolowski *et al.*, 2009). Entre las ventajas más destacables se encuentra una mayor reproducibilidad, debido a que las secuencias que los codifican están bien definidas, y la posibilidad de mejorar su afinidad y especificidad mediante la modificación de las condiciones experimentales para favorecer el aislamiento de los anticuerpos contra un determinado antígeno. Esto garantiza un suministro ilimitado de anticuerpos de la misma calidad, con idénticos perfiles de unión, aumentando la reproducibilidad de los experimentos científicos, a lo largo del tiempo y entre laboratorios, sin variación entre lotes. Además, la secuencia genética de un anticuerpo no derivado de animales puede modificarse para añadir multitud de características, incluyendo una variedad de formatos de anticuerpos y sistemas de detección (por ejemplo, fusión con moléculas marcadoras, enzimas, etc.). La posibilidad de añadir un sistema de detección tiene la ventaja de disminuir la necesidad de anticuerpos secundarios marcados. También cabe destacar la disminución del tiempo y la facilidad para una conversión del isotipo del anticuerpo a un formato más conveniente. Pero la ventaja principal y más novedosa es que se pueden producir anticuerpos recombinantes sin utilizar ningún animal, como se ha mencionado anteriormente.

La aplicación de los anticuerpos recombinantes en biomedicina se está volviendo cada vez más común debido a la alta especificidad, sensibilidad y estabilidad de este tipo de sondas de afinidad y su fácil optimización mediante modificaciones genéticas y químicas (Ma y O'Kennedy, 2017). En la actualidad se estudia cómo los scFv, dAbs y BsAbs pueden emplearse en modelos preclínicos de cáncer, así como en enfermedades infecciosas y autoinmunes, y muchos de ellos comienzan a emplearse como terapéuticos en enfermedades neurodegenerativas (Manoutcharian *et al.*, 2016). Desde la aparición de la pandemia de COVID-19, la aplicación de la tecnología de anticuerpos recombinantes ha tenido un auge extraordinario. Se han desarrollado rápidamente multitud de anticuerpos recombinantes anti-SARS-CoV-2 a partir de genotecas de fragmentos de anticuerpos, que son capaces de neutralizar al virus o reconocer la proteína *spike* del virus, y se han utilizado en procedimientos de diagnóstico y de tratamiento para frenar la pandemia actual (Bertoglio *et al.*, 2021; Lei *et al.*, 2020; Ren *et al.*, 2020; Sridharan *et al.*, 2020).

En el campo del análisis de alimentos, los anticuerpos empleados para la detección de alérgenos proceden mayoritariamente de la inmunización de animales con extractos proteicos de la especie de interés o con los alérgenos purificados y conjugados con una proteína portadora. A partir de los animales inmunizados se puede obtener el suero con anticuerpos policlonales o bien linfocitos B del bazo para la generación de hibridomas que

produzcan anticuerpos monoclonales. Se calcula que solo en la Unión Europea se utilizan cada año cerca de un millón de animales para el desarrollo y la producción de anticuerpos (Barroso *et al.*, 2020). Russell y Burch en 1959, propusieron una nueva ciencia aplicada que mejorara el trato a los animales de laboratorio y, al mismo tiempo, mejorara la calidad de la ciencia en los estudios que utilizan animales. Introdujeron y definieron los términos de reducción, refinamiento y reemplazo, formulado como “el principio de las tres erres” para minimizar el potencial de dolor y angustia de los animales en la investigación biomédica (Russell y Burch, 1960). La necesidad de una evolución bioética en la investigación se ve reflejada en la Directiva 2010/63/UE, de la UE, traspuesta a la legislación española a través del Real Decreto 53/2013 sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos, no permitiendo el uso de métodos basados en animales cuando existen otros métodos alternativos que permitan obtener los resultados buscados (Barroso *et al.*, 2020; Ministerio de la Presidencia, 2013; Parlamento Europeo, 2010; Tannenbaum y Bennett, 2015). En 2018, el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para alternativas a la experimentación animal (EURL ECVAM) pidió a su comité científico asesor (ESAC, *EURL ECVAM Scientific Advisory Committee*) que revisara la validez científica de los anticuerpos no derivados de animales generados por *phage display* utilizados para la investigación y su aplicación en ámbitos reglamentarios y de diagnóstico (European Commission y Joint Research Centre, 2018). En su revisión, el ESAC concluye que los anticuerpos no derivados de animales son unos reactivos bien caracterizados, generados por una tecnología probada, que no solo son equivalentes a los producidos en animales, sino que además ofrecen importantes ventajas tanto desde el punto de vista científico como económico. Por lo tanto, los anticuerpos recombinantes pueden reemplazar a los anticuerpos derivados de animales en la gran mayoría de aplicaciones, además de mejorar la reproducibilidad científica y tener un impacto social positivo. El EURL ECVAM recomienda que no se utilicen más animales para el desarrollo y la producción de anticuerpos para la investigación, la regulación, el diagnóstico y las aplicaciones terapéuticas y que los países de la UE bajo la directiva 2010/63/EU no deberían autorizar el desarrollo y producción de anticuerpos mediante inmunización animal (Barroso *et al.*, 2020). A partir de este momento, aparecieron dos posturas en la comunidad científica. Por una parte, aquellos que apoyan la recomendación del ESAC, afirmando que es una nueva era donde queda demostrada la valía de los anticuerpos generados sin inmunización animal como los desarrollados en tiempo récord contra el SARS-CoV-2 para contrarrestar la propagación del virus (Gray *et al.*, 2020). Por otra parte, aquellos que alegan que los documentos presentados contienen percepciones distorsionadas de las posibilidades actuales de los anticuerpos no derivados de animales, y

que se necesita una mayor validación científica (González-Fernández *et al.*, 2020). A esta postura se suma la Sociedad Española de Inmunología (SEI, 2020) que considera que la tecnología de hibridomas es todavía necesaria para el desarrollo de las ciencias biomédicas y que se necesita potenciar el desarrollo de métodos alternativos en paralelo, sin bloquear la tecnología actual. Entre sus argumentos mencionan que aún es necesario un repertorio universal de fago-anticuerpos, que estos repertorios presentan limitaciones para generar anticuerpos frente a virus, que presentan menor afinidad y especificidad, así como que esta tecnología es más cara y requiere de experiencia y laboratorios diseñados para este fin. Además, señala que para la obtención de los hibridomas, el único paso que requiere el uso de animales es la fase de inmunización.

I.4. PRESENTACIÓN DE ANTICUERPOS EN FAGOS (*PHAGE DISPLAY*)

La presentación de anticuerpos en fagos o *phage display* es una técnica que permite la selección de anticuerpos de alta afinidad y especificidad. La producción de anticuerpos monoclonales para investigación y uso clínico está estrechamente relacionada con el desarrollo de esta tecnología, descrita inicialmente por Smith en 1985 y desarrollada posteriormente por otros grupos, como los de Winter, McCafferty, Lerner y Barbas. Desde entonces, esta tecnología se ha utilizado ampliamente para la investigación y el desarrollo de anticuerpos en todo el mundo, dando lugar a numerosos anticuerpos que han llegado a ser usados con fines terapéuticos y diagnósticos. Por el desarrollo de la tecnología de presentación en fagos, George P. Smith y Sir Gregory P. Winter fueron galardonados con el Premio Nobel de Química en 2018 (Kumar *et al.*, 2019). Esta tecnología se basa en la ingeniería genética de los bacteriófagos y en la presentación al antígeno de interés, en repetidas rondas de selección, de un repertorio policlonal de fragmentos de anticuerpos (con hasta 10^{11} clones diferentes) que se expresan en la superficie de un fago filamentoso que lleva integrada la secuencia genética del fragmento exhibido. Esta técnica facilita en gran medida la producción recombinante de reactivos para su uso en investigación y diagnóstico clínico, así como para productos farmacéuticos de uso terapéutico en humanos. El primer anticuerpo monoclonal totalmente humano obtenido mediante *phage display* fue Adalimumab (Humira), un monoclonal anti-TNF usado como tratamiento de la artritis reumatoide (Lee *et al.*, 2007; Lorenz, 2002; Shim, 2017).

La tecnología de presentación en fagos permite un mayor control sobre el proceso de selección. Por ejemplo, en las primeras etapas del proceso se permite la predefinición de muchas propiedades bioquímicas y biofísicas finales de los anticuerpos a través de la

elección de determinados antígenos. Se puede empezar directamente con los repertorios *naïve*, sintéticos y semisintéticos existentes. La mayor ventaja de esta tecnología es que se pueden identificar sondas que reconocen al antígeno diana independientemente de sus propiedades inmunogénicas. Esto no es posible en otras técnicas de aislamiento de anticuerpos (Kumar *et al.*, 2019). Además, a diferencia de la tecnología de hibridomas, la presentación en fagos permite la selección de multitud de anticuerpos frente a un gran número de dianas moleculares tanto biológicas y como no biológicas (incluidos autoantígenos y toxinas), evitando por completo el uso de animales vivos. Por otra parte, como esta tecnología se lleva a cabo *in vitro*, las condiciones de selección y cribado pueden controlarse mejor. Por ejemplo, pueden incluirse moléculas competidoras para dirigir la selección a dianas específicas, y debido a que utiliza cultivos microbianos, los protocolos son más sencillos. Otra ventaja añadida de la expresión en fagos es la posibilidad de incluir nuevos dominios o epítomos que confieran a los fragmentos de anticuerpos propiedades específicas, por ejemplo, la unión a moléculas que permitan su purificación o incrementen su sensibilidad en diversas técnicas analíticas (Bitencourt *et al.*, 2020; Skerra y Plückthun, 1988).

Estas características hacen de la presentación en fagos o *phage display* una herramienta poderosa para comprender mejor los procesos inmunológicos y las enfermedades humanas que implican la formación de anticuerpos contra antígenos definidos (Hammers y Stanley, 2014). Esta tecnología requiere de la expresión de un amplio repertorio de péptidos o fragmentos de anticuerpos en la superficie de partículas víricas que conforman la genoteca creada. El vector más comúnmente utilizado para la generación de repertorios de fragmentos de anticuerpos recombinantes con gran variabilidad ha sido el fago filamentoso M13 (Ståhl *et al.*, 2013).

I.4.1. Fago Filamentoso M13

El bacteriófago o fago filamentoso M13 es el vector de expresión más utilizado en la construcción de genotecas de fragmentos de anticuerpos recombinantes. Pertenece a la familia de los colifagos Ff. Infecta específicamente a células gram-negativas como *E. coli*, mediante ciclos de replicación no líticos, debido a que son portadoras del plásmido conjugativo denominado factor F-pilus o factor de fertilidad. El fago M13 (Figura I.12) está compuesto por una molécula de ADN monocatenario y circular de 6-7 Kb de longitud y una cápside de estructura cilíndrica de aproximadamente 7 nm de ancho y 900 nm de longitud, donde intervienen 5 proteínas diferentes (pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX). La cubierta cilíndrica

donde se aloja el ADN está constituida en gran medida por 2700 copias de la proteína pVIII. El resto de las proteínas se localizan en los extremos del fago, donde aparecen 3-5 copias de cada una, agrupándose en un extremo las proteínas pIII y pVI, y en el otro extremo las proteínas pVII y pIX (Berkowitz y Day, 1976; O'Callaghan *et al.*, 1973; Rasched y Oberer, 1986).

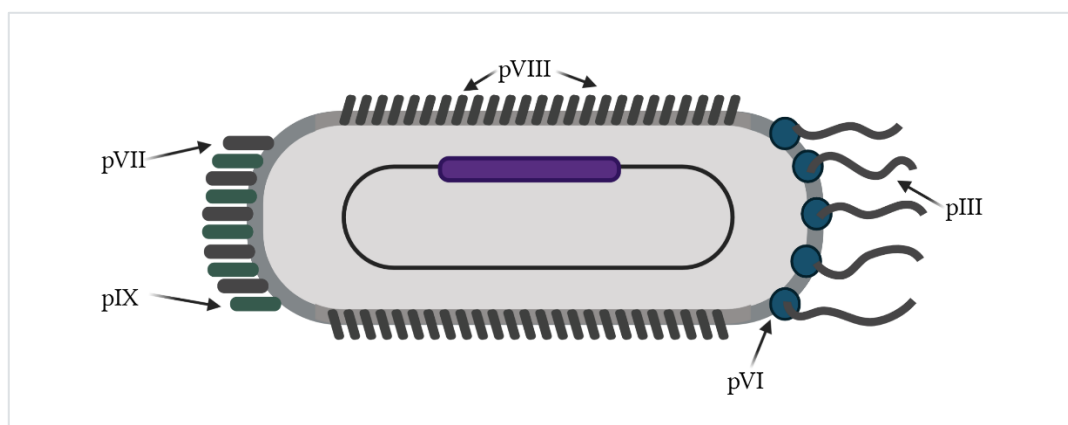


Figura I.12. Representación esquemática del fago M13 con la localización de las cinco proteínas de superficie (pIII, pVI, pVII, pVIII, pIX).

La infección de *E. coli* por el bacteriófago M13 comienza con la adhesión del fago a la bacteria mediante la interacción entre la proteína minoritaria de cubierta pIII y el pilus F de la bacteria (Figura I.13). Más concretamente, el dominio N2 de pIII en un extremo del bacteriófago interactúa con el pilus. Esto desencadena la retracción del pilus, lo que hace que pIII entre en contacto con TolA y actúe de correceptor en la membrana interna de la bacteria. Tres proteínas Tol están presentes en *E. coli*; TolA, TolR y TolQ, y todas son esenciales para la infección al mediar la despolimerización de la cubierta del fago y la translocación del ADN en la bacteria. Posteriormente, la pIII se inserta en la membrana interna y el ADN del fago se libera en el citoplasma del hospedador al tiempo que se desprende de la proteína de cubierta principal, pVIII (Karlsson *et al.*, 2003; Ledsgaard *et al.*, 2018; Rakonjac *et al.*, 1999; Shim, 2017).

El ADN del fago permanece latente hasta que se replica dentro de la bacteria donde se expresan sus proteínas, que o bien forman la cápside proteica del fago M13 o bien desempeñan un papel en la replicación, el ensamblaje o la secreción del bacteriófago. Este tipo de bacteriófago nunca va a integrar su genoma en el cromosoma del hospedador, sino que mantiene su ADN estable en forma de plásmido y se convierte directamente en forma replicativa, produciendo cientos de partículas víricas en una sola célula sin necesidad de replicación celular. El bacteriófago M13 no es lítico, es decir, cuando se alcanzan entre las

100-200 copias de ADN, la replicación se detiene y se continúa con el ensamblaje de las nuevas partículas de fago replicadas en la membrana bacteriana. El genoma se recubre de la cápside proteica y escapa de la bacteria huésped sin lisarla, por lo que continúa el crecimiento celular, aunque las bacterias infectadas muestran una tasa de crecimiento más lenta que las no infectadas (Loh *et al.*, 2019; Pande *et al.*, 2010).

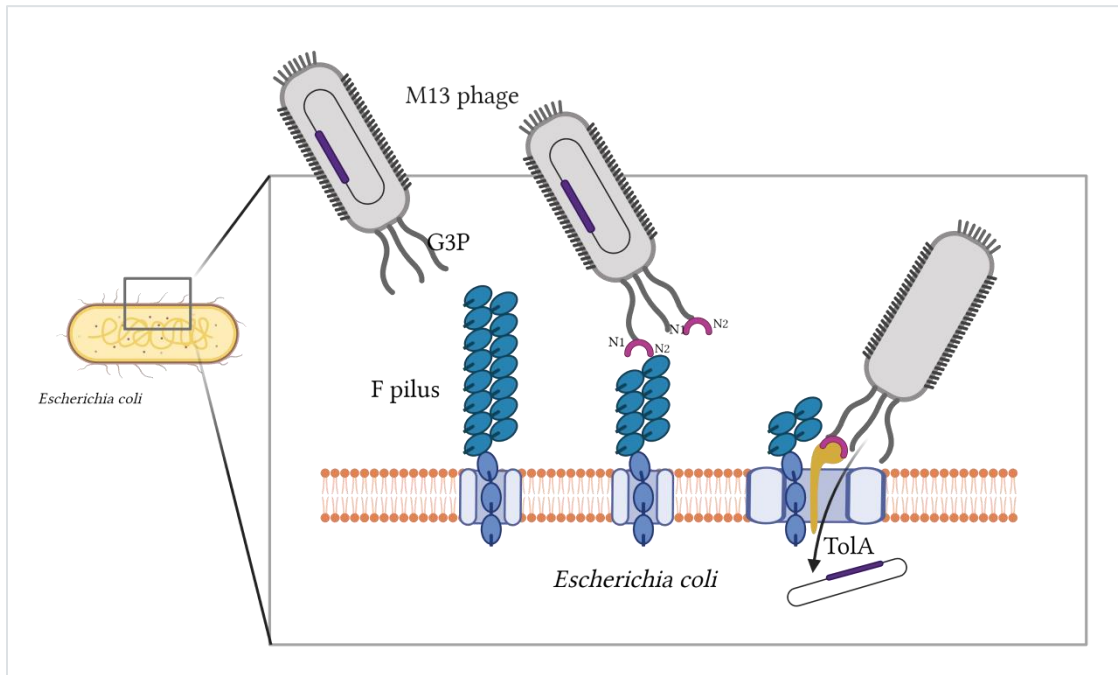


Figura I.13. Representación esquemática del proceso de infección de *E. coli* por el fago M13 durante la tecnología de phage display. Elaboración propia adaptada de Ledsgaard *et al.*, 2018.

Por lo tanto, una de las ventajas es que las genotecas de fagos basadas en M13 pueden almacenarse como reservas de *E. coli* congeladas antes, durante o después del proceso de selección por afinidad (*biopanning*), lo que ofrece opciones de manipulación y almacenamiento más sencillo que otros sistemas basados en fagos líticos. Otra ventaja del bacteriófago M13 como plataforma para el desarrollo de genotecas de anticuerpos es que es muy estable y puede soportar altas temperaturas, almacenamiento prolongado, desecación, condiciones ácidas o tratamientos desinfectantes (Branston *et al.*, 2013). Por otra parte, existe una limitación en el tamaño de la proteína recombinante a expresar en la superficie de este fago, debido a que pueden interferir en el ensamblaje de los viriones o en la infección de la bacteria. Por ello, cuando se trata de expresar un fragmento de anticuerpo mediante *phage display* se recurre al uso de fagémidos (Adda *et al.*, 2002; Sidhu, 2001; Smith y Petrenko, 1997).

El fagémido contiene el origen de replicación tanto de la bacteria como del fago, la señal de empaquetamiento del fago, y la secuencia de la proteína recombinante que se quiere

expresar fusionada a la secuencia de la proteína pIII, así como un gen de resistencia a antibióticos. Su uso permite una fácil preparación y mantenimiento del vector, un alto rendimiento de ADN de doble cadena y mejores tasas de transformación (Georgieva y Konthur, 2011). Pero carece de los genes que codifican para las proteínas estructurales del fago y que le permiten empaquetar el ADN dentro de él. Por esta razón, tras la producción de grandes cantidades de la proteína recombinante expresada, se utiliza el fago auxiliar M13K07 o fago *helper*, el cual posee una señal de empaquetamiento defectiva y un gen de resistencia a antibióticos diferente al del fagémido. Cuando las células que contienen el fagémido se infectan con M13K07, la proteína pII (de replicación) producida por los genes del M13K07 reconoce como secuencia de origen de fago a la que se encuentra presente en el fagémido, por lo que en consecuencia es capaz de replicarse y de empaquetarse junto con las nuevas proteínas estructurales codificadas por el fago auxiliar. La señal de empaquetamiento defectiva que presenta el fago auxiliar permite el vínculo físico entre el genotipo codificado por el fagémido y el fenotipo mostrado por el M13K07. Por lo tanto, el fago resultante es un virión híbrido que lleva una mezcla de proteínas de cubierta procedentes del fago auxiliar y de pocas copias de proteínas de fusión unidas a la proteína recombinante (Bratkovič, 2010; Vieira y Messing, 1987). Dado que el fago auxiliar posee un gen de resistencia a antibióticos diferente al fagémido, esto permitirá la selección exclusiva de aquellas bacterias que hayan adquirido la información genética proporcionada por ambos.

I.4.2. Selección por afinidad (*Biopanning*)

A partir de una genoteca de miles de millones de anticuerpos recombinantes expresados en la superficie de fagos filamentosos se pueden seleccionar aquellos que tengan afinidad por una molécula diana específica mediante un procedimiento de selección llamado *biopanning* o selección por afinidad (Figura I.14).

La principal ventaja de la tecnología de presentación en fagos es que a partir de un gran número de clones diferentes se pueden seleccionar fragmentos de anticuerpos específicos de forma sencilla y rápida. Además, dado que los fagos seleccionados pueden amplificarse mediante propagación en *E. coli*, se pueden realizar múltiples rondas de *biopanning* para reducir la selección a aquellas secuencias que tienen una unión más fuerte y específica a la molécula diana. La posible falta de detección de fago-anticuerpos específicos después de varias rondas de selección puede ocurrir si la estrategia empleada no es la correcta o si la genoteca de los anticuerpos utilizada no está bien generada o no tiene suficiente diversidad.

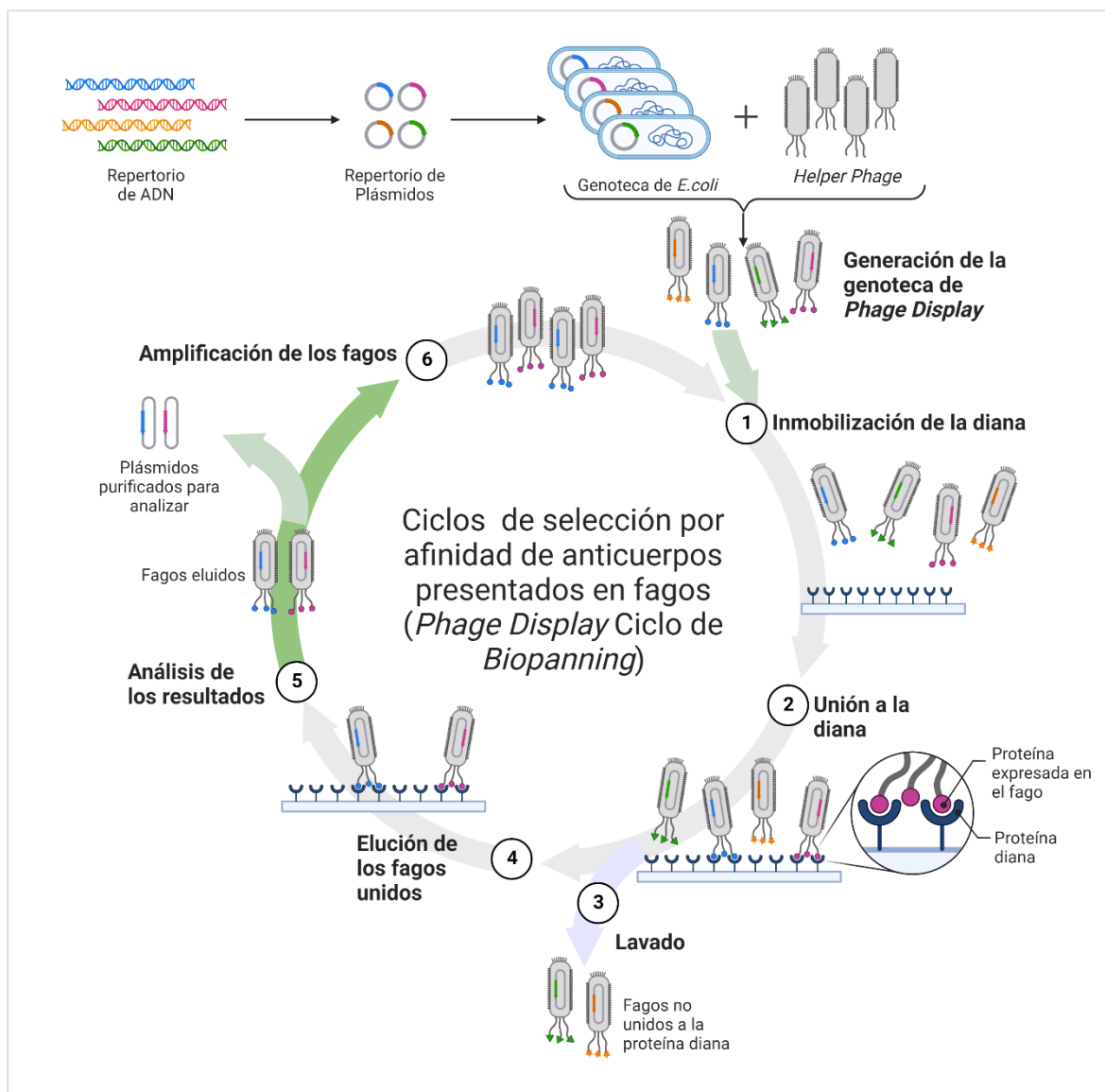


Figura I.14. Representación del proceso de obtención de la genoteca de anticuerpos expresados en fagos (phage display) y de los ciclos de selección por afinidad (biopanning), consistente en un paso de incubación de la genoteca de fago-anticuerpo con la proteína diana, eliminación de los fagos no unidos, elución de los fagos unidos y amplificación de los fagos en *E. coli*, antes de realizar otro ciclo. Después de 3-5 ciclos se lleva a cabo la etapa de postselección.

Es un proceso que requiere de gran paciencia, y en ocasiones se necesitan varios intentos antes de tener éxito. Inicialmente es muy importante elegir adecuadamente la estrategia de *biopanning* que se llevará a cabo, así como una buena calidad de genoteca. Finalmente, entre todos los elementos a considerar para una exitosa selección de fagos se incluyen, cómo inmovilizar el antígeno, en qué cantidad, cuántas rondas de selección y cómo eliminar los fago-anticuerpos no específicos. Por ello se establecen las siguientes etapas en el proceso de selección por afinidad (Adda *et al.*, 2002; Menendez y Scott, 2005; Pande *et al.*, 2010; Smith y Petrenko, 1997):

1) Inmovilización de la diana.

2) Unión de fagos: la genoteca de fagos se añade al sitio donde se encuentra la diana en una solución que permite la estabilidad de la diana y una mínima unión no específica del fago. Es importante comenzar la primera ronda con un repertorio (genoteca) grande y muy diverso para tener más posibilidades de aislar fagos de interés.

3) Eliminación de los fagos no unidos: para evitar las uniones inespecíficas y aislar fagos con mayor afinidad, los lavados son estrictos.

4) Elución de los fagos: la elución específica del fago unido a la diana puede llevarse a cabo en una solución con pH extremos, desnaturalizantes, fuerza iónica, proteólisis limitada o sonicación.

5) Identificación mediante secuenciación de ADN de los clones infectados con los fagos eluidos y análisis de los resultados.

6) Amplificación de los fagos seleccionados y repetición del proceso de *biopanning* entre 3 y 6 veces para enriquecer la genoteca con los clones de mayor afinidad por el antígeno.

Tras finalizar el proceso de selección, los clones de fagos elegidos son analizados mediante ELISA para comprobar la capacidad de unión del fago frente al antígeno diana y los clones seleccionados son nuevamente secuenciados para corroborar la secuencia nucleotídica que codifica para los fragmentos de anticuerpos de interés.

I.4.3. Genotecas de scFv y dAb

Los repertorios (genotecas) de anticuerpos pueden obtenerse principalmente por dos métodos, ya sea a partir de secuencias de anticuerpos codificados en el ARNm de las células B de donantes animales o humanos inmunizados o no inmunes, o generadas sintéticamente utilizando secuencias de nucleótidos aleatorios dentro de las CDR (regiones determinantes de la complementariedad) seleccionadas, en combinación con una o múltiples regiones marco para replicar la diversidad de un repertorio natural de anticuerpos (Conrad y Scheller, 2005). La generación de genotecas es un proceso largo y delicado, en el que todos los reactivos de PCR y muestras deben manipularse y almacenarse con precaución, evitando contaminaciones con otras fuentes de ADN y favoreciendo la eliminación de DNAsas (Ma y O'Kennedy, 2017). Las genotecas sintéticas y semisintéticas consisten en secuencias sintéticas o en una mezcla de secuencias sintéticas y naturales, respectivamente. La especificidad de los anticuerpos para reconocer al antígeno se basa principalmente en las regiones CDR del gen de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos. La CDRH3 es más diversa en composición (10^{23} posibles secuencias) y longitud (6-24 aminoácidos) y juega

un papel importante en el sitio de unión al antígeno y en su reconocimiento (Kumar *et al.*, 2019). En las genotecas sintéticas las CDR se insertan directamente, mientras que en las semisintéticas se realizan mutaciones aleatorias o dirigidas en la CDR3, mediante métodos basados en PCR o por mutación de las 6 CDRs y clonando en una cadena molde de anticuerpo.

Un repertorio típico de anticuerpos comprende una enorme diversidad de especificidades de unión a antígenos, que se generan por los procesos genéticos de recombinación y mutación. Desde 1990, se han empleado diferentes formatos de anticuerpos para la construcción de genotecas de fago-anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos humanos como los mostrados en la Figura I.10. Por lo general, estos fragmentos de anticuerpos se fusionan con la G3P del fago M13 y mediante la clonación de un gran número de genes que codifican un fragmento de anticuerpo, se pueden generar grandes genotecas de anticuerpos de las que se pueden seleccionar muchos anticuerpos diversos (Kanyavuz *et al.*, 2019; Ledsgaard *et al.*, 2018). Como ejemplo, Schofield *et al.* seleccionaron con éxito más de 7200 anticuerpos recombinantes contra 292 antígenos a partir de un repertorio de scFv humanos que contenía $1,1 \times 10^{10}$ clones (Schofield *et al.*, 2007).

En la genoteca Tomlinson I, desarrollada por el laboratorio del Dr. Greg Winter en el MRC *Laboratory of Molecular Biology* (Cambridge, Reino Unido), los fagos expresan anticuerpos recombinantes humanos de tipo scFv, constituidos por un único polipéptido que contiene los dominios V_H (V3-23/DP-47) y V_K (O12/O2/DPK9) unidos mediante un conector flexible de glicina y serina. La región CDR3 está diseñada para tener la mínima longitud (7 residuos de aminoácidos) pero manteniendo la capacidad de unión al antígeno. La variabilidad se introduce con las regiones CDR2 y CDR3, mientras que la secuencia de la región CDR1 se mantiene constante. De este modo, las genotecas de fragmentos de anticuerpos de tipo scFv consisten en combinaciones aleatorias de regiones variables de las cadenas ligera y pesada de anticuerpos, que presentan una gran diversidad, y que se expresan como proteínas de fusión a una de las proteínas estructurales del fago M13, normalmente la proteína pIII (Hoogenboom, 2005). Estas genotecas *naïve* están constituidas por unos 10^8 clones diferentes de fagémidos, obtenidos a partir de linfocitos B de donantes humanos no inmunizados, a partir de los que, mediante transcripción inversa y amplificación por PCR, se obtuvieron los genes de la región variable de las cadenas ligera y pesada de las inmunoglobulinas, que posteriormente se subclonaron en el fagémido pIT2 que posee el gen de resistencia a ampicilina. Los fagémidos se encuentran transformando células de *E. coli* de la cepa TG1 (K12Δ (lac-proAB) supE thi hsdD5/F' traD36 proA+B lacIq

lacZ M15). El fago ayudante que emplea es el KM13, que posee resistencia a kanamicina (Goletz *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2007; Tomlinson *et al.*, 1992).

El repertorio de anticuerpos de dominio único dAb creado por MRC *Laboratory of Molecular Biology* (Christ *et al.*, 2006) se basa en la secuencia un dominio V_H (DP47) humano aislado, denominado HEL4, con propiedades similares a las de los dominios V(HH) (Jespers, Schon, James, *et al.*, 2004). HEL4 es altamente soluble a concentraciones de ≥ 3 mM, esencialmente monomérico y resistente a la agregación inducida por el calor a concentraciones de hasta 56 μ M. La genoteca procede de la cadena pesada V_H V3-23 y presenta diversidad sintética introducida por mutagénesis de PCR en CDR1, CDR2 y CDR3 y está clonada en formato de fago. El repertorio ha sido diseñado y expresado en el vector fagémido pR2 con los marcadores MYC y VSV y resistencia a ampicilina, para resistir la agregación inducida por el calor en los fagos y se ha demostrado que contiene sondas de unión a antígenos que se repliegan sin pérdida importante de la afinidad tras el enfriamiento (Christ *et al.*, 2006, 2007; Famm *et al.*, 2008; Jespers, Schon, Famm, *et al.*, 2004). Por tanto, las genotecas de tipo dAb contienen una gran diversidad de las tres CDRs y se expresan como proteínas de fusión a la proteína pIII del fago (Hoogenboom, 2005). Estas genotecas *naïve* están constituidas por unos 10^9 clones diferentes de fagémidos (Lee *et al.*, 2007). Al igual que las genotecas de scFv, la genoteca de dAb se encuentra transformada en células de *E. coli* de la cepa TG1 (K12 Δ (lac-proAB) supE thi hsdD5/F' traD36 proA+B lacIq lacZ M15) y el fago ayudante para la fase de infección de *phage display* es el KM13, que posee resistencia a kanamicina.

Ambas genotecas tienen la peculiaridad de que tras el proceso de *biopanning* y la realización de los lavados, los fagos se eluyen mediante la digestión con tripsina. La tripsina escinde el péptido de la región de la etiqueta de c-Myc que existe entre el anticuerpo y la proteína pIII del fago, eliminando además, el ruido de fondo provocado por la presencia del fago ayudante M13, ya que éste sí es sensible a la tripsina, y al digerirse pierde la capacidad infectiva (Kristensen y Winter, 1998).

I.5. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES

Hay muchas opciones de sistemas para la expresión de anticuerpos recombinantes, entre las que se incluyen, bacterias, líneas celulares de mamíferos, células de insectos, plantas, levaduras y hongos filamentosos. Generalmente, las proteínas de más de 100 kDa se expresan en sistemas eucariotas y las proteínas de menos de 30 kDa se expresan en

sistemas procariotas. A veces se requieren modificaciones postraduccionales para la expresión de anticuerpos recombinantes (por ejemplo, anticuerpos terapéuticos) para minimizar la inmunogenicidad del anticuerpo. En ese caso, se pueden seleccionar líneas celulares de mamíferos, células de insectos, levaduras y plantas transgénicas como sistemas de expresión de anticuerpos recombinantes. El sistema más ampliamente utilizado es el de levaduras metilotróficas como *Pichia pastoris*, ya que alcanza rendimientos muy altos en la producción extracelular, del orden de gramos por litro (de la Cruz *et al.*, 2015). Cuando se producen proteínas recombinantes, el primer paso consiste en clonar la secuencia de ADN e introducirla en el sistema de expresión elegido para su traducción. En el proceso de elección de un sistema de expresión, se deben considerar una serie de factores, como el tamaño, la calidad, función, velocidad de producción y rendimiento de la proteína, así como de la pureza y cantidad requeridas del producto final.

El sistema bacteriano de expresión es el elegido mayoritariamente para la expresión de anticuerpos recombinantes pequeños no glicosilados, como scFvs y dAbs. En comparación con otros sistemas, los bacterianos como *E. coli* tienen un sistema de producción más rápido y sencillo, llegando a alcanzar concentraciones de producción considerables, pero no es capaz de glicosilar las proteínas, por lo que, si se requiere la glicosilación para la fusión de proteínas a los anticuerpos recombinantes, este sistema no es una buena elección. En el año 1988, se realizó la primera producción de anticuerpos recombinantes funcionales al espacio periplásmico de *E. coli*, donde se produjo la secreción del Fv y la correcta formación de los enlaces disulfuro y correcto ensamblaje por el entorno oxidante (Frenzel *et al.*, 2013; Skerra y Plückthun, 1988). Los fragmentos de anticuerpos solubles pueden expresarse en el sobrenadante del cultivo, en el periplasma bacteriano y/o en el interior del citoplasma bacteriano. Aunque la secreción de los anticuerpos recombinantes en el medio de cultivo o la extracción de éstos del periplasma por choque osmótico proporciona un menor rendimiento global, el entorno oxidativo fuera del citoplasma celular confiere la formación adecuada de los enlaces disulfuro necesarios para el plegado natural de los dominios de los anticuerpos, además de obtenerse una alta concentración de anticuerpo prácticamente puro (Rajput *et al.*, 2014; Weisser y Hall, 2009). Los anticuerpos expresados en grandes cantidades en el citoplasma celular suelen dar lugar a la formación de cuerpos de inclusión y a la agregación de anticuerpos (Guo *et al.*, 2003). Alternativamente, la expresión puede dirigirse al entorno oxidante del espacio periplásmico, bajo la regulación de la secuencia líder pelB (Padiolleau-Lefèvre *et al.*, 2006), o al sobrenadante del cultivo utilizando el sistema de α -hemolisina (HlyA) de *E. coli*. El sistema HlyA es un aparato secretor de tipo I que forma un canal proteico entre las membranas interna y externa de *E. coli* a través del

cual se secreta la toxina hemolisina. Este sistema ha demostrado ser competente en la secreción de híbridos proteicos heterólogos, incluyendo scFv (Fernández *et al.*, 2000). También existen otras bacterias gram-negativas como *Proteus mirabilis* o *Pseudomonas putida* donde los rendimientos de producción de scFv fueron de 12 y 3,6 mg mL⁻¹ respectivamente (Dammeyer *et al.*, 2011; Rippmann *et al.*, 1998).

Las bacterias gram-positivas secretan directamente la producción de los anticuerpos recombinantes debido a que les falta la membrana externa y ya se han utilizado con éxito *Bacillus brevis*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium*. Además, esta última no produce proteasas alcalinas y confiere una alta estabilidad a los vectores plasmídicos durante el crecimiento, lo que permite la expresión estable de transgenes durante el cultivo a largo plazo en biorreactores. También se han utilizado como organismos de producción los lactobacilos, considerados como generalmente seguros (GRAS). Este estatus GRAS de los lactobacilos permite su uso directo para la aplicación oral, por ejemplo, para la producción de fragmentos de anticuerpos anti-*Streptococcus mutans* para prevenir la caries dental (Frenzel *et al.*, 2013; Krüger *et al.*, 2002; Vary, 1994).

La producción de anticuerpos en levaduras y hongos ofrece la rentabilidad y efectividad de *E. coli* combinadas con las ventajas de la expresión eucariótica, incluyendo el procesamiento, el plegado y las modificaciones postraduccionales de la proteína, con una glicosilación similar a la humana. Además, la proteína se expresa en el sobrenadante del cultivo, lo que permite una purificación más rápida y sencilla. Asimismo, la proteína purificada contiene menos endotoxinas contaminantes en comparación con las bacterias, ya que suelen expresarse en forma soluble en las levaduras. Entre las levaduras más empleadas se encuentran *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Kluyveromyces lactis*, y los hongos filamentosos *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*. La inducción de la expresión de proteínas, por ejemplo, en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, emplea un promotor obtenido del gen de alcohol oxidasa I (AOXI) regulado por metanol. Este promotor está estrechamente regulado y permite altos niveles de expresión extracelular que se producen por métodos de cultivo alimentados por metanol. Para la expresión de anticuerpos en los hongos se suelen utilizar dos promotores: el promotor de la glucoamilasa (glaA) y el promotor de la endoxilanas A (exlA). En comparación con las levaduras, en los hongos filamentosos son más difíciles de generar clones transformados, pero tienen una larga tradición de uso en biotecnología y se han utilizado para la expresión de fragmentos de IgG (Frenzel *et al.*, 2013; Gasser y Mattanovich, 2007; Weisser y Hall, 2009).

Se ha explorado la alternativa del uso del parásito eucariota *Leishmania tarentolae* como sistema de expresión de diferentes proteínas recombinantes. Una de las principales ventajas de este sistema de expresión es el patrón de glicosilación similar al de los mamíferos: este protozoo es capaz de realizar la glicosilación O y la glicosilación N, que está muy conservada en los mamíferos. En consecuencia, este protozoo y otros parásitos se han empezado a utilizar para la producción de anticuerpos recombinantes con un rendimiento proteico de 2-6 mg L⁻¹ de scFv purificado (Fernández-Robledo y Vasta, 2010; Klatt y Konthur, 2012).

Las células de los insectos representan un sistema de expresión muy versátil ya que pueden ser fácilmente transfectadas con virus específicos de los insectos como los de la familia Baculoviridae. Estos virus son altamente específicos y seguros para los mamíferos y plantas. Además, contienen un sistema de plegado y secreción de proteínas de mamífero eficiente, siendo capaces de realizar modificaciones posttraduccionales más complejas que las realizadas por los sistemas eucarióticos celulares. Su gran robustez, combinada con unos requisitos menos sofisticados para la fermentación, proporciona algunas ventajas en comparación con las células procariontas. Entre las ventajas que presenta este tipo de sistema de expresión se encuentran la capacidad de realizar fosforilaciones y N y O glicosilaciones, la correcta hidrólisis del péptido señal, la acrilación, palmitilación y miristilación. Estas características podrían marcar la diferencia al permitir la producción de anticuerpos con costes muy bajos. Entre las desventajas encontramos la expresión de inmunoglobulinas en agregados y bajos niveles de expresión, probablemente causado por la sobrecarga del procesamiento posttraduccional cuando se encuentran bajo el control del fuerte promotor *Polyhedron* (Cérutti y Golay, 2012; Frenzel *et al.*, 2013)

Para una reducción eficaz de los costes de producción, pueden utilizarse plantas transgénicas, ya que representan un sistema de expresión altamente escalable; el cultivo puede ampliarse fácilmente sin un gran aumento de los costes. Para su producción solo se requieren nutrientes sencillos, agua y luz solar, siendo la más usada es *Arabidopsis thaliana*. En cambio, la generación de plantas transgénicas sigue siendo muy compleja y difícil. El obstáculo más importante de las plantas transgénicas es el procesamiento posterior, ya que puede ser necesario procesar toneladas de material vegetal. Además, las plantas son incapaces de realizar una auténtica N-glicosilación para producir N-glicanos que son esenciales para la estabilidad, el plegado y la actividad biológica de la mayoría de las proteínas terapéuticas. A pesar de estos problemas, se ha demostrado que los scFv y los anticuerpos monoclonales expresados en plantas tienen una afinidad y una actividad de

unión similares a las de las bacterias (Ahmad *et al.*, 2012; Demain y Vaishnav, 2009; Ma *et al.*, 2003; Malabadi *et al.*, 2012; Weisser y Hall, 2009).

Finalmente, las líneas celulares de mamíferos son las más utilizadas para la producción de anticuerpos, ya que proporcionan un sofisticado sistema de plegado y secreción, así como una glicosilación similar a la humana. Los sistemas celulares de mamíferos más comunes utilizados para generar proteínas recombinantes son las células de ovario de hámster chino (CHO) y las no secretoras (NS0). La línea celular CHO aislada en los años 50 dio lugar a una serie de progenie genéticamente diferente, como las líneas celulares K1-, DukX B11-, DG44- y otras que difieren en la calidad del producto proteico y el rendimiento alcanzable. El rendimiento máximo de expresión de IgG funcional fue de 5 g L⁻¹, pero el aumento de la producción no conduce a una gran reducción de los costes de producción. Cada vez son más las líneas celulares que han recibido la aprobación para la producción de proteínas recombinantes, entre las que se encuentran las células Per.C6, las células de mieloma de ratón NS0, las células de riñón de hámster bebé (BHK) y la línea celular de riñón embrionario humano HEK293. Por otra parte, para la producción de altos niveles de anticuerpos recombinantes se necesitan grandes esfuerzos técnicos que conllevan costes relativamente altos, puesto que se requiere de biorreactores de precio elevado para realizar la producción de proteínas a escala comercial. (Bandaranayake y Almo, 2014; Dalton y Barton, 2014; Frenzel *et al.*, 2013; Wurm, 2004)

Una vez producidos los anticuerpos recombinantes en el sistema elegido, es necesario proceder a su purificación para su uso como reactivo inmunológico. La cromatografía de afinidad es uno de los métodos más utilizados para la purificación de anticuerpos, debido a su alta selectividad y rapidez. Su eficacia se basa en gran medida en las características de unión del anticuerpo requerido y del ligando utilizado para la captura del anticuerpo (Ayyar *et al.*, 2012). A lo largo de los años, la purificación de anticuerpos basada en la proteína A ha sido la tecnología más importante para la purificación industrial de anticuerpos, ya que la mayoría de los anticuerpos comerciales han sido monoclonales o policlonales, pero con la entrada de los anticuerpos recombinantes en el mercado, esto ha cambiado. La cromatografía de afinidad (Figura I.15) emplea diferentes tipos de agentes de unión (ligandos) y soportes de fase sólida (matrices).

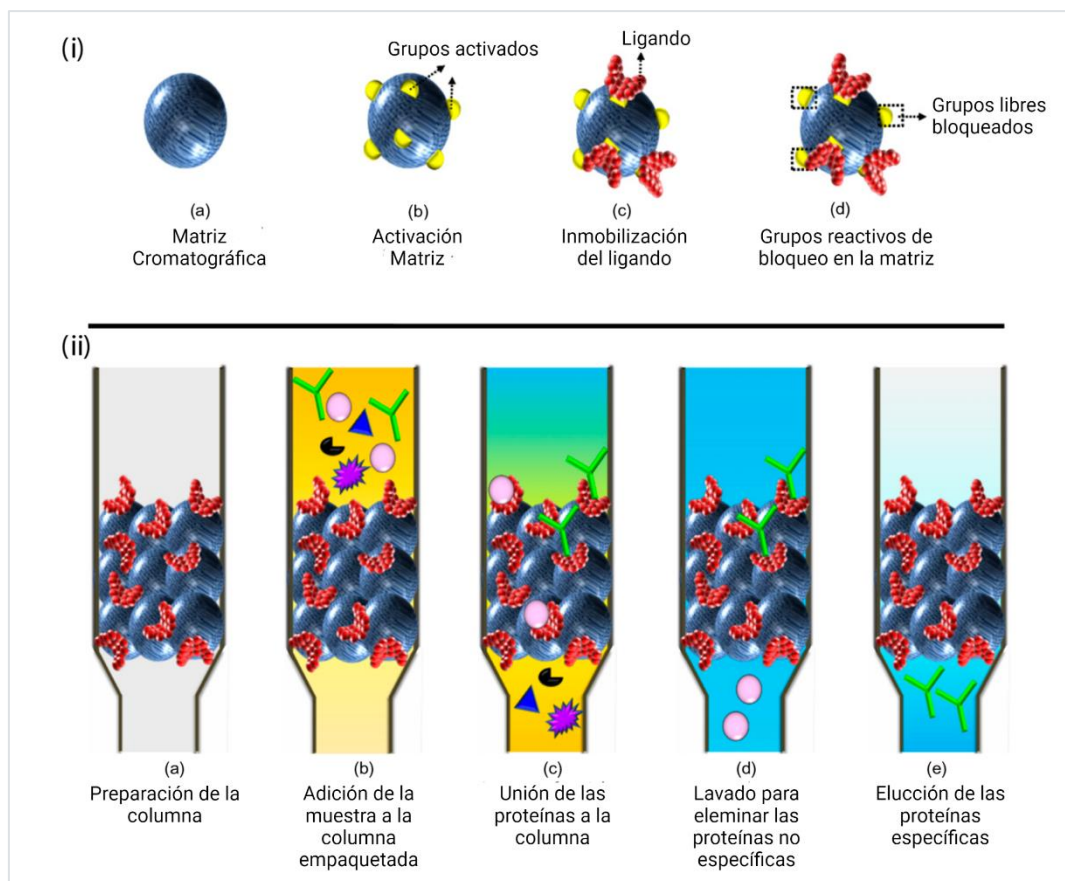


Figura I.15. Pasos de la purificación de anticuerpos mediante cromatografía de afinidad (figura adaptada de Ayyar *et al.*, 2012). *i*: preparación de la matriz por activación química generando grupos funcionales reactivos en la superficie (la química puede seleccionarse en función de la elección del ligando a inmovilizar); *ii*: procedimiento de purificación.

Mediante la optimización de diversas propiedades, como la especificidad, la selectividad, la reproducibilidad, las químicas de conjugación y la rentabilidad de estos componentes, este método puede aplicarse para la purificación a gran escala de anticuerpos con el fin de lograr el rendimiento y la pureza deseados del producto (Arora *et al.*, 2017). Los anticuerpos recombinantes pueden purificarse utilizando técnicas de cromatografía de afinidad, que separa los anticuerpos en función de su interacción específica y reversible con antígenos objetivo inmovilizados o moléculas marcadoras. Una de las estrategias más comunes de purificación de anticuerpos recombinantes es la cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC), que separa el anticuerpo que contiene grupos específicos (por ejemplo, histidina; normalmente localizada en el extremo C-terminal para evitar la purificación de proteínas incompletas) mediante la unión covalente coordinada con marcadores de iones metálicos (por ejemplo, iones de níquel, cobre, zinc y cobalto) inmovilizadas en la resina. El número de átomos donantes de pares de electrones (por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y azufre) en el compuesto quelante determina la fuerza y la

estabilidad de unión del complejo metal-quelato. Así, se ha demostrado que los iones metálicos (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} y Zn^{2+}) muestran una alta afinidad hacia la región Fc de la IgG, más que las regiones Fab (Ayyar *et al.*, 2012; Todorova-Balvay *et al.*, 2004). Los cuatro pasos principales de la purificación basada en IMAC son el equilibrio de la muestra, unión, lavado y elución. Inicialmente, los anticuerpos recombinantes con marcadores específicos (por ejemplo, colas de histidinas) se unirán a la resina. El paso de lavado permite eliminar los anticuerpos no específicos y la mayoría de las impurezas. Por último, la proteína de interés suele eluirse cambiando el pH (generalmente se utiliza un tampón de pH bajo, como el acetato de sodio de pH 4,4, y se recoge inmediatamente en un tampón de neutralización, por ejemplo, 100 mM de NaOH, para preservar la actividad del anticuerpo purificado), o añadiendo una molécula competitiva (por ejemplo, 250 mM de imidazol) (Ma y O’Kennedy, 2015, 2017; McMahon y O’Kennedy, 2000). Hay muchas resinas, columnas y *beads* de IMAC disponibles en el mercado (por ejemplo, de Bio-Rad Laboratories, Pall Life Sciences, Thermo Scientific Pierce, GE Healthcare, QIAGEN, Merck Millipore y Sigma-Aldrich).

Capítulo II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las nueces y los pistachos son los frutos de cáscara más extendidos y comercializados en el mundo debido a sus propiedades nutritivas y organolépticas (Dreher, 2012; Hayes *et al.*, 2015). Según la base de datos de consumo del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), el consumo per cápita en 2021 de frutos de cáscara está en 3,55 Kg ingeridos por persona y año, un 6,8 % inferior a 2020. A pesar de perder relevancia con respecto a 2020 (momento en que el consumo creció de forma muy destacada gracias a la permanencia en los hogares durante más tiempo), consiguen ganar participación en la cesta de los hogares españoles con respecto a 2019 ya que ese año los españoles consumieron 147 millones de Kg de frutos de cáscara, siendo el consumo medio por persona y año de 3,19 Kg. Los frutos de cáscara más consumidos fueron nueces (0,67 Kg/persona/año), cacahuetes (0,35 Kg), almendras (0,25 Kg) y pistachos (0,18 Kg). Las nueces son el primer fruto de cáscara por orden de consumo en los hogares españoles, representando el 20,6 % sobre el volumen total de frutos de cáscara, con un gasto de 5,63 € por persona y año. Además, el perfil de hogar con mayor consumo de nueces se corresponde con personas mayores de 50 años (MAPA, 2019, 2021).

Un consumo regular de frutos de cáscara se asocia a una disminución del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares debido a la presencia de compuestos fenólicos en las pieles, que inhiben la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (Goli *et al.*, 2005; Labuckas *et al.*, 2008). Asimismo, la frecuencia de consumo de frutos secos está inversamente relacionada con un aumento del riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 y de los síntomas relacionados con el envejecimiento, efectos atribuidos principalmente a la fibra, las grasas saludables, los antioxidantes y los compuestos antiinflamatorios de las nueces (Bulló *et al.*, 2015; Rock *et al.*, 2017).

Debido a sus propiedades beneficiosas, la nuez y el pistacho también se emplean mucho en la industria alimentaria, por lo que, de forma directa (compra de frutos de cáscara) o indirecta (productos comerciales con contenido de frutos de cáscara), una gran parte de la población está consumiendo tanto nuez como pistacho, lo que justifica su crecimiento sostenido a nivel mundial. Los mayores productores de nuez a nivel mundial son China, Estados Unidos e Irán. En cuanto al consumo de nuez, en primer lugar se encuentra Israel con 0,6 kg/persona/año, seguido de Irán (0,52 kg/persona/año) y Estados Unidos (0,5 kg/persona/año) (MAGYP, 2019). Los mayores productores de pistacho en el año 2018 fueron Irán, Estados Unidos y Turquía, siendo a su vez los mayores consumidores de pistachos. Turquía es el mayor consumidor de pistacho con un consumo anual de 130.202 Tm al año. Estados Unidos es el segundo consumidor más importante, con un total

de 93.432 Tm al año, e Irán ha aumentado constantemente el consumo de pistachos hasta 49.504 Tm, lo que lo convierte en el tercer mayor consumidor (FAO, 2018; Misachi, 2018).

A pesar de sus efectos beneficiosos para la salud, los frutos de cáscara son considerados como importantes alérgenos que con frecuencia causan reacciones adversas en consumidores alérgicos (Costa *et al.*, 2014; Geiselhart *et al.*, 2018). Las alergias alimentarias son un problema creciente en la salud pública y el desarrollo de métodos rápidos y eficaces de detección de alérgenos es esencial para que los fabricantes de alimentos garanticen un etiquetado preciso y aseguren una información fiable al consumidor alérgico. Entre las técnicas disponibles actualmente para identificar alérgenos alimentarios, destacan las que se basan en la detección de proteínas mediante técnicas inmunoenzimáticas ELISA. Las técnicas ELISA se emplean para la detección cualitativa o cuantitativa de proteínas alergénicas tanto en la investigación y diagnóstico de las alergias, como en el control de calidad de los alimentos en diversas industrias y en el control oficial del etiquetado de los alimentos. Actualmente existen en el mercado inmunoensayos y kits comerciales de ELISA dirigidos a detectar nuez y pistacho mediante el empleo de anticuerpos monoclonales y policlonales obtenidos por inmunización de animales de experimentación. Sin embargo, pueden mostrar reacciones cruzadas con otras especies filogenéticamente relacionadas (Tabla I.2). En el caso de la nuez (*Juglans regia*) es frecuente la aparición de reacciones cruzadas con la pacana (*Carya illinoensis*), mientras que en el caso del pistacho (*Pistacia vera*) pueden presentar reactividad cruzada con el anacardo (*Anacardium occidentale*) y el mango (*Mangifera indica*) (Noorbakhsh *et al.*, 2011).

En consecuencia, es necesario desarrollar métodos alternativos más específicos que eviten las reacciones cruzadas con especies no diana y que respeten las recomendaciones de bienestar animal. El desarrollo de métodos basados en la obtención de anticuerpos recombinantes puede representar una alternativa eficaz para satisfacer estas necesidades. En este contexto, esta Tesis Doctoral tiene por objetivo principal la obtención de anticuerpos recombinantes frente a las proteínas alergénicas de nuez (*Juglans regia*) y pistacho (*Pistacia vera*) mediante la técnica de presentación en fagos (*phage display*) a partir de genotecas comerciales sintéticas que contienen fago-anticuerpos recombinantes, que no requieren el empleo de animales de experimentación. Con este procedimiento se tiene fácil acceso a la secuencia nucleotídica codificante de los anticuerpos, lo que permite su modificación mediante ingeniería genética con el fin de mejorar sus propiedades de unión al antígeno o

incorporar modificaciones funcionales en los anticuerpos generados, a la vez que se desarrollan técnicas de ELISA para la detección de estas especies en alimentos.

En este contexto, los objetivos específicos de esta Tesis Doctoral son:

1. Obtención, caracterización y modificación funcional de anticuerpos recombinantes específicos frente a nuez (*Juglans regia*) y pistacho (*Pistacia vera*) mediante la técnica de presentación en fagos (*phage display*) a partir de genotecas de fagos recombinantes.
2. Producción de los anticuerpos recombinantes biotinilados mediante transformación en *Pichia pastoris*.
3. Identificación, mediante técnicas cromatográficas, electroforéticas, espectroscópicas e inmunoquímicas, de las dianas moleculares reconocidas por los anticuerpos recombinantes frente a nuez y pistacho, y caracterización de la interacción molecular entre dichos epítomos y los anticuerpos recombinantes obtenidos.
4. Puesta a punto de diversos formatos de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), utilizando los anticuerpos recombinantes obtenidos, con y sin modificación funcional, para detectar la presencia de nuez y pistacho en alimentos.

Capítulo III

PLAN DE TRABAJO Y METODOLOGÍA RESUMIDA

III.1. PLAN DE TRABAJO

Para conseguir los objetivos de esta Tesis Doctoral ha sido necesario desarrollar el siguiente plan de trabajo:

1. Obtención de anticuerpos recombinantes específicos frente a nuez (*Juglans regia*) mediante la técnica de presentación en fagos (*phage display*) a partir de genotecas de fago-anticuerpos recombinantes tipo scFv y su utilización para la detección de nuez en alimentos mediante técnicas inmunoenzimáticas (ELISA).

- 1.1. Enriquecimiento de la genoteca Tomlinson I en clones de fago-scFv específicos de nuez.
- 1.2. Selección de clones de fago-scFv individuales mediante ELISA monoclonal.
- 1.3. Secuenciación y caracterización de los clones seleccionados.
- 1.4. Producción de scFv biotinilados mediante transformación en *Pichia pastoris*.
- 1.5. Producción y caracterización del scFv multimerizado.
- 1.6. Identificación y caracterización, mediante técnicas cromatográficas, electroforéticas, espectroscópicas e inmunoquímicas, de las proteínas de nuez reconocidas por el scFv seleccionado.
- 1.7. Desarrollo de una técnica de ELISA directo para la detección de nuez utilizando un scFv específico frente a nuez multimerizado con ExtrAvidina-HRP.
- 1.8. Aplicación de la técnica de ELISA directo con scFv multimerizado para verificar la presencia de nuez en alimentos comerciales, y comparación con un kit comercial de ELISA y una técnica de PCR en tiempo real.

2. Obtención de anticuerpos recombinantes específicos frente a pistacho (*Pistacia vera*) mediante la técnica de *phage display* a partir de genotecas de fago-anticuerpos recombinantes tipo dAb y su utilización para la detección de pistacho en alimentos mediante técnicas inmunoenzimáticas (ELISA).

- 2.1. Enriquecimiento de la genoteca de dAbs en clones de fago-dAb específicos de pistacho mediante diferentes estrategias de *biopanning*.
- 2.2. Selección de clones de fago-dAb individuales mediante ELISA monoclonal.
- 2.3. Secuenciación y caracterización de los clones seleccionados.
- 2.4. Identificación y caracterización, mediante técnicas cromatográficas, electroforéticas, espectroscópicas e inmunoquímicas, de las dianas moleculares reconocidas por los anticuerpos recombinantes frente a pistacho.
- 2.5. Desarrollo de una técnica inmunoenzimática de ELISA indirecto, utilizando un fago-anticuerpo específico para la detección de pistacho en alimentos.
- 2.6. Producción de dAb biotinilados *in vivo*, específicos frente a las proteínas de pistacho en la levadura metilotrófica *Pichia Pastoris*.

III.2. METODOLOGÍA RESUMIDA

La metodología resumida para el desarrollo del plan de trabajo indicado para cada uno de los apartados de la Tesis Doctoral se recoge a continuación.

III.2.1. Muestras y preparación de los extractos de proteínas y ADN

Las muestras se obtuvieron de establecimientos comerciales especializados y, cuando no fue posible, se solicitaron las especies botánicas de interés a organismos de investigación como el Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria (INIA), Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias de Cataluña (IRTA) y el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC). Asimismo, se analizaron muestras comerciales de alimentos adquiridos en diversos establecimientos minoristas de alimentación para comprobar la validez de los métodos desarrollados a lo largo de este trabajo para la detección de vegetales alergénicos y la verificación del etiquetado. Tras la identificación de las muestras biológicas, se prepararon muestras de referencia y mezclas experimentales que contengan concentraciones conocidas entre 0,1 mg Kg⁻¹ y 5 % en peso de cada especie diana en la matriz de elección. Las muestras fueron homogeneizadas mediante un molino IKA A11 (5 g). Partiendo de 200 mg del homogeneizado, se prepararon los extractos proteicos mediante la incorporación de 1200 µL de tampón de extracción, incubación con agitación, posterior centrifugación, filtrado y cuantificación de proteínas mediante BCA. Los extractos se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Para llevar a cabo análisis de PCR en tiempo real, se extrajo ADN de las muestras comerciales y mezclas experimentales mediante *Wizard DNA Clean-Up System Kit* y se cuantificó la concentración de ADN mediante NanoDrop ND-1000.

III.2.2. Selección de scFv y dAb específicos frente a nuez y pistacho mediante presentación en fagos (*phage display*)

Se emplearon las genotecas comerciales Tomlinson I (scFv, con región V_H V3-23/d47 y JH4b, y región V_K O12/O2/DPK9 y JK1) y de anticuerpos de dominio único (dAb, solo con región V_H V3-23/d47). Estas genotecas comprenden más de 100 millones de fragmentos de anticuerpos diferentes, clonados en un vector fagémido resistente a la ampicilina y transformado en células TG1 de *E. coli* (K12 Δ (lac-proAB) supE thi hsdD5/F' traD36 proA+B lacIq lacZ Δ M15).

Se realizaron varias rondas de selección, alternando como soportes de la reacción paletas de poliestireno y partículas paramagnéticas recubiertas con un extracto proteico de la especie diana (pistacho o nuez), con el fin de evitar la selección de fago-anticuerpos que reconozcan al soporte. Para evitar reacciones cruzadas con otros alérgenos vegetales, se incluyó una etapa de hibridación sustractiva utilizando extractos de proteínas heterólogas (pacana, anacardo y cacahuete). Los fagos que reconocían a la especie diana se eluyeron con tripsina, se amplificaron en *E. coli* y se sometieron a varias rondas de selección para enriquecer la genoteca en fago-anticuerpos específicos frente a la especie diana.

Para la amplificación de los fagos, se inoculó 1 mL de bacterias recuperadas del *biopanning* (o hasta una DO600 de 0,1) en 500 mL de 2xTY (16 g L⁻¹ triptona, 10 g L⁻¹ extracto de levadura y 5 g L⁻¹ NaCl) que contenía 100 µg mL⁻¹ de ampicilina y 4 % (p/v) de glucosa y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una DO600 de 0,5. Por otra parte, 10 mL del cultivo se infectó con 5x10¹⁰ partículas de fago ayudante y se resuspendió en 100 mL de 2xTY con ampicilina, kanamicina y glucosa para incubar toda la noche. Después, para conocer el título del *biopanning*, se realizó la precipitación de los fagos con polietilenglicol (PEG)/NaCl y se realizaron diferentes diluciones en PBS para extender en placas de agar TYE (15 g L⁻¹ bacto-agar, 10 g L⁻¹ triptona, 5 g L⁻¹ extracto de levadura y 8 g L⁻¹ NaCl). A su vez, los fagos precipitados se usaron en un ELISA indirecto para confirmar especificidad y analizar productos comerciales.

III.2.3. Selección de clones de fago-scFv individuales mediante ELISA monoclonal

Para seleccionar los clones que se unen a la nuez y el pistacho, se recogieron al azar 95 colonias individuales de las placas TYE de la segunda ronda de selección frente a la especie diana y se inocularon en pocillos separados de microplacas de cultivo celular Nunc que contenían 200 µL de 2 × TY con 100 µg mL⁻¹ de ampicilina y 4 % de glucosa. Tras la infección con el fago ayudante, se examinaron los fagos monoclonales para comprobar la unión a la especie diana (nuez o pistacho) mediante un ELISA monoclonal, tapizando placa Maxisorp Nunc con 25 µL del sobrenadante del cultivo, bloqueando con MPBS (1 % de leche en polvo en PBS) y detectando con anticuerpo monoclonal de ratón HRP/anti-M13. Aquellos clones que presentaron una ratio de absorbancia (Abs nuez o pistacho/ Abs cacahuete) mayor a 5 fueron seleccionados.

III.2.4. Secuenciación y caracterización de los clones seleccionados

Los clones seleccionados se amplificaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los *primers* LMB3 y pHEN para nuez y CDR1-2 Fw (5'-ACGTCAGAAGACATCA GGTGCAGCTGTTGGAGTC-3') y CDR3 Rev (5'-TCAGTTGAAGACCTCGAATTCAGATCCTCTTC TGAGATG-3') para pistacho. Los productos de PCR de nuez (V_H y V_L , 935 pb) y pistacho (V_H , 360-390 pb) se examinaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %. A continuación, se secuenciaron para confirmar con la secuencia completa de los clones. Este análisis se llevó a cabo en la Unidad de Genómica de la universidad Complutense de Madrid con el secuenciador multicapilar ABI Prism 3730 y los *primers* pR2seq (5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACGA-3') y M13 rev (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'). Las secuencias de nucleótidos se compararon con el software *European Molecular Biology Open Software Suite* (EMBOSS), y luego se analizaron con IMGT/V-QUEST (software de alineación de secuencias para inmunoglobulinas y receptores de células T) para determinar las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la V_H y V_L .

III.2.5. Producción de scFv biotinilados mediante transformación en *Pichia pastoris*

Una vez conocida la secuencia de los clones, se introdujeron modificaciones funcionales (conjugación con biotina, EQKLISEEDL) con el fin de multimerizar los anticuerpos mediante su unión a una molécula de ExtrAvidina-HRP y optimizar la sensibilidad de la detección. Para ello, se llevó a cabo una cotransformación con dos vectores en *Pichia pastoris*, el primero con la secuencia del anticuerpo y el dominio aceptor de biotina (BAD), denominados pMJA186-G2 para nuez y pRAS002m para pistacho, y el segundo con la enzima biotín ligasa (pMJA180 para ambos). La producción de los fragmentos scFv o dAb específicos solubles por parte de 95 clones transformados en *Pichia pastoris* se confirmó mediante *dot blot* de los sobrenadantes tras la inducción con metanol. Este paso de cribado por *dot blot* es muy útil para asegurar la selección de clones transformados con éxito que expresan la proteína de interés. El vector pMJA180 con la secuencia de la enzima biotín ligasa tiene de base el vector pPIC6a con resistencia a blasticidina, cuya concentración en los medios de expresión (BMGY, buffered glycerol-complex médium, y BMMY, buffered methanol-complex médium) se incrementó hasta $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, para asegurar la selección de los clones cotransformados.

La inserción de ambos plásmidos en el ADN genómico del clon seleccionado de *Pichia pastoris* se evaluó mediante PCR con los pares de cebadores MJA254/MJA259 (para scFv/dAb-BAD) y MJA255/MJA256 (para BirA).

III.2.6. Producción y caracterización del scFv multimerizado

Los clones seleccionados se cultivaron en primer lugar en el *medio Yeast Extract Peptone Dextrose Medium* (YPD) con zeocina y blasticidina y de ahí se pasaron a 600 mL de medio de cultivo BMGY durante 18 h en agitación. Después, la inducción con metanol durante 72 h en medio BMMY (600 mL) produjo la secreción del anticuerpo biotinilado al medio de cultivo. El cultivo se centrifugó para eliminar las levaduras y se filtró por membrana de 0,4 μm . La purificación del sobrenadante se llevó a cabo mediante cromatografía en ÄKTA *purifier FPLC system* a través de una columna Hi-Trap de proteína L (eluido con 0,1 M glicina-HCl) o de una columna Ni-NTA (eluido con gradiente de imidazol). Las fracciones recuperadas fueron dializadas en PBS a través de AMICON Ultra-15 *Centrifugal Filter Units* ajustando la concentración a 2 mg mL⁻¹.

Para la multimerización de scFv biotinilados se utilizó ExtrAvidina-HRP siguiendo las directrices del *NIH Tetramer Core Facility*. El procedimiento consistió en añadir a una alícuota de 100 μL (200 μg) de scFv biotinilado, 0,5 μL de solución de ExtrAvidina-HRP (2,5 mg mL⁻¹) cada 10 min hasta un total de 10 veces. La reacción se llevó a cabo en un mezclador de muestras (HulaMixer *Sample Mixer*). Los tubos de anticuerpos multimerizados se mantuvieron en la oscuridad a 4 °C hasta su uso.

III.2.7. Identificación y caracterización, mediante técnicas cromatográficas, electroforéticas, espectroscópicas e inmunoquímicas, de las proteínas de nuez y pistacho reconocidas por los anticuerpos recombinantes seleccionados

La caracterización de la estabilidad del epítipo se realizó mediante ELISA directo de los extractos proteicos sometidos a tratamiento térmico (horneado y autoclavado) con los anticuerpos multimerizados de nuez o fago-anticuerpos de pistacho.

El fraccionamiento de extractos proteicos mediante la separación cromatográfica de exclusión de tamaño molecular se llevó a cabo en un sistema de cromatografía líquida rápida de proteínas (sistema ÄKTA *purifier FPLC*). Se inyectaron 100 μL de extracto proteico de nuez/pistacho desgrasado y filtrado en una columna HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR,

previamente equilibrada con PBS. La velocidad de flujo se mantuvo en $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Las fracciones eluidas se recogieron en viales de vidrio de 1,5 mL y se almacenaron a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso posterior en el ELISA frente a los anticuerpos recombinantes.

También se llevaron a cabo electroforesis en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes, así como *Western blot* de los extractos proteicos y de las fracciones obtenidas mediante cromatografía líquida para corroborar a qué familia proteica estaba reconociendo cada uno de los anticuerpos recombinantes.

La identificación mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF) de las fracciones cromatográficas y/o bandas electroforéticas reconocidas por los anticuerpos recombinantes se realizó en la Unidad de Proteómica del CAI que dispone de un sistema de cromatografía líquida capilar (LC-MS-MS), modelo Q-TOFII de Micromass y de un espectrómetro de masas 4800 Plus MALDI-TOF/TOF *Analyzer*, con fuente de ionización tipo MALDI y dos analizadores tipo tiempo de vuelo en tandem y cámara de colisión (CID) para fragmentación de iones de Applied Biosystems.

Para el análisis del índice de multimerización de los anticuerpos recombinantes biotinilados se contó con el apoyo del Instituto de Química-Física Rocasolano, CSIC, para llevar a cabo los experimentos de coeficiente de sedimentación mediante ultracentrifugación.

III.2.8. Desarrollo de una técnica de ELISA directo para la detección de nuez utilizando un scFv específico frente a nuez multimerizado con ExtrAvidina-HRP

El ELISA directo utilizando JrBSF-scFv multimerizado específico de la nuez (*Juglans regia* *Biotinylated Soluble Fragment-single chain antibody*, multimerizado con ExtrAvidina-HRP) se desarrolló para detectar la proteína de la nuez en productos comerciales y para determinar la sensibilidad del método con los extractos de las mezclas binarias. Los pocillos de las placas de microtitulación se recubrieron con los extractos de proteínas a analizar diluidos 1:100 en PBS. La placa se bloqueó con albúmina de suero bovino (BSA) al 3 % en TBS (tampón tris-fosfato). Después, se añadieron 100 μL de scFv multimerizado (2 mg mL^{-1}) diluido 1:500 (v/v) en TBST con 1 % de BSA. Por último, se añadieron 100 μL de solución de sustrato TMB a cada pocillo, se paró la reacción con 50 μL de ácido sulfúrico 1M y se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro FLUOSTAR Optima. Los

lavados después de cada paso se realizaron con TBS. Todos los experimentos se realizaron por duplicado en tres días diferentes.

III.2.9. Aplicación de diversos formatos de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) utilizando anticuerpos recombinantes para detectar la presencia de alérgenos vegetales en alimentos

Los fago-anticuerpos dAb específicos frente a pistacho y los fragmentos scFv biotinilados específicos de nuez y purificados, se emplearon en el desarrollo de técnicas de ELISA indirecto y directo, para la detección de pistacho y nuez, respectivamente, en alimentos.

Para evaluar el nivel de detección y la capacidad de cuantificación de las técnicas desarrolladas, se analizaron mezclas experimentales que contenían concentraciones conocidas de nuez o pistacho en una matriz alimentaria (harina de trigo o maíz). Se elaboraron rectas de calibración para evaluar la idoneidad (afinidad, nivel de detección, especificidad) de los anticuerpos recombinantes para detectar y cuantificar la presencia de nuez y pistacho en alimentos. Estas curvas se ajustaron a la ecuación logística de 4 parámetros utilizando el software Origin 8.0. Asimismo, se estudió la influencia del tratamiento térmico en el reconocimiento de estos alérgenos. El límite de detección (LOD) se calculó como la concentración de la proteína objetivo que presenta un valor de absorbancia superior a la media de los 8 frutos de cáscara más tres veces su desviación estándar (SD).

Una vez elegidas las sondas de afinidad con mejores características, y puestas a punto las técnicas de ELISA, se analizaron muestras comerciales de alimentos procesados con el fin de determinar la presencia y concentración de nuez y pistacho en estas matrices. Se consideró que un producto comercial era positivo cuando su valor de absorbancia era mayor que el del estándar de 10^3 mg Kg^{-1} .

III.2.10. Comparación del JrBSF-scFv multimerizado en ELISA directo con un kit comercial de ELISA tipo sándwich y una técnica de PCR en tiempo real

La prueba se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante del kit comercial, añadiendo 100 μL de extractos de muestras no diluidas y diluidas (1:5, 1:10, 1:25 en tampón de extracción de proteínas) a las placas tapizadas con el anticuerpo específico de nuez del kit Alertox (Biomedal Diagnostics). Un control de extracción negativo (sin muestra)

y el estándar de 0 mg Kg⁻¹ se incluyeron en todos los ensayos, y cada muestra se analizó por duplicado. El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se calcularon como la concentración de la proteína objetivo que presenta un valor de absorbancia superior al blanco (harina de maíz) más 3 o 10 veces, respectivamente, su desviación estándar. Se generó una curva de concentración-respuesta utilizando los estándares proporcionados por el kit, trazando los valores de absorbancia frente a la concentración de nuez. La curva estándar obtenida se ajustó a la ecuación logística de 4 parámetros utilizando el software Origin 8.0. La reactividad cruzada del ensayo se calculó para 8 frutos secos y la soja, como la cantidad de nuez estimada interpolando los valores de absorbancia de los extractos no diluidos en la ecuación logística obtenida del kit.

El análisis de la PCR en tiempo real de las muestras comerciales se realizó utilizando cebadores específicos para la nuez (WalITSdir/WalITSinv) y una sonda (WalITSP) o cebadores específicos de la nuez (PecITSdir/PecITSinv) y una sonda (PecITSP) (Tabla IV.2.1). Todos los análisis de PCR en tiempo real se realizaron por duplicado para cada extracto de ADN, junto con su correspondiente control endógeno 18S.

Capítulo IV

RESULTADOS

IV.1.

MULTIMERIC RECOMBINANT ANTIBODY (scFv) FOR ELISA DETECTION OF ALLERGENIC WALNUT. AN ALTERNATIVE TO ANIMAL ANTIBODIES

Las nueces están clasificadas como un importante ingrediente alergénico que puede provocar reacciones graves en personas sensibles. Por ello, las industrias alimentarias tienen la responsabilidad de declarar en los alimentos envasados la presencia de nueces para evitar una exposición involuntaria. Los inmunoensayos se utilizan ampliamente para detectar proteínas alergénicas pero los únicos disponibles dependen del uso de inmunización animal. En este trabajo, a partir de la genoteca Tomlinson I se ha conseguido aislar un anticuerpo recombinante de tipo scFv que es capaz de reconocer a la nuez, y que mediante la introducción de modificaciones de la secuencia se ha transformado en *Pichia pastoris* para producir *in vivo* el anticuerpo *Juglans regia* Biotinylated Soluble Fragment-single chain (JrBSF-scFv) y multimerizarlo con ExtrAvidina-HRP. Este scFv multimerizado se ha utilizado para el desarrollo de un ELISA directo que permite detectar la nuez con un límite de detección de 1616 mg Kg⁻¹. El ensayo solo presenta reacción cruzada con la pacana en un 2,25 % por lo que es una buena herramienta para la detección de nuez en matrices alimentarias crudas y horneadas.

Raquel Madrid, Silvia de la Cruz, Aina García-García, Marcos J.C. Alcocer, Isabel González, Teresa García, Rosario Martín (2018). Multimeric recombinant antibody (scFv) for ELISA detection of allergenic walnut. An alternative to animal antibodies. *Journal of Food Composition and Analysis*, 67, 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.01.017>

Publicado en *Journal of Food Composition and Analysis*

Índice de impacto (2018): 2,994

Posición en JCR (2018): 37/135





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Food Composition and Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jfca

Original research article

Multimeric recombinant antibody (scFv) for ELISA detection of allergenic walnut. An alternative to animal antibodies

Raquel Madrid^a, Silvia de la Cruz^a, Aina García-García^a, Marcos J.C. Alcocer^b, Isabel González^a, Teresa García^{a,*}, Rosario Martín^a

^a Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^b School of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough LE12 5RD, UK



ARTICLE INFO

Keywords:

Phage display
Pichia pastoris
In vivo biotinylation
 Multimeric scFv
 ELISA
 Walnut detection
 Recombinant antibodies
 Food allergens
 Food analysis
 Food composition

ABSTRACT

Walnuts are classified as an important allergenic ingredient that can cause severe reactions in sensitized individuals. To prevent unintended exposure to products containing walnut, food manufacturers have the responsibility to declare its presence in packaged foods. Immunochemical methods are widely used to detect walnut proteins. However, available immunoassays rely on the use of antibodies raised in animals. In this work, an affinity probe for walnut proteins has been isolated from the Tomlinson I library, and further engineered in *Pichia pastoris* to produce the *in vivo* *Juglans regia* Biotinylated Soluble Fragment-single chain and multimeric antibody (JrBSF-scFv). The multimeric scFv has been used to develop a direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), allowing detection of walnut in a food matrix with a limit of detection (LOD) of 1616 mg kg⁻¹. This is the first recombinant antibody available for detection of walnut proteins. The assay is specific, only cross-reacting to some extent (2.25%) to pecan, thus being useful as a screening tool for detection of walnut in raw or baked food matrices. Multimerization of the scFv with different avidin derivatives could be of interest to improve sensitivity of the assay.

1. Introduction

Walnuts are amongst the most widely consumed of all commercially grown tree nuts in the world. Member of *Juglandaceae* family and seeds of *Juglans regia* L., walnuts are a highly nutritious food. The regular consumption of walnuts has been associated with decreased risk of cardiovascular disease, coronary heart disease and type II diabetes, while lessening aged related symptoms (Kris-Etherton, 2014; Rock et al., 2017). Accordingly, they are included as ingredient in many foodstuffs such as bakery products to enhance their nutrition value (Hayes et al., 2015; Mao et al., 2014; Wang et al., 2014). However, food-induced allergies are an emergent problem of public health. Among food allergens, walnut is classified as an important allergenic ingredient and frequent cause of adverse food reactions in allergic patients. Even small amounts of walnut can cause severe reactions in sensitized individuals, being a real problem of allergen management (Clark and Ewan, 2003). Food processing has the potential to alter walnut immunoreactivity due to modifications of specific epitopes in the walnut allergens. Nevertheless, boiling and roasting treatments do not affect the antigenicity of walnut proteins, while a slight decrease has been described after frying in vegetable oil at 191 °C for 1 min (Su

et al., 2004). Only harsh conditions of pressure and temperature, like autoclaving at 2.8 atm (37 psi), 138 °C for 15 or 30 min, lead to the fragmentation of proteins accompanied by a reduction of the IgE binding (Cabanillas and Novak, 2017).

The walnut, within the group of tree nuts, is a product set by the European Union that causes allergy or intolerance. To protect consumers, and in accordance with Regulation 1169/2011, it is mandatory to indicate this ingredient when it is used in the manufacture or preparation of a food and still present in the finished product, even if in an altered form (The European Parliament and the Council of the European Union, 2011). Therefore, food manufactures have the responsibility to declare the presence of walnut on packaged foods even when trace residues may be present from the use of shared equipment or the adventitious contamination of ingredients (Niemann et al., 2009; Van Hengel, 2007).

There are several methods available for the detection of walnut allergens in food products. However, immunochemical assays such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are by far the most widely used to detect and quantify walnut allergens or proteins, due to their direct assessment of the allergen or marker protein, low set-up cost, moderate running time and no special requirements for expertise

* Corresponding author.

E-mail address: tgarcia@ucm.es (T. García).

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.01.017>

Received 26 May 2017; Received in revised form 8 January 2018; Accepted 20 January 2018
 Available online 03 February 2018

0889-1575/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

IV.2.

SURVEY OF COMMERCIAL FOOD PRODUCTS FOR DETECTION OF WALNUT (*JUGLANS REGIA*) BY TWO ELISA METHODS AND REAL TIME PCR

La detección de alérgenos en los alimentos es muy importante y requiere una especificidad y sensibilidad determinada para detectar cantidades muy pequeñas de alérgenos en alimentos procesados. En el presente estudio se analizaron 100 muestras de alimentos comerciales con tres técnicas diferentes para la detección de nuez: un kit de ELISA tipo sándwich basado en anticuerpos policlonales, un ELISA directo utilizando un scFv multimérico y una PCR en tiempo real. El método más sensible fue la PCR en tiempo real, seguido del kit ELISA en sándwich y el ELISA con scFv multimérico. A su vez, el kit ELISA se vio menos afectado por el tratamiento térmico de las muestras que el ELISA directo con scFv multimérico, pero presentó mayor reacción cruzada con la pacana, y esos falsos positivos tuvieron que confirmarse mediante PCR en tiempo real. En cuanto al análisis de los 100 productos comerciales, entre el 7 y el 12,6 % de las muestras contenían nuez, pero no la declaraban, lo que indica un riesgo para los consumidores alérgicos a la nuez. Solo hubo una muestra que declaraba nuez en el etiquetado pero no se detectó con ninguna técnica. Los resultados confirman que el uso complementario de las diferentes técnicas permite una verificación fiable del etiquetado de alérgenos.

Raquel Madrid, Aina García-García, Pablo Cabrera, Isabel González, Rosario Martín, Teresa García (2021). Survey of commercial food products for detection of walnut (*Juglans regia*) by two ELISA methods and Real Time PCR. *Foods*, 10, 440. <https://doi.org/10.3390/foods10020440>

Publicado en *FOODs*

Índice de impacto (2021): 5,561

Posición en JCR (2021): 35/143



Article

Survey of Commercial Food Products for Detection of Walnut (*Juglans regia*) by Two Elisa Methods and Real Time PCR

Raquel Madrid, Aina García-García, Pablo Cabrera, Isabel González, Rosario Martín and Teresa García *

Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain; raqmad01@ucm.es (R.M.); ainagarcia@ucm.es (A.G.-G.); pablocabrera@gmail.com (P.C.); gonzalzi@vet.ucm.es (I.G.); rmartins@vet.ucm.es (R.M.); tgarcia@vet.ucm.es (T.G.)

* Correspondence: tgarcia@vet.ucm.es; Tel.: (+34)-91-394-3747

Abstract: Labeling of food allergens in accordance with legal regulations is important to protect the health of allergic consumers. The requirements for detecting allergens in foods involve adequate specificity and sensitivity to identify very small amounts of the target allergens in complex food matrices and processed foods. In this work, one hundred commercial samples were analyzed for walnut detection using three different methods: a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit based on polyclonal antibodies, a direct ELISA using a recombinant multimeric scFv, and a real time PCR. The most sensitive method was real time PCR followed by sandwich ELISA kit and multimeric scFv ELISA. There was agreement between the three methods for walnut detection in commercial products, except for some heat-treated samples or those that contained pecan. The walnut ELISA kit was less affected by sample processing than was the multimeric scFv ELISA, but there was cross-reactivity with pecan, producing some false positives that must be confirmed by real time PCR. According to the results obtained, 7.0 to 12.6% of samples (depending on the analytical method) contained walnut but did not declare it, confirming there is a risk for allergic consumers. Moreover, there was one sample (3.7%) labelled as containing walnut but that tested negative for this tree nut. Genetic and immunoenzymatic techniques offer complementary approaches to develop a reliable verification for walnut allergen labeling.

Keywords: ELISA; food allergen labeling; food analysis; polyclonal antibody; real time PCR; ScFv recombinant antibody; walnut detection

Citation: Madrid, R.; García-García, A.; Cabrera, P.; González I.; Martín R.; García T. Survey of Commercial Food Products for Detection of Walnut (*Juglans regia*) by Two Elisa Methods and Real Time PCR. *Foods* **2021**, *10*, 440. <https://doi.org/10.3390/foods10020440>

Academic Editor: Nanju Alice Lee

Received: 26 January 2021

Accepted: 12 February 2021

Published: 17 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Regular consumption of walnuts is increasing because they are associated with beneficial effects on human health, providing protection against the development of cardiovascular-related diseases, age-related neurological disorders, and even some cancer types [1]. Walnut (*Juglans regia* L.) is eaten raw or used for the manufacture of sauces, yoghurts, sweets, oils, beverages, and as an ingredient to improve the quality of food products.

On the other hand, the presence of walnut as a hidden allergen in many processed foods constitutes a serious risk for developing adverse reactions in allergic patients, from oral allergy symptoms to anaphylaxis [2]. Sensitization to walnut storage proteins is primarily acquired during childhood, although it can also be acquired at a later age. Moreover, in certain populations, IgE levels to storage proteins Jug r 1, Jug r 4, and vicilin fractions, but not to nonspecific lipid transfer proteins and PR-10 proteins, correlate with systemic reactions to walnut [3]. The prevalence of walnut allergy in Europe (Ig E sensitization to Jug r 4 and clinical reaction) has been reported as between 0.1 and 0.35%, with the highest percentage observed in Madrid [4]. The minimum amount of walnut protein that elicits an allergic reaction in 5% of the sensitized population is estimated to be 3–4 mg [2]. Nevertheless, individual variability of reaction thresholds to food allergens is high [5].

Walnut belongs to one (nuts) of the 14 allergenic foods that must be declared in food labelling in the European Union [6]. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) are currently used for the detection and quantification of allergenic proteins present in commercial products, and several ELISA kits are available for walnut detection with different sensitivities and cross-reactions [7]. In addition to immunoassays, highly sensitive polymerase chain reaction (PCR) techniques using walnut-specific primers are also available for the detection and quantification of walnut in food products [8,9]. Recently, there have been many cutting-edge advances that improve the sensitivity of allergen detection and quantification and take into account different food matrices as well as the effect of food processing, such as biosensors and MS methods [10]. However, when using MS-based methods to analyze allergens in food, the high cost of their platform, maintenance costs, and the need for professionals must be considered [11]. Improvement of such methods, together with the establishment of eliciting doses in the sensitized population, will allow more reliable verification of labelling compliance of food products, avoiding excessive precautionary allergen labelling (PAL) that produces a loss of confidence of the allergic consumers, and increasing the number of safe products at their disposal [12,13].

In this work we compared three different methodologies for walnut detection in food products (a direct ELISA using a recombinant antibody, a commercial sandwich ELISA kit, and a walnut real time PCR method) to consider their applicability for labelling verification regarding the detection of walnut allergens in commercial food products.

2. Materials and Methods

2.1. Materials and Chemicals

TBS (Tris-buffered saline) composition was 0.05 M Tris-HCl and 150 mM NaCl, pH 7.6. TBST was TBS containing 0.05% Tween 20. The protein extraction buffer consisted of 0.035 M phosphate solution containing 1 M NaCl, pH 7.5. Sample buffer was 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 6.8, 10% SDS, 20% glycerol, 0.5% bromophenol blue as the tracking dye, and 5% β -mercaptoethanol. Transfer buffer consisted of 0.025 mol L⁻¹ Tris, pH 8.3, 0.192 mol L⁻¹ glycine, and 200 mL L⁻¹ methanol. Unless otherwise stated, chemicals were provided by Sigma (Darmstadt, Germany).

The AlerTox® Walnut ELISA kit (KT-5909, Biomedal Diagnostics, Sevilla, Spain) included the following components: 8 well separable strips coated with walnut specific polyclonal antibodies, walnut standards (50, 15, 5, 2, and 0 mg kg⁻¹), conjugate solution, substrate solution Tetramethylbenzidine (TMB), stop solution (contains H₂SO₄), sample extraction and dilution buffer, and washing solution (compositions not provided).

2.2. Experimental Binary Mixtures

Four different ground walnut products were used as reference materials: a) raw peeled walnut (RPW), consisting of walnuts finely ground (IKA® A11 analytical mill, Staufen, Germany) after the removal the thin soft and edible seed coat (*testa*); b) toasted peeled walnut (TPW), consisting of RPW subjected to baking at 160 °C for 13 min (Heraeus, Hanau, Germany); c) raw unpeeled walnut (RUPW), consisting of walnuts with *testa*, finely ground; and d) toasted unpeeled walnut (TUPW), consisting of RUPW baked at 160 °C for 13 min. To prepare the RPW reference material, the shelled walnuts were placed in a water bath at 90 °C for 1 min, and then quickly transferred to an iced water bath for another minute before pulling the skin off with sterile forceps.

To evaluate the sensitivity of the assay, and to use as reference samples, binary mixtures of corn flour and ground walnut were prepared using a mill (IKA A11). Four binary mixtures were prepared, containing from 10⁵ to 1 mg kg⁻¹ of RPW, TPW, RUPW, or TUPW in corn flour. A concentration of 10⁵ mg kg⁻¹ was prepared by adding 3 g of ground walnuts to 27 g of corn flour. Concentrations of 10⁴ to 1 mg kg⁻¹ were made in a similar way with the previous mixtures. All the mixtures were stored in screw capped vials at -20 °C.

2.3. Heterologous Species and Commercial Products

A wide variety of tree nuts, vegetal and animal species, and commercial food products were purchased at different local stores and markets in Madrid (Spain). Commercial walnuts from Spain and California and pecans from USA and Mexico were considered for analysis. All food samples (50 g) and heterologous species (5 g) were finely ground using an IKA A11 analytical mill and stored in screw capped vials at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4. Protein and DNA Extraction

Protein extracts from food samples to be analyzed with a commercial sandwich ELISA kit (Biomedal Diagnostics, Sevilla, Spain) were obtained according to the method recommended by the supplier. Briefly, 0.5 g of the ground sample were mixed with 10 mL of kit extraction buffer, incubated for 15 min in a water bath at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ with vortex mixing every two minutes, centrifuged for 10 min at 2000 g, and the supernatant was filtered through a $0.45\text{ }\mu\text{m}$ syringe filter (Sartorius, Göttingen, Germany). The test was carried out according to the manufacturer's instructions with minor variations.

For multimeric scFv ELISA analysis, each food sample (0.2 g) was mixed with 1.2 mL of protein extraction buffer, and the mixture was shaken for 10 min at room temperature in a vertical rotator (HulaMixer Sample Mixer, Invitrogen, Carlsbad, TX, USA) to extract soluble proteins. The slurry was centrifuged at 10,000 g for 10 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, and the supernatant was filtered through a $0.45\text{ }\mu\text{m}$ syringe filter (Sartorius, Göttingen, Germany).

DNA extraction and purification for real time PCR analysis of samples was performed as previously described [9]. The DNA obtained from Wizard DNA Clean-up System kit (Promega, Madison, WI, USA) was eluted in $50\text{ }\mu\text{L}$ of sterile deionized water, and DNA concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, Denmark).

A negative control, without sample, was included in every protein or DNA extraction. All protein and DNA extracts were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.5. Sandwich ELISA Kit for Detection of Walnut in Food Samples

The test was carried out according to the manufacturer's instructions with minor variations (Biomedal Diagnostics, Sevilla, Spain). One hundred microliters of undiluted or diluted (1:5, 1:10, 1:25 in protein extraction buffer) sample extract or controls were added to the wells of the provided coated plate for walnut specific antibody. After 20 min incubation at room temperature ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$), the wells were washed ten times with $200\text{ }\mu\text{L}$ of 1X washing solution. Then, $100\text{ }\mu\text{L}$ of conjugate solution was added to the wells, incubated for 20 min at room temperature, and washed again. Following 20 min incubation with $100\text{ }\mu\text{L}$ of substrate solution, $100\text{ }\mu\text{L}$ of stop solution were added, and the yellow signal was measured at 450 nm in a spectrophotometer (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Germany). A negative extraction control (without sample) and the 0 mg kg^{-1} standard were included in all trials, and each sample was analyzed in duplicate. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated as the concentration of the target protein that presents an absorbance value higher than the blank (corn flour) plus 3 or 10 times, respectively, its standard deviation [14]. A concentration–response curve using the standards provided by the kit was generated by plotting the absorbance values vs. the walnut concentration. The standard curve obtained was fitted to the four-parameter logistic equation using Origin 8.0 software (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) and compared with curves obtained plotting the RPW, TPW, RUPW, and TUPW absorbances undiluted or diluted 1:5 or 1:25 with protein extraction buffer. Cross-reactivity of the assay was calculated for eight tree nuts and soybean, as the amount of walnut estimated by interpolating the absorbance values of undiluted extracts in the logistic equation obtained with the kit calibrants.

2.6. Direct ELISA with Multimeric scFv

A direct ELISA using walnut-specific multimerized JrBSF-scFv (*Juglans regia* Biotinylated Soluble Fragment-single chain antibody, multimerized with ExtrAvidin-HRP) was also used to detect walnut protein [15].

The wells of microtiter plates (F96 MaxiSorp Nunc immunoplates, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) were coated for 16 h at 4 °C with 100 µL of the protein extracts diluted 1:100 in PBS. After washing three times with TBS, they were blocked with 200 µL of 3% bovine serum albumin (BSA) in TBS for 1 h at 37 °C and washed again. One hundred microliters of multimerized scFv (2 mg mL⁻¹) diluted 1:500 (v/v) in TBST containing 1% BSA was added to each well, and the plates were shaken for 2 h at room temperature and washed again. Then, 100 µL TMB substrate solution was added to each well, and the plates were incubated with shaking for 10 min before addition of 50 µL 1M sulfuric acid and measurement of Absorbance at 450 nm. All experiments were performed in duplicate on three different days. Three different concentrations of walnut in corn flour (10⁵, 10³, and 0 mg kg⁻¹) were included in each plate as internal controls. A commercial product was considered positive for walnut when its absorbance value was higher than that of the 10³ mg kg⁻¹ standard.

2.7. Real time PCR Analysis

Real time PCR analysis of commercial samples was performed using walnut specific primers (WalITSdir/WalITSinv) and probe (WalITSP) or pecan specific primers (PecITSdir/PecITSinv) and probe (PecITSP) as described in López-Calleja et al. [9] and Table 1. All real time PCR analyses were carried out in duplicate for each DNA extract, together with their corresponding 18S endogenous control. The use of this endogenous control is important to normalize RT-PCR results, because the 18 S rRNA gene has a very stable expression level [16].

Table 1. DNA sequences and description of the pecan (AF303825) and walnut (HE574850) primers and probes to develop a real time PCR [9].

Detected Species	Primer and Probe	Length (bp)	Sequence (5' → 3')	nM	Cycling Conditions
Walnut	WalITSdir	20	GACAATCGGTGGTTGAGAAA	300	Initial denaturation: 10 min 95 °C Amplification: 50 cycles at 95 °C for 5 s 60 °C for 30 s 72 °C for 1 s Cooling: 40 °C for 30 s.
	WalITSinv	20	GTCGAGGAGCACCTTCACAG	900	
Pecan	WalITSP	18	6FAM-TGACCCGTCGTGTGTT-GCCC-BBQ	2000	
	PecITSdir	18	ATGAAAGCTGCCACCCG	300	
	PecITSinv	18	CATTGTTGACCGGAAG	900	
18S	PecITSP	19	6FAM-CGGGTCAG-TCTCCTCGTTC-BBQ	2000	
	18Sdir	16	TGGTGCCAGCAGCCGC	300	
	18Sinv	25	TCCAACCTAC-GAGCTTTTAACTGCA	900	
	18SP	22	6FAM-CGCTATTGGAGCTG-GAATTACC-BBQ	2000	

The PCR was carried out using the LightCycler® TaqMan® Master (Roche Molecular Systems, Mannheim, Germany) in a total reaction volume of 10 µL in glass capillary tubes.

2.8. SDS-PAGE and Western Blotting Analysis

Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [17], was performed using polyacrylamide gels (12% resolving gel and 4% stacking gel) in a Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at 90 V for 45 min. After electrophoresis, one third of the gel was stained with Blue safe (NZytech, Lisbon, Portugal) and the other two-thirds were transferred into methanol-activated polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Immuno-Blot PVDF membranes; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at 400 mA for 45 min using a Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). The membranes were then blocked with 3% BSA in TBS for 1 h at 37 °C, washed three times with TBS, and incubated overnight at 4 °C with walnut specific JrBSF scFv diluted 1:1000 in TBST containing 1% BSA (TBST-BSA). After washing three times with TBS, one of the membranes was incubated for 2 h at 37 °C with Horseradish Peroxidase (HRP) conjugated anti-6X His tag® antibody (ab1187) (AbCam plc, Cambridge, UK) diluted 1:5000 in TBST-BSA, washed three times with TBST, and revealed with the chemiluminescent substrate Clarity Western ECL (Bio-Rad). The other membrane was incubated with 1:5000 dilution of anti-c-Myc monoclonal antibody (9E10) (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), followed by 1:20,000 dilution of alkaline phosphatase (AP) conjugated anti-mouse IgG (Sigma, Darmstadt, Germany) in TBST-BSA, for 1 h at 37 °C, then washed three times with TBST and revealed with AP chromogenic substrate (Thermo Fisher Scientific). The Western blotting membranes were scanned using a ChemiDoc XRS system (Bio-Rad) to visualize bands.

2.9. Protein Identification

Bands of interest from the Blue Safe stained SDS-PAGE gel were cut out with a sterile scalpel and immersed in 5% acetic acid solution. Proteins were then gel reduced, alkylated, and digested with trypsin according to Sechi and Chait [18]. Analysis of peptides from protein digestion was performed using the 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer mass spectrometer (Applied Biosystems, MDS Sciex, Toronto, Canada), at the Proteomic Unit of Complutense University of Madrid (Spain). Peptide mass fingerprint and some peptide fragmentation spectra were combined and searched for in the MASCOT v2.3 search engine (<http://www.matrixscience.com>) through the Global protein Server (Applied Biosystems) against the NCBI database (17,919,084 sequences; 6,150,218,869 residues) without taxonomy restriction or search parameters: carbamidomethylcysteine was used as the fixed modification and oxidized methionine was used as the variable modification; peptide mass tolerance 80 ppm; 1 missed trypsin cleavage site allowed, and MS/MS fragments tolerance, 0.3 Da.

The applied probability filter was that set by the search engine software itself, in this case MASCOT, which uses its own probability algorithm. Thus, in all protein identification, the probability scores were greater than the score fixed by MASCOT as significant with a *p*-value lower than 0.05.

3. Results and Discussion

3.1. Evaluation of the Sandwich ELISA Kit for Detection of Walnut

The Walnut ELISA kit (Biomedal) is a sandwich-type immunosorbent assay designed for the detection and quantification of walnut in food products using specific polyclonal antibodies.

According to the supplier, this kit does not show cross-reactions against 30 food matrices. To verify specificity, eight matrices were analyzed in this work, and the absorbance values obtained were interpolated in the logistic equation ($y = A_2 + (A_1 - A_2)/(1 + (x/x_0)^p)$) where A_1 is the minimum absorbance for no analyte (background signal), p is the curve slope at the inflection point, x_0 is the x value at the inflection point, and A_2 is the maximum absorbance at infinite concentration; being $A_1 = 0.01445$, $A_2 = 2.02251$, $x_0 = 9.72293$, $p = 1.35762$, and $R^2 = 0.9949$, obtained with the standards provided to calculate cross-reactivity (Table 2). Cross-reactivity to almond, not included in the kit list, was 2.38 mg kg⁻¹.

Moreover, cross-reactivity to pecan nut was 3.04 mg kg^{-1} , higher than the 0.82% indicated in the kit manual. The LOD and LOQ values calculated in this work using the standard curve were 2.2 mg kg^{-1} and 3.3 mg kg^{-1} , respectively, being slightly higher than those indicated in the kit manual (0.6 mg kg^{-1} and 2 mg kg^{-1} , respectively). Thus, the sensitivity of this method is similar to other commercial ELISA techniques for walnut detection in food matrices [19].

Table 2. Determination of cross-reactivity with heterologous species using the sandwich ELISA kit for walnut.

Sample	ABS 450 nm	SD	Estimated Walnut concentration (mg kg^{-1})
Walnut	3.055*	0.112	*
Pecan	0.358	0.019	3.04
Almond	0.274	0.052	2.38
Hazelnut	0.007	0.002	ND
Cashew	0.022	0.003	ND
Pistachio	0.041	0.006	ND
Macadamia nut	0.029	0.015	ND
Brazil nut	0.014	0.011	ND
Peanut	0.055	0.008	ND
Soja	0.008	0.021	ND

ND: Not detected. Below the detection limit using the standard curve of the sandwich ELISA kit (2 mg kg^{-1} , $A_{450} = 0.261$). *: Undiluted extract of the 100 mg kg^{-1} walnut/corn flour mixture. Above the limits of standard curve. Points represent the mean value \pm SD ($n = 2$; 3 independent experiments).

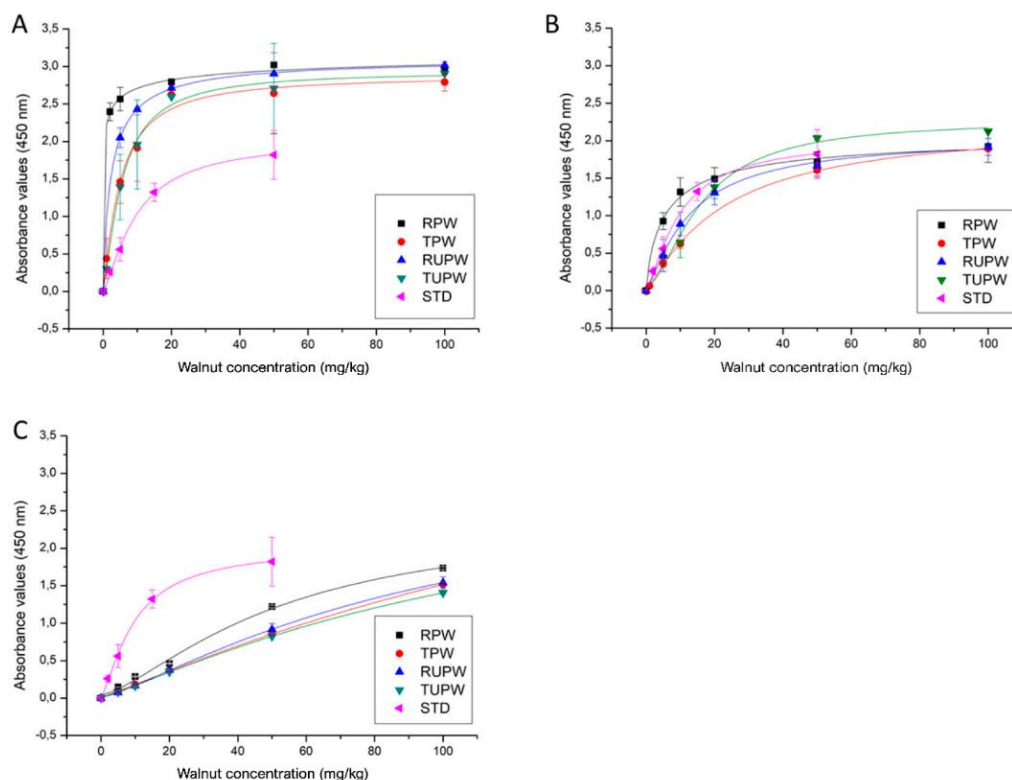


Figure 1. ELISA results obtained from experimental walnut/corn flour binary mixtures prepared with raw peeled walnut (RPW, ■), toasted peeled walnut (TPW, ●), raw unpeeled walnut (RUPW, ▲), and toasted unpeeled walnut (TUPW, ▼) using the Alertox® walnut ELISA kit. The protein extracts from binary mixtures were used undiluted (A) or diluted 1:5 (B) or 1:25 (C) in protein extraction buffer, and results were compared with the standard curve obtained with the ready-to-use standards provided with the kit (STD, ▲). Points represent the mean value \pm SD ($n = 2; 3$ independent experiments).

Binary mixtures of walnut in corn flour ($100 - 1 \text{ mg kg}^{-1}$) were analyzed following the manufacturer's directions to evaluate the sensitivity of the kit with food samples. The absorbance values obtained from extracts of the binary mixtures made with peeled and unpeeled walnuts and with raw and toasted walnut ($160 \text{ }^\circ\text{C}$ for 13 min) were plotted against the walnut concentration in the ground mixtures, and compared to the calibration curve obtained using the standards ($50, 15, 5, 2,$ and 0 mg kg^{-1}) provided with the kit. The four curves of the experimental mixtures were similar, indicating that the presence of the testa (rich in polyphenols) and toasting [20] do not negatively affect detection of walnut with this kit (Figure 1).

It should be noted that the absorbance values obtained from the undiluted extracts of the binary mixtures (following the manufacturer's instructions for sample analysis) were much higher than those obtained for the standard calibration curve (Figure 1A), whilst those obtained with sample extracts diluted 1:5 in the protein extraction buffer were closer to those of the standard calibration curve (Figure 1B). Despite this result, the commercial products were analyzed undiluted to obtain a greater sensitivity to the detection of undeclared walnut, even though quantification would not be reliable. These results reflect that the food matrix could influence the extraction efficiency and absorbance values obtained with the kit.

3.2. Evaluation of the Walnut Direct ELISA with Multimeric scFv

The specificity and sensitivity of the multimeric scFv ELISA for the detection of walnut were previously assessed [15]. The LOD was 1616 mg kg^{-1} , and some cross-reactivity was found with pecan (2.25%) and almond (0.35%), but not with the remaining tree nuts analyzed.

The binary mixtures made with raw peeled walnut in corn flour were analyzed with the walnut ELISA kit and multimeric scFv ELISA to compare performance (Figure 2). The results obtained confirmed that the LOD of the polyclonal antibody ELISA kit is three logarithmical units lower than that of the recombinant antibody-based ELISA.

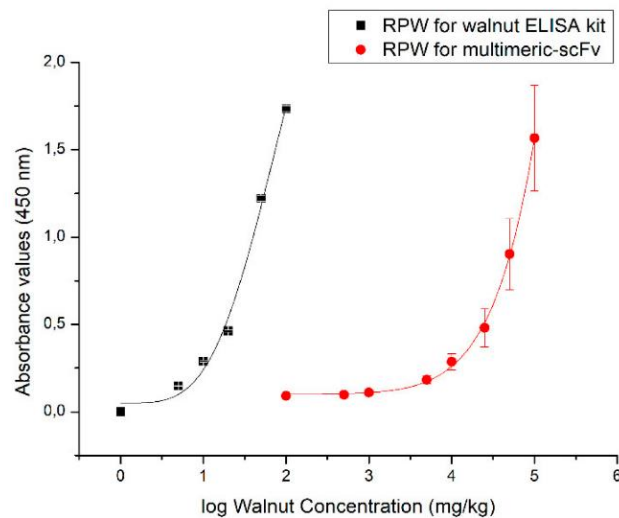


Figure 2. Standard curves obtained from experimental binary mixtures (raw peeled walnut samples in corn flour), analyzed with the Alertox® walnut ELISA kit (■) and the multimeric scFv ELISA (●). Protein extracts were prepared according to directions of each method and diluted 1:25 (ELISA kit) or 1:100 (scFv ELISA) in PBS for comparison. Points represent the mean value \pm SD ($n = 2$; 3 independent experiments).

3.3. Identification of the Walnut Proteins Recognized by the JrBSF scFv

The JrBSF scFv was isolated from a phagemid synthetic library of human scFv fragments (Tomlinson I, Source Bioscience, Nottingham, UK) by phage display against a walnut protein extract [15]. However, the walnut protein fraction recognized by the phage-antibody was not identified. Western blotting analysis demonstrated that a walnut protein band of approximately 15 kDa size was detected by the scFv (square in Figure 3A), as developed with the anti-c-Myc and anti-His tag antibodies (Figure 3B, C). A weak reactivity was also observed in Figure 3B with other higher Mw bands present in both walnut and pecan extracts that corresponded to sizes of approximately 35 kDa and 45 kDa. This result may explain the slight cross-reactivity with pecan observed in the walnut multimeric scFv ELISA.

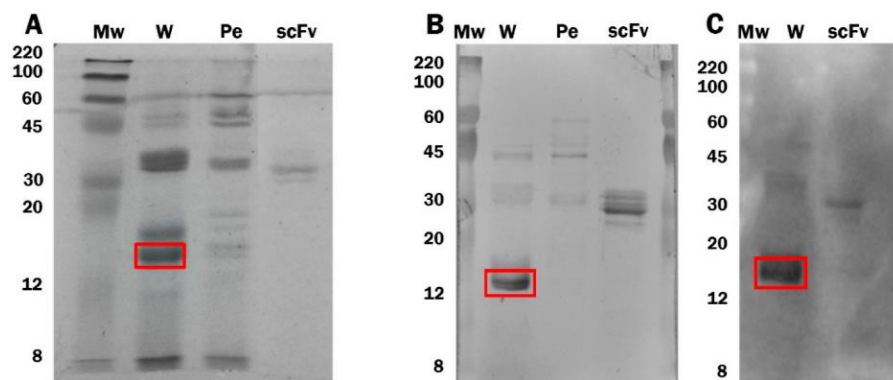


Figure 3. SDS-PAGE electrophoresis (**A**) and JrBSF scFv immunoblots (**B**, **C**) of 10 μ g walnut extract (W), 10 μ g pecan extract (Pe), and 2 μ g purified JrBSF (scFv). Mw of the protein marker bands (ColorBurst™ Electrophoresis Protein Marker, Sigma) is indicated. JrBSF scFv in the immunoblots was detected either with Anti-c-Myc monoclonal antibody (9E10) and alkaline phosphatase (AP) conjugated anti-mouse IgG (**B**) or with horseradish peroxidase (HRP) conjugated Anti-6X His tag® antibody (ab1187) (**C**).

A proteomic approach was used to confirm the identity of the protein band recognized by the antibody. Nineteen peptides of the 11S globulin seed storage protein 2-like (Jug r 4) from *Juglans regia* (Accession Number: XP_018818401.1) were identified by MALDI-TOF/TOF (Table 3) in the electrophoretic band, with 31% of sequence coverage (Figure 4).

It is remarkable that the JrBSF scFv specifically recognizes the walnut 11S globulin Jug r 4, which is a relevant minor allergen recognized by 27% of walnut allergic adults and has a predictive value of 90% for walnut allergy [21]. Jug r 4 (11S globulin or legumin) is a high molecular weight protein (approx. 350 kDa) consisting of six subunits forming a hexameric structure that presents an intermediate thermal stability. Intense roasting at 180 °C for 20 min has been reported to increase detection of walnut 11S globulin by LC-MS/MS, possibly due to increased digestibility [22]. However, allergenicity seems to be affected by a great amount of proteolysis and high pressure treatments [20,23].

Table 3. Peptides identified by MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry and the MASCOT Database Search engine. Protein scores greater than 83 were significant ($p < 0.05$).

Gel band	Protein identification	Accession number	Sequence coverage	Total score	Peptide sequences
1	11S globulin seed storage protein 2-like [<i>Juglans regia</i>]	XP_018818401.1	31%	107	R.FRSFLLAGGEPR.D R.IRHNLDQTESDVFSR.Q R.HNLDQTESDVFSR.Q R.VNIVNQHKLPILR.Y K.GHLFPNALYTPHWS-MTDNR.V R.VQIVDDNGDNVFDER.V R.VQIVDDNGDNVFDERVKK.R K.RGDVYVIPQFYATTAR.A R.GDVYVIPQFYATTAR.A R.AGNNGFEYVTIK.T K.TSGQPMKSPMAGYTS-VIR.A K.TSGQPMKSPMAGYTS-VIR.A K.TSGQPMKSPMAGYTS-VIR.A K.SPMAGYTSVIR.A R.AMPIDVLTNSFQMSPR.E R.AMPIDVLTNSFQMSPR.E K.HNRGHQSFLSSSR.S R.GHQSFLSSSR.S

```

1  MAAKIVLALV LSELLVYASSE ETNPTACKGS SQQCRLKRLR TLEPTRVVDV
51  EGGRTTELWEE SEDEFQCAGV AAIRQTVQPN SLILPSYQPT PSLVYIEQGE
101 GLLGLTYPGC AETYESETSQ DLSRRRSSQM GQLQGGGDDQ RSRRADQHQQ
151 VNRIRRGDIV AIPAGVAHWS YNDGNEELVA FAVIDLNSHA NQLDRRFRSF
201 LLAGGEPRDG QSGQGGSRQE ERQEQRSQRS RREQRGSFON IFSGFSEELL
251 AEAYNIPDTI ARRLQEDDNR RGVIVKQDE MRRMRPDED EQEGQRQLVN
301 GLEETLCTTR IRHNLDQTE SDVFSRQAGR VNIVNQHKLP ILRYLDMSAE
351 KGHLPNALY TPHWSMTDNR VVYVLRGDAR VQIVDDNGDN VFDERVKRGD
401 VYVIPQFYAT TARAGNNGFE YVTIKTSGQP MKSPMAGYTS VIRAMPIDVL
451 TNSFQMSPRE AQLKHNRRGH QSFLSSSR S

```

Figure 4. Alignment of peptides identified by MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry and the MASCOT Database Search engine in the 11S globulin seed storage protein 2-like (*Juglans regia*) (Accession Number: XP_018818401.1).

3.4. Analysis of Commercial Products

One hundred samples of commercial products acquired at different stores in Madrid were analyzed, including bakery and pastry products, energy bars, chocolates, ice creams, yoghurts, beverages, sauces, and prepared dishes. The samples were classified into five groups depending on their content of walnut and other nuts as declared on their labelling

(Table 4). Only three of the commercial samples analyzed were non-pre-packaged products (a handmade bread and two sandwiches), and they included walnuts in the list of ingredients.

Table 4. Determination of the presence of walnut in commercially processed food products using multimeric scFv ELISA, Alertox® Walnut ELISA kit, and real time PCR.

Label statement	Product	Number of samples	Multimeric scFv ELISA	Walnut kit Alertox®	ITS real time PCR
Walnut declared as ingredient	Biscuit	5	+ (5)	+ (5)	+ (5)
	Nut bar	5	+ (5)	+ (5)	+ (5)
	Breakfast cereals	1	+ (1)	+ (1)	+ (1)
	Chocolate	2	+ (1)/ - (1)	+ (1)/ - (1)	+ (1)/ - (1)
	Sauce	1	- (1)	+ (1)	+ (1)
	Bread	3	+ (3)	+ (3)	+ (3)
	Beverage	1	- (1)	+ (1)	+ (1)
	Ice cream	1	- (1)	+ (1)	+ (1)
	Snack	1	+ (1)	+ (1)	+ (1)
	Yoghurt	5	- (5)	+ (5)	+ (5)
	Sandwich	2	+ (1)/ - (1)	+ (2)	+ (2)
	May contain walnut	Chocolate	1	- (1)	- (1)
Yoghurt		1	- (1)	- (1)	- (1)
Contains other tree nuts	Biscuit	4	- (4)	- (4)	- (4)
	Nut bar	9	- (9)	- (9)	- (9)
	Breakfast cereals	10	+ (5) / - (5)	+ (7) / - (3)	+ (6) / - (4)
	Chocolate	2	- (2)	- (2)	- (2)
	Breadstick	1	- (1)	- (1)	- (1)
	Beverage	2	- (2)	- (2)	- (2)
May contain tree nuts traces	Ice cream	2	- (2)	- (2)	- (2)
	Biscuit	6	- (6)	- (6)	- (6)
	Nut bar	5	- (5)	- (5)	- (5)
	Breakfast cereals	3	- (3)	- (3)	- (3)
	Chocolate	10	- (10)	+ (2) / - (8)	+ (3) / - (7)
	Beverage	1	- (1)	- (1)	- (1)
	Ice cream	1	- (1)	- (1)	- (1)
Not declaring nuts or traces as ingredient	Biscuit	3	- (3)	- (3)	- (3)
	Nut bar	1	- (1)	- (1)	- (1)
	Breakfast cereals	3	- (3)	- (3)	- (3)
	Chocolate	1	- (1)	- (1)	- (1)
	Sauce	1	- (1)	- (1)	- (1)
	Bread	1	- (1)	- (1)	- (1)
	Beverage	2	- (2)	- (2)	- (2)
	Ice cream	2	- (2)	- (2)	- (2)
	Snack	1	- (1)	- (1)	- (1)

Commercial food products showing estimated walnut concentration lower than the limit of detection (LOD) in ELISA methods, or below 0.1 mg kg⁻¹ in PCR, were considered negative. The number in the basket is the number of samples.

Walnut content was analyzed using the two ELISA methods (direct multimeric scFv and sandwich walnut ELISA kit). In order to avoid false positive ELISA results due to

cross-reactions with pecan of the polyclonal (sandwich ELISA kit) and recombinant (multimeric JrBSF scFv) antibodies, the commercial food samples were also analyzed using the previously developed walnut-specific and pecan-specific real time PCR methods [9]. The limit of detection of both real time PCR methods was established at 0.1 mg kg^{-1} . Depending on the level of sensitivity of an allergic person (minimal eliciting dose of an individual), exposures to undeclared allergens on products can pose a risk to the food-allergic population. Keeping in mind that it is not possible to accurately assess the amount of allergen that is necessary to elicit an allergic reaction, exposure to 0.03 mg of walnut has been suggested to cause an allergic reaction in one out of every hundred susceptible patients, and 0.08 mg of walnut in 5% of the susceptible patients [24]. According to these eliciting doses, not only the real time PCR technique, but also the walnut ELISA kit and the multimeric scFv ELISA, would be able to detect walnut amounts that could cause allergic reaction to most sensitive consumers ($0.01 \text{ }\mu\text{g}$ and $0.267 \text{ }\mu\text{g}$ walnut per well, respectively) in samples not affected by intense food processing. Nevertheless, in contrast to ELISA techniques, the real time PCR methods are not able to detect or quantify the nut allergens, but rather detect the DNA of the allergenic nut species [8].

Some of the 27 products declaring walnut as an ingredient tested negative for walnut in one or more of the analytical methods used. Walnut was detected in only 17 processed foods by multimeric scFv ELISA, although 26 samples tested positive in the walnut ELISA kit and in the walnut real time PCR. One chocolate sample tested negative for walnut by the three methods (3.7%). The percentage of walnut in the chocolate product (a mousse cream filled chocolate) was not specified, but walnut was declared in the list of ingredients. The protein content of these chocolates is low ($4.7 \text{ g}/100\text{g}$) and the epitope recognized by the scFv may have been denatured by chocolate processing [19] or may have formed an aggregate with the polyphenols [25], explaining the negative ELISA results. Considering that the real time PCR method did not detect walnut or pecan, the sample is likely to be mis-labelled. However, chocolate is a food matrix rich in polyphenols that can interfere with analytical methods, and false negatives cannot be completely excluded.

The nine products that tested negative only in the multimeric scFv ELISA included a sauce (1), beverage (1), yoghurts (5), ice-cream (1), and sandwich (1). This conflicting result could be explained either by the higher LOD of the multimeric scFv ELISA or by denaturation of the epitope recognized by the scFv due to food processing. It should be noted that the manufacture of these products includes at least a pasteurization treatment, or high hydrostatic pressure treatment in the case of the sandwich sample. This effect has been described by other researchers when analyzing the presence of allergens in heat-treated liquid food samples [7,20]. Furthermore, one of the yogurt samples declared to contain 0.1% walnuts (1000 mg kg^{-1}), which is lower than the LOD of the multimeric scFv ELISA (1616 mg kg^{-1}).

The second group of commercial samples included a precautionary allergen labelling (PAL) regarding walnut content, such as "may contain traces of walnut". The two samples belonging to this group produced a negative result with the three methods used for analysis, indicating that walnut or traces thereof were not present in these samples. It should be stated that it is difficult to find commercial products that indicate the possibility of containing walnut traces. It is more frequent to find the indication of the possible presence of traces of nuts, as a group, in which this species is also included, but not individually.

Among the 30 products that included one or more tree nut species different than walnut in their ingredients list (Table 4), there were seven out of the ten breakfast cereals that tested positive for walnut by at least one method. All the seven positive samples contained pecan or a mixture of pecan with other nuts, as verified by pecan specific real time PCR. Cross-reactivity with pecan is usually found in all ELISA methods available for walnut detection [23,26]. Therefore, the ELISA methods would be detecting a cross-reaction with pecan. On the other hand, the six samples that tested positive by walnut real time PCR contained around 300 mg kg^{-1} of walnut. According to these PCR results, six of the samples contained both walnut and pecan, while the sample that tested positive only in

the walnut ELISA kit contained only pecan and should be considered a false positive for walnut. Therefore, it is not possible to ascertain in these samples whether the ELISA results are detecting walnut and/or pecan.

From 26 samples labelled as containing traces of other nuts, different than walnut, that were analyzed, three of them belonging to chocolates (3) turned out to be positive. Walnut was detected by PCR in one of the chocolate samples analyzed at a concentration of 230 mg kg⁻¹, even though it was negative in the ELISA methods. This may be due to a cross-contamination of the sample, since it was not detected by any immunoenzymatic assay, and the low levels of walnut present in the sample may show unintentional contamination either in raw materials or in the equipment or environment of the food industry. Another reason for not being able to detect walnut in the chocolate samples may be due to the presence of chocolate phenolics that bind walnut proteins and form complexes that inhibit their recognition [25,27]. Among the chocolate samples, two of them were positive by the walnut ELISA kit and real time PCR, so these products were incorrectly labelled.

According to these results, 7.0 to 12.6% of samples (depending on the analytical method) contained walnut but did not declare it, confirming there is a risk for allergic consumers. Similarly, Ford et al. [28] reported almost 3.5% of products positive for allergens did not declare it in the labelling, and 5.3% of products were positive among the "may contain" products analyzed. Allergic consumers show some rejection to those products that state "may contain" in their labelling, either due to distrust in observing the product, because of their knowledge about the manufacturer company, or their past experiences, with up to 8% of allergic consumers reporting having had reactions to the ingestion of PAL products [13]. It is also important to bear in mind that the extensive use of PAL creates frustration for the allergic consumer as it limits the food options to be consumed, while the consumer assumes risks that harm their health [12]. Regulation of the PAL use could improve the safety and quality of life for sensitive consumers.

Finally, none of the 15 samples "not declaring to contain nuts or nut traces" had a positive result for walnut in any of the techniques described in this study (Table 4).

Analytical methods for detecting allergenic ingredients in foods require adequate specificity and sensitivity to trace very small amounts of the target allergens in complex food matrices and processed foods. The three techniques used in this study have advantages and disadvantages. The real time PCR is the most sensitive of the techniques evaluated, but it does not detect the allergenic protein itself, but rather walnut DNA. Nevertheless, it has been used to confirm both false negative and false positive results because it clearly differentiates walnut and pecan DNA and because of its lower LOD. Despite the higher detection limit of the multimeric scFv ELISA, there was a good agreement between immunoenzymatic and real time PCR results for most commercial samples analyzed, except for some heat-treated liquid samples or those containing pecan. Compared to the multimeric scFv ELISA, the walnut ELISA kit had improved LOD and was less affected by sample processing, but it had a higher cross-reactivity with pecan and other nuts than that stated by the manufacturer, producing false positive results for walnut. On the other hand, in contrast to the walnut ELISA kit, which uses polyclonal antibodies raised in immunized animals, the multimeric scFv ELISA is based on the first recombinant antibody obtained against walnut by phage display, without animal immunization. This is important for fulfilment of international regulations on animal welfare, demanding the avoidance of live animals for scientific purposes whenever possible (European Directive 2010/63/EU) [29]. Moreover, work is currently underway to improve the sensitivity by multimerization on virus-like particles or coupling the scFv to fluorescent molecules that amplify the emission signal for walnut detection.

4. Conclusions

Each method has advantages and limitations for allergen detection, so real time PCR and immunoassays offer complementary approaches [30]. Moreover, food industries

must implement good manufacturing practices to elaborate reliable allergen labelling, considering the risk of allergens in their Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP) plans. This should minimize the risk of allergic reactions in sensitized consumers.

Author Contributions: Conceptualization, R.M. (Raquel Madrid) and T.G.; Data curation, R.M. (Rosario Martín) and P.C.; Formal analysis, R.M. (Raquel Madrid), A.G.-G., P.C., and T.G.; Funding acquisition, R.M. (Rosario Martín), I.G., and T.G.; Investigation, R.M. (Raquel Madrid); Methodology, R.M. (Raquel Madrid) and P.C.; Project administration, I.G. and T.G.; Resources, R.M. (Rosario Martín) and T.G.; Supervision, T.G.; Validation, R.M. (Raquel Madrid), P.C., and A.G.-G.; Writing—original draft, R.M. (Raquel Madrid); Writing—review and editing, T.G. and R.M. (Rosario Martín). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO, Spain) (AGL2017-84316-R) and by Comunidad de Madrid (Consejería de Educación S2018/BAA-4574). Raquel Madrid and Aina García-García are recipients of fellowships from MINECO and Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain), respectively.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The proteomic analysis was performed in the Proteomic Unit of Complutense University of Madrid, a member of ProteoRed and is supported by grant PI17/0019, of the PE I+D+I 2017-2020, funded by ISCIII and ERDF.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Hayes, D.; Angove, M.J.; Tucci, J.; Dennis, C. Walnuts (*Juglans regia*) Chemical Composition and Research in Human Health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2013**, *56*, 1231–1241, doi:10.1080/10408398.2012.760516.
2. Blankestijn, M.A.; Remington, B.C.; Houben, G.F.; Baumert, J.L.; Knulst, A.C.; Blom, W.M.; Klemans, R.J.; Taylor, S.L. Threshold Dose Distribution in Walnut Allergy. *J. Allergy Clin. Immunol. Pr.* **2017**, *5*, 376–380, doi:10.1016/j.jaip.2016.12.005.
3. Ballmer-Weber, B.K.; Lidholm, J.; Lange, L.; Pascal, M.; Lang, C.; Gernert, S.; Lozano-Blasco, J.; Gräni, N.; Guillod, C.; Wangorsch, A.; et al. Allergen Recognition Patterns in Walnut Allergy Are Age Dependent and Correlate with the Severity of Allergic Reactions. *J. Allergy Clin. Immunol. Pr.* **2019**, *7*, 1560–1567, doi:10.1016/j.jaip.2019.01.029.
4. Burney, P.G.J.; Potts, J.; Kummeling, I.; Mills, E.N.C.; Clausen, M.; Dubakiene, R.; Barreales, L.; Fernandez-Perez, C.; Fernandez-Rivas, M.; Le, T.-M.; et al. The prevalence and distribution of food sensitization in European adults. *Allergy* **2013**, *69*, 365–371, doi:10.1111/all.12341.
5. Graham, F.; Eigenmann, P.A. Clinical implications of food allergen thresholds. *Clin. Exp. Allergy* **2018**, *48*, 632–640, doi:10.1111/cea.13144.
6. European Union Regulation (EU) No 1169/2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Di. Off. J. Eur. Union **2011**, *304*, 18–63.
7. de la Cruz, S.; López-Calleja, I.; Martín, R.; González, I.; Alcocer, M.; García, T. Recent advances in the detection of allergens in foods. In *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.); **2017**, *1592*, pp. 263–295.
8. Linacero, R.; Ballesteros, I.; Sanchiz, A.; Prieto, N.; Iniesto, E.; Martín, B.C.; Pedrosa, M.M.; Muzquiz, M.; Cabanillas, B.; Rovira, M.; et al. Detection by real time PCR of walnut allergen coding sequences in processed foods. *Food Chem.* **2016**, *202*, 334–340, doi:10.1016/j.foodchem.2016.01.132.
9. López-Calleja, I.M.; De La Cruz, S.; González, I.; García, T.; Martín, R. Market analysis of food products for detection of allergenic walnut (*Juglans regia*) and pecan (*Carya illinoensis*) by real-time PCR. *Food Chem.* **2015**, *177*, 111–119, doi:10.1016/j.foodchem.2015.01.017.
10. Costa, J.; Fernandes, T.J.; Villa, C.; Oliveira, M.B.P.; Mafra, I. Advances in Food Allergen Analysis. In *Food Safety*; Wiley: Hoboken, New Jersey, **2016**; pp. 305–360.

11. E Johnson, P.; Baumgartner, S.; Aldick, T.; Bessant, C.; Giosafatto, V.; Heick, J.; Mamone, G.; O'Connor, G.; Poms, R.; Popping, B.; et al. Current Perspectives and Recommendations for the Development of Mass Spectrometry Methods for the Determination of Allergens in Foods. *J. AOAC Int.* **2011**, *94*, 1026–1033, doi:10.1093/jaoac/94.4.1026.
12. DunnGalvin, A.; Chan, C.-H.; Crevel, R.; Grimshaw, K.; Poms, R.; Schnadt, S.; Taylor, S.L.; Turner, P.; Allen, K.J.; Austin, M.; et al. Precautionary allergen labelling: perspectives from key stakeholder groups. *Allergy* **2015**, *70*, 1039–1051, doi:10.1111/all.12614.
13. Allen, K.J.; Taylor, S.L. The Consequences of Precautionary Allergen Labeling: Safe Haven or Unjustifiable Burden? *J. Allergy Clin. Immunol. Pr.* **2018**, *6*, 400–407, doi:10.1016/j.jaip.2017.12.025.
14. Thompson, M.; Ellison, S.L.R.; Wood, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 835–855, doi:10.1351/pac200274050835.
15. Madrid, R.; De La Cruz, S.; García-García, A.; Alcocer, M.J.; González, I.; García, T.; Martín, R. Multimeric recombinant antibody (scFv) for ELISA detection of allergenic walnut. An alternative to animal antibodies. *J. Food Compos. Anal.* **2018**, *67*, 201–210, doi:10.1016/j.jfca.2018.01.017.
16. Borkowska, P.; Zielińska, A.; Paul-Samojedny, M.; Stojko, R.; Kowalski, J. Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR in Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells after lentiviral transduction and differentiation. *Mol. Biol. Rep.* **2019**, *47*, 1107–1115, doi:10.1007/s11033-019-05207-6.
17. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685, doi:10.1038/227680a0.
18. Sechi, S.; Chait, B.T. Modification of Cysteine Residues by Alkylation. A Tool in Peptide Mapping and Protein Identification. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 5150–5158, doi:10.1021/ac9806005.
19. Vencia, W.; Minale, P.; Migone, L.; Lazzara, F.; Vito, G.; Ferrari, A.; Razzuoli, E. Effects of thermal treatment on walnut detection and allergenicity. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 2636–2640, doi:10.1002/jsfa.9428.
20. Cabanillas, B.; Novak, N. Effects of daily food processing on allergenicity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2019**, *59*, 31–42, doi:10.1080/10408398.2017.1356264.
21. Blankestijn, M.A.; Jager, C.F.D.H.; Blom, W.M.; Otten, H.G.; De Jong, G.A.H.; Gaspari, M.; Houben, G.F.; Knulst, A.C.; Verhoeckx, K.C.M.; De Jong, G.A.H. A subset of walnut allergic adults is sensitized to walnut 11S globulin Jug r 4. *Clin. Exp. Allergy* **2018**, *48*, 1206–1213, doi:10.1111/cea.13208.
22. Downs, M.L.; Baumert, J.L.; Taylor, S.L.; Mills, E. Mass spectrometric analysis of allergens in roasted walnuts. *J. Proteom.* **2016**, *142*, 62–69, doi:10.1016/j.jprot.2016.04.045.
23. Costa, J.; Carrapatoso, I.; Oliveira, M.B.; Mafra, I. Walnut allergens: molecular characterization, detection and clinical relevance. *Clin. Exp. Allergy* **2014**, *44*, 319–341, doi:10.1111/cea.12267.
24. Remington, B.C.; Westerhout, J.; Meima, M.Y.; Blom, W.M.; Kruijzinga, A.G.; Wheeler, M.W.; Taylor, S.L.; Houben, G.F.; Baumert, J.L. Updated population minimal eliciting dose distributions for use in risk assessment of 14 priority food allergens. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *139*, 111259, doi:10.1016/j.fct.2020.111259.
25. Ozdal, T.; Capanoglu, E.; Altay, F. A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Res. Int.* **2013**, *51*, 954–970, doi:10.1016/j.foodres.2013.02.009.
26. Niemann, L.; Taylor, S.L.; Hefle, S.L. Detection of Walnut Residues in Foods Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Food Sci.* **2009**, *74*, T51–T57, doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01214.x.
27. Labuckas, D.O.; Maestri, D.M.; Perelló, M.; Martínez, M.L.; Lamarque, A.L. Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins. *Food Chem.* **2008**, *107*, 607–612, doi:10.1016/j.foodchem.2007.08.051.
28. Ford, L.S.; Taylor, S.L.; Pacenza, R.; Niemann, L.M.; Lambrecht, D.M.; Sicherer, S.H. Food allergen advisory labeling and product contamination with egg, milk, and peanut. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *126*, 384–385, doi:10.1016/j.jaci.2010.05.034.
29. European Union Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Off. J. Eur. Union*, **2010**, 33–79, doi:32010L0063.
30. Holzhauser, T. Protein or No Protein? Opportunities for DNA-Based Detection of Allergenic Foods. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 9889–9894, doi:10.1021/acs.jafc.8b03657.

IV.3

**PHAGE DISPLAYED DOMAIN ANTIBODIES (dAb) FOR
DETECTION OF ALLERGENIC PISTACHIO PROTEINS IN FOODS**

Al igual que las nueces, los pistachos también pueden provocar reacciones alérgicas graves en individuos alérgicos. En este trabajo, exponemos el aislamiento de los primeros anticuerpos recombinantes producidos sin inmunización animal para la detección de pistacho en productos alimentarios. Se evaluaron varias estrategias de *biopanning* por presentación en fagos del repertorio de anticuerpos de dominio único (dAb) de origen humano en busca de sondas específicas frente al pistacho. El clon que produce el fago-dAb PVF4 fue seleccionado porque además no presentó reacción cruzada con el anacardo, a pesar de su proximidad filogenética con el pistacho. Los análisis de *Western blot* y de espectrometría de masas en tándem por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF/TOF) demostraron que este clon reconocía una banda única de ~22 kDa relacionada con la subunidad básica de la globulina 11S del pistacho (alérgeno Pis v 2). Por último, ensayos de sensibilidad del ELISA indirecto con el fago-dAb PVF4 desarrollado determinaron un límite de detección (LOD) de 3983 mg Kg⁻¹. Para evaluar la aplicabilidad del ELISA indirecto se analizaron 77 productos alimentarios comerciales.

Raquel Madrid, Aina García-García, Isabel González, Rosario Martín, Teresa García (2020). Phage displayed domain Antibodies (dAb) for detection of allergenic pistachio proteins in foods. *Foods*, 9, 1230. <https://10.3390/foods9091230>

Publicado en *FOODs*

Índice de impacto (2020): 4,350

Posición en JCR (2020): 37/143





Article

Phage Displayed Domain Antibodies (dAb) for Detection of Allergenic Pistachio Proteins in Foods

Raquel Madrid , Aina García-García , Isabel González, Rosario Martín and Teresa García * 

Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain; raqmad01@ucm.es (R.M.); ainagarcia@ucm.es (A.G.-G.); gonzalzi@ucm.es (I.G.); rmartins@ucm.es (R.M.)

* Correspondence: tgarcia@ucm.es; Tel.: +34-91-394-3747

Received: 22 July 2020; Accepted: 1 September 2020; Published: 3 September 2020



Abstract: Pistachio nuts (*Pistacia vera*) have been consumed by past and present-day civilizations because of their organoleptic characteristics and potential health benefits. However, they can also produce moderate to severe IgE-mediated reactions in allergic individuals. In this work, we report the isolation of the first recombinant antibodies against pistachio nut, produced without animal immunization, to be used in immunoassays for detection of allergenic pistachio in food products. Several phage display biopanning strategies were evaluated to screen the human-based domain antibody library (dAb) in search for pistachio-specific probes. The clone producing the PVF4 phage-dAb was finally selected, and it does not cross-react with cashew despite the phylogenetic proximity with pistachio. Western blot and matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF) analysis demonstrated that this clone recognised a unique band of ~22 kDa related to the basic subunit of pistachio 11S globulin (allergen Pis v 2). The PVF4 phage-dAb allowed detection of pistachio in a food matrix with a limit of detection (LOD) of 3983 mg kg⁻¹ in an indirect phage-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The ELISA method developed was used to assess applicability of the PVF4 phage-dAb for analysis of 77 commercial food products.

Keywords: phage-ELISA; 11S globulin; food analysis; domain antibody (dAb); recombinant antibody; pistachio detection; food allergen detection

1. Introduction

Pistachio nuts (*Pistacia vera*) have been part of the human diet since prehistoric times and have been consumed because of their organoleptic characteristics and potential health benefits [1]. However, they can also produce moderate to severe IgE-mediated reactions in allergic individuals. Moreover, pistachio-allergic patients often report allergy to cashews, probably due to the close relation of these two members of the *Anacardiaceae* family [2,3]. Until now, the allergen nomenclature sub-committee of the World Health Organization and International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS) has recognised five allergenic proteins for pistachio nut, named Pis v 1, Pis v 2, Pis v 3, Pis v 4, and Pis v 5 [4–6].

Pistachio-allergic patients should thoroughly read product labelling, understand it, and avoid products with allergen warnings [7]. Moreover, to ensure compliance with food labelling regulations and provide accurate information to allergic consumers, it is key to establish an effective risk assessment of allergens in the food industry, including assessment of undeclared allergens in raw materials purchased from suppliers. This requires rapid, specific, and sensitive methods to detect allergens in raw and processed foods [8].

There are several genetic and immunological methods available for the detection of pistachio in food products [9–11]. Immunoassays are the most widely used methods for the detection of pistachio in foods, and there are some commercial kits available. However, all the immunoassays currently

available for this purpose rely on the use of polyclonal or monoclonal antibodies raised in animals. Current international regulations on animal welfare (European Directive 2010/63/EU) firmly encourage the development of alternatives based on the principle of the 'Three Rs': to replace, reduce, and refine the use of animals in research and testing procedures [12]. Therefore, there is a need for alternatives to the use of experimental animals to obtain antibodies capable to detect pistachio allergens in food products. The development of immunoassays based on recombinant antibodies that do not depend on in vivo immunizations is still incipient and provides a novel and promising alternative for the detection of food allergens.

Using phage display technology, recombinant antibodies of defined specificity and constant amino acid sequence can be produced without animal immunization for use in immunoassays. This method uses libraries of recombinant phage antibodies that display functional antibody fragments, like single-chain variable fragments (scFv) or heavy chain variable domains (VH), in their surface. The application of phage display technology for the detection of food allergens has significant potential, but it is still limited to the detection of some allergenic tree nuts with recombinant scFvs [13,14]. Compared to other antibody fragments, like scFv and Fab, VH single domain antibodies or nanobodies have a smaller size (14 kDa), higher solubility and stability, and excellent tissue penetration in vivo. Moreover, they can be genetically linked or chemically conjugated to different molecules to facilitate their use in immunoassays or as therapeutic agents [15]. Isolation of phage-antibody fragments of the desired specificity is achieved by an iterative biopanning procedure with the immobilised antigen [16].

In this work, we report the isolation of recombinant antibodies against pistachio nut from the human based domain antibody library (dAb) by an iterative affinity selection procedure, avoiding animal immunization. We also describe an indirect phage-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that allows for the detection of pistachio in commercial food products.

2. Materials and Methods

2.1. Materials and Chemicals

The protein extraction buffer consisted of 0.035 M phosphate solution containing 1 M NaCl, pH 7.5. Phosphate-buffered saline (PBS) composition is 0.01 M phosphate buffer, 0.0027 M potassium chloride, and 0.137 M sodium chloride, pH 7.4. Milk phosphate-buffered saline (MPBS) contains 1% skimmed milk powder in PBS. PBST is PBS containing 0.01% Tween 20. Tryptone, yeast extract and European bacteriological agar were purchased from Laboratorios Conda (Madrid, Spain). The 2 × TY broth is 16 g L⁻¹ tryptone, 10 g L⁻¹ yeast extract, and 5 g L⁻¹ NaCl. TYE agar is 15 g L⁻¹ bacto-agar, 10 g L⁻¹ tryptone, 5 g L⁻¹ yeast extract and 8 g L⁻¹ NaCl. Sample buffer is 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 6.8, 10% SDS, 20% glycerol, 0.5% bromophenol blue as the tracking dye, and 5% β-mercaptoethanol. BlueSafe to stain proteins in an SDS-PAGE was provided by NZytech (Lisbon, Portugal). Transfer buffer consisted of 0.025 mol L⁻¹ Tris, pH 8.3, 0.192 mol L⁻¹ glycine, and 200 mL L⁻¹ methanol. Unless otherwise stated, chemicals were provided by Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Horseradish peroxidase (HRP)/anti-M13 monoclonal mouse antibody was purchased from GE Healthcare (GE Healthcare UK Ltd., Amersham, UK).

The human domain antibody library (dAb), M13 K07 helper phage and *Escherichia coli* TG1 strain (K12Δ (lac-proAB) supE thi hsdD5/F' traD36 proA⁺B lacI^q lacZΔM15) were obtained from Source BioScience (Nottingham, UK). This is a single-domain antibody library based on a VH framework (V3-23/D47) that was developed by Daniel Christ at the MRC Laboratory of Molecular Biology (Cambridge, UK) [17]. Diversity was introduced into the antigen binding domains by polymerase chain reaction (PCR) mutagenesis into the three complementarity-determining regions (CDR1, CDR2 and CDR3). The library is constructed in the ampicillin resistant phagemid vector pR2 (MYC VSV tag) with a size of 3 × 10⁹. The repertoire has been engineered to withstand heat-induced aggregation on phage and has been displayed as a fusion with the terminal phage gene III protein.

2.2. Sample Preparations

A wide variety of tree nuts, plant and animal species (Table 1), commercial food products and commercial pistachios (raw and roasted) from different origins (the United States, Iran, and Spain) were analysed. The samples were acquired in different stores and local markets in Madrid (Spain). All food samples (5 g) were finely ground and stored in screw capped vials at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Table 1. List of heterologous species analysed in the indirect phage enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Nuts		
Almond (<i>Prunus dulcis</i>)	Hazelnut (<i>Corylus avellana</i>)	Pecan nut (<i>Carya illinoensis</i>)
Brazil nut (<i>Bertholletia excels</i>)	Macadamia (<i>Macadamia integrifolia</i>)	Pine nut (<i>Pinus pinea</i>)
Cashew nut (<i>Anacardium occidentale</i>)	Peanut (<i>Arachis hypogaea</i>)	Walnut (<i>Juglans regia</i>)
Chesnut (<i>Castanea sativa</i>)		
Vegetal Species		
Anise (<i>Pimpinella anisum</i>)	Garlic (<i>Allium sativum</i>)	Pinto bean (<i>Phaseolus coccineus</i>)
Apple (<i>Malus domestica</i>)	Green peppers (<i>Capsicum annuum</i>)	Plum (<i>Prunus domestica</i>)
Apricot (<i>Prunus armeniaca</i>)	Kiwifruit (<i>Actinidia deliciosa</i>)	Pomegranate (<i>Punica granatum</i>)
Asparagus (<i>Asparagus officinalis</i>)	Lentil (<i>Lens culinaris</i>)	Poppy seed (<i>Papaver rhoas</i>)
Aubergine (<i>Solanum melongena</i>)	Lupin bean (<i>Lupinus albus</i>)	Prune (<i>Prunus domestica</i>)
Banana (<i>Musa acuminata</i>)	Maize (<i>Zea mays</i>)	Pumpkin seed (<i>Cucurbita maxima</i>)
Barley (<i>Hordeum vulgare</i>)	Mandarin orange (<i>Citrus reticulata</i>)	Quinoa (<i>Chenopodium quinoa</i>)
Bean (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Melon (<i>Cucumis melo</i>)	Rice (<i>Oryza sativa</i>)
Blackberry (<i>Rubus ulmifolius</i>)	Oats (<i>Avena sativa</i>)	Rye (<i>Secale cereal</i>)
Brown sugar (<i>Saccharum officinarum</i>)	Olive (<i>Olea europaea</i>)	Sesame (<i>Sesamum indicum</i>)
Carrot (<i>Daucus carota</i>)	Onion (<i>Allium cepa</i>)	Soya (<i>Glycine max</i>)
Cherry (<i>Prunus avium</i>)	Orange (<i>Citrus sinensis</i>)	Sunflower seed (<i>Helianthus annuus</i>)
Chia (<i>Salvia hispánica</i>)	Paprika (<i>Capsicum annuum</i>)	Tiger nut (<i>Cyperus esculentus</i>)
Chickpea (<i>Cicer arietinum</i>)	Pea (<i>Pisum sativum</i>)	Tomato (<i>Solanum lycopersicum</i>)
Cinnamon (<i>Cinnamomum verum</i>)	Peach (<i>Prunus persica</i>)	Vanilla (<i>Vanilla planifolia</i>)
Cocoa (<i>Theobroma cacao</i>)	Pear (<i>Pyrus communis L.</i>)	Wheat (<i>Triticum aestivum</i>)
Flaxseed (<i>Linum usitatissimum</i>)	Pineapple (<i>Ananas comosus</i>)	Courgette (<i>Cucurbita pepo</i>)
Animal Species		
Beef (<i>Bos Taurus</i>)	Salmon (<i>Salmo salar</i>)	Chicken (<i>Gallus gallus domesticus</i>)
Egg (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Milk (<i>Bos Taurus</i>)	Pork (<i>Sus scrofa domestica</i>)

Pistachio, cashew, and peanut were defatted to be used in some of the biopanning procedures. The nut (5 g) was finely ground in an analytical mill (IKA[®] A11, Staufen, Germany), and 0.8 g of nut powder was dissolved in 20 mL of acetone, vigorously shaken for 1 min, and centrifuged at $10,000\times g$ for 30 min. Then, the supernatant was removed, and the process was repeated four times. Finally, the defatted sediment was dried for 24 h and stored in screw capped vials at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Binary mixtures (10^5 to 100 mg kg^{-1}) of roasted pistachio in corn flour were prepared using an IKA A11 analytical mill to evaluate the sensitivity of the assay and to be used as reference samples. Concentration of 10^5 mg kg^{-1} was prepared by adding 5 g of ground pistachios to 45 g of corn flour. Concentrations of 10^4 , 10^3 , and 100 mg kg^{-1} were prepared by adding 5 g of the corresponding binary mixture to 45 g of corn flour. Concentrations of 7.5×10^4 , 5×10^4 , 2.5×10^4 , 2×10^4 , 5×10^3 , and 500 mg kg^{-1} were prepared in a similar way. All the mixtures were stored in screw capped vials at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Protein extracts from binary mixtures, tree nuts or food products were prepared by mixing 0.2 g sample with 1.2 mL of protein extraction buffer, and the mixture was shaken for 10 min at room temperature in a vertical rotator (HulaMixer Sample Mixer, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The slurry was centrifuged at $10,000\times g$ for 10 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, and the supernatant was filtered through a $0.45\text{ }\mu\text{m}$ syringe filter (Sartorius AG, Goettingen, Germany).

DNA extraction and purification for real time PCR analysis of samples was performed as previously described [11]. The DNA obtained from the Wizard DNA Clean-Up System kit (Promega, Madison, WI, USA) was eluted in 50 µL of sterile deionised water, and DNA concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, Denmark).

A negative control, without sample, was included in every protein or DNA extraction. All protein and DNA extracts were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3. Sequence Analysis

DNA from single colonies of the pistachio-recognizing clones was amplified using My Taq Mix 2× (Bioline Reagents Limited, London, UK) and primers CDR1-2 Fw (5'-ACGTCAGAAGACATCA GGTGCAGCTGTTGGAGTC-3') and CDR3 Rev (5'-TCAGTTGAAGACCTCGAATTCAGATCCTCTC TGAGATG-3') [18]. The polymerase chain reaction (PCR) program used was $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 min, then, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 s for 30 cycles, and a final extension at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 7 min. PCR products (360–390 bp) were examined by electrophoresis on 1.5% agarose gel.

To confirm the suitable sequence of the selected clones with a complete VH fragment, the phagemid DNA was extracted by High Pure Plasmid Isolation kit (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) and sequenced with primers M13 Rev (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3') and pR2seq (5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACGA-3') at Unidad de Genómica (Universidad Complutense de Madrid) with a multi-capillary sequencer "ABI Prism 3730" (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA).

Nucleotide sequences were compared using European Molecular Biology Open Software Suite (Emboss software), and then analysed with IMGT/V-QUEST (sequence alignment software for IG and TR) to determine framework and complementary determining regions (CDR) of the VH. Amino acid sequences were deduced from the nucleotide sequences by SnapGene software (Insightful Science; available at snapgene.com).

2.4. Biopanning Procedure

The phage display dAb library was prepared as recommended by the manufacturer [17]. Following amplification of the library and precipitation of the phage particles, the pellet was resuspended in 1 mL of PBS and centrifuged at $11,600\times g$ to remove any bacterial debris. The phages were titrated and kept at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for short-term storage (one week) or at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 15% glycerol for long-term storage.

Different biopanning strategies (S1–S4) were carried out to obtain pistachio specific clones (Table 2). In all the strategies, polystyrene paddles were used as solid phase for the first round of biopanning and magnetic beads for the second round to avoid the isolation of nonspecific binders that would produce false-positive results. For the first round of selection, polystyrene Nunc paddles (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with a surface area of 5.2 cm^2 were coated with 1 mL of $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ pistachio extract (positive screening) or peanut or cashew nut extract (negative screening) in PBS and incubated overnight at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Then, paddles were washed three times with PBS and blocked with MPBS at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 h. For the second round of selection, Dynabeads M-280 Tosylactivated (Thermo Fisher Scientific) were used to bind $100\text{ }\mu\text{g}$ of the target proteins following the manufacturer's instructions.

The biopanning processes were performed as described in Madrid et al. [19], but using roasted pistachio, cashew, and peanut whole or defatted extracts, as shown in Table 2.

Table 2. Different biopanning strategies used, and number of specific pistachio-binding clones obtained from each strategy.

Strategies	Defatted Extracts	Selection ^a	Round 1			Round 2			Clones Obtained
			Peanut	Cashew	Pistachio	Peanut	Cashew	Pistachio	
S1	NO	-	•			•			2
		+			•			•	
S2	NO	-	•				•		1
		+			•			•	
S3	YES	-	•			•			13
		+			•			•	
S4	YES	-	•				•		4
		+			•			•	

^a For each strategy and round of biopanning, a negative panning was first performed with the extract indicated by (–) to reduce non-specific binders. Then, the remaining phage-dAbs were used for selection of pistachio-specific phage-dAbs against the pistachio extract (+).

For the selection of pistachio-specific phage-dAb, two rounds of selection were carried out in each strategy. In the first round, approximately 5×10^{12} amplified phages from the dAb library were diluted in 1 mL of MPBS and added to the appropriate polystyrene paddles for a first negative selection. The mixture was incubated at 25 °C for 1 h to capture the phage dAbs that bind cashew or peanut, depending on the strategy. Then, the mixture containing the uncaptured phage-dAbs was added to the paddle coated with pistachio and incubated at 25 °C for 1 h with rotation and for another hour without rotation. Unbound phages were then removed by washing 10 times with PBS, and phages specifically bound to pistachio proteins were eluted by adding 1 mL of trypsin solution (1 g L^{-1} trypsin in PBS) for 1 h at room temperature with rotation. Ten microliters of eluted phage were used for titration, and 500 μL was used to infect 30 mL of *E. coli* TG1 culture at an OD_{600} of 0.5, and the flask was incubated for 1 h at 37 °C in a water bath. Infected cells (1 mL) were spread on six TYE agar plates containing $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin and 4% (*w/v*) glucose and grown overnight at 37 °C. Following overnight incubation, *E. coli* colonies were scraped into 2 mL of $2 \times \text{TY}$ containing 15% glycerol and stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ (labelled as first round stock). To amplify the phages for the second round of selection, 1 mL of recovered bacteria from the first panning (or until OD_{600} of 0.1) were inoculated into 500 mL of $2 \times \text{TY}$ containing $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin and 4% (*w/v*) glucose and incubated at 37 °C until reaching an OD_{600} of 0.5. Then, infection with helper phage and precipitation was performed as described in Lee et al. [17]. A second round of selection was performed like the first one but employing 5 mg of Dynabeads instead of polystyrene paddles and increasing the number of washes to 20.

To select pistachio-binding clones, 95 individual colonies from the titration plates of the second round of selection were randomly picked and inoculated in separate wells of Nunc cell culture microplates (Thermo Fisher Scientific) containing 200 μL $2 \times \text{TY}$ with $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin and 4% (*w/v*) glucose. Following infection with the helper phage, monoclonal phage-dAbs from the culture supernatant were screened for pistachio binding.

2.5. Indirect Phage-dAb Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Flat-bottom polystyrene microtiter plates (F96 MaxiSorp Nunc immunoplates (Thermo Fisher Scientific) were coated with the appropriate dilutions of the protein extracts assayed (pistachio, heterologous species, experimental mixtures, or commercial products) diluted 1:100 in PBS and incubated at 37 °C for 1 h. Then, the plates were washed five times and blocked with 200 μL of MPBS per well for 1 h at 37 °C. After the plates were washed five times, culture supernatant (25 μL) in 100 μL of PBS with 3% (*w/v*) BSA or 100 μL of MPBS containing 2 μL of precipitated phage was added to each well, and the plates were incubated for 1 h at room temperature with shaking. After washing 10 times, plates were incubated at room temperature for 1 h with 100 μL of HRP/anti-M13 monoclonal mouse antibody (GE Healthcare UK Ltd., Amersham, UK) diluted 1:5000 in MPBS. Following another washing step, the reaction was developed with tetramethylbenzidine

substrate solution (100 μL) for 12 min in the dark and stopped with 50 μL 1 M sulphuric acid. OD_{450} was measured with a spectrophotometer (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Germany). All washing steps were performed with PBS. All experiments were performed in triplicate. The experimental mixtures containing 5×10^3 , 10^4 , and 10^5 mg kg^{-1} pistachio, and also negative control wells (for antigen, phage-dAb and secondary antibody), were analysed along with the food samples (heterologous species and commercial samples) as references and controls.

The concentration-response curve obtained by plotting the absorbance values vs. the log of pistachio protein concentration was fitted to the four-parameter logistic equation using Origin 8.0 software (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA).

The limit of detection (LOD) was calculated as the concentration of the target protein that presents an absorbance value higher than the average of the eight non-target tree nuts plus three times its standard deviation (SD).

2.6. Protein Fractionation of the Pistachio Extract by Size-Exclusion Chromatography

Size-exclusion chromatography separation was carried out in a fast protein liquid chromatography system (ÄKTA purifier FPLC system) (GE Healthcare UK Ltd., Amersham, UK). One hundred microliter of defatted and filtered pistachio protein extract was injected into a HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR column (GE Healthcare UK Ltd., Amersham, UK) previously equilibrated with PBS. The flow rate was maintained at 0.5 mL min^{-1} . Eluted fractions were collected in 1.5 mL glass vials and stored at -20°C until further use.

2.7. SDS-PAGE and Western Blotting Analysis

Duplicate sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the size exclusion chromatography fractions (5 $\mu\text{g/lane}$) and pistachio extracts (10 μg) were performed using precast gels (4–20% TDX, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in a Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad) at 120 V for 45 min. Each sample was mixed with 10 μL of sample buffer and heated at 95°C for 5 min before addition to the wells. Following electrophoresis, one of the gels was stained with Blue safe (NZytech, Lisbon, Portugal), and protein bands in the other gel were transferred into a methanol-activated polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Immuno-Blot PVDF membranes; Bio-Rad) at 240 mA for 2 h using a Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). The membrane was then blocked with 3% BSA in PBS for 1 h at 25°C , washed three times with PBS, and incubated overnight at 4°C with pistachio specific phage-dAb (750 μL of PVF4 clone culture supernatant diluted with 2.25 mL of 1% of BSA in PBS). After washing five times with PBS, the membrane was incubated for 1 h at 37°C with HRP/anti-M13 mouse monoclonal antibody (GE Healthcare UK Ltd., Amersham, UK) diluted 1:5000 in 1% BSA-PBS, washed three times with PBST and revealed with the chemiluminescent substrate Clarity Western ECL (Bio-Rad). The Western blotting membranes were scanned using a ChemiDoc XRS system (Bio-Rad) to visualise bands.

2.8. Protein Identification

Bands of interest from the Blue Safe stained SDS-PAGE gel were cut out with a sterile scalpel and immersed in 5% acetic acid solution. Proteins were in gel reduced, alkylated, and digested with trypsin according to Sechi and Chait [20]. Analysis of peptides from protein digestion was performed using the 4800 Plus MALDI-TOF/TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry) Analyzer mass spectrometer (Applied Biosystems, MDS Sciex, Toronto, ON, Canada), at the Unidad de Proteómica of Universidad Complutense de Madrid (Spain). Peptide mass fingerprint and some peptide fragmentation spectra were combined searched in the MASCOT v2.3 search engine (<http://www.matrixscience.com>) through Global protein Server (Applied Biosystems) against NCBI database (17,919,084 sequences; 6,150,218,869 residues) without taxonomy restriction and search parameters: carbamidomethylcysteine as fixed modification and oxidised methionine as variable modification; peptide mass tolerance 80 ppm; one missed trypsin cleavage site allowed and MS/MS

fragments tolerance 0.3 Da. In all protein identification, the probability scores were greater than the score fixed by Mascot as significant with a *p*-value minor than 0.05.

3. Results and Discussion

3.1. Screening of the Domain Antibody (dAb) Library in Search for Pistachio-Specific Clones

Domain antibody (dAb) libraries are novel tools in the phage display technology for the obtention of recombinant antibody fragments. Compared with Fab or scFv libraries [21], randomization in dAb constructions can be introduced at a much higher percentage of CDR positions without exceeding practical library size, being simpler and more efficient.

Pistachio and cashew belong to the *Anacardiaceae* family, and due to its phylogenetic proximity, it is difficult to obtain pistachio-specific antibodies that do not have a cross reaction with cashew [2]. A commercial dAb library has been searched in a phage display format to obtain specific clones for detection of pistachio in processed foods. Several biopanning strategies (S1–S4) involving two rounds of selection were carried out using protein extracts from whole (S1 and S2) or defatted (S3 and S4) pistachio, cashew, and peanut (Table 2).

The input number of phage particles was always around 5×10^{12} pfu mL⁻¹ and, as expected, the phage particles recovered at the end of the first round were around 10^5 – 10^7 pfu mL⁻¹, increasing up to 10^7 – 10^9 in subsequent rounds of selection [17]. That was the case for all biopanning strategies (Figure 1), and it could be indicative of an increase in the selection of binders to pistachio.

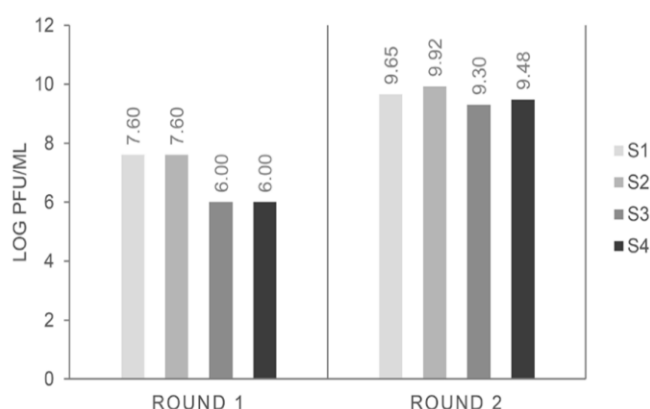


Figure 1. Phage titers obtained after each round of affinity selection against pistachio extract, following different biopanning strategies (S1–S4).

To confirm this hypothesis, a polyclonal phage ELISA against pistachio, cashew, and peanut was performed with phage pools collected from all the rounds of selection, using BSA and β -galactosidase as negative controls (Figure 2).

The results showed an increase in absorbance values for pistachio proteins after the second rounds, with important differences between strategies. When whole protein extracts were used as a target, pistachio binding increased only slightly in S1, and it did not increase further in S2. On the contrary, using defatted extracts as target allowed a clear enrichment in pistachio binding phage-dAb, with higher values registered in S3 (subtraction of peanut-binding phages in rounds 1 and 2 before selection of pistachio-binding phages) than in S4 (subtraction of peanut-binding phages in round 1 and cashew-binding phages in round 2). This result could mean that a negative selection against cashew produced recovery of a lower number of pistachio-binding phages but more specific to the pistachio target. Very low cross-reactivity was found to wells coated with BSA, β -galactosidase, cashew, and peanut. Thus, according to these results, the use of defatted extracts increased the efficiency of the biopanning process, so that the phage population that specifically recognised pistachio was highly enriched in the second round of panning, avoiding the need for additional rounds of selection.

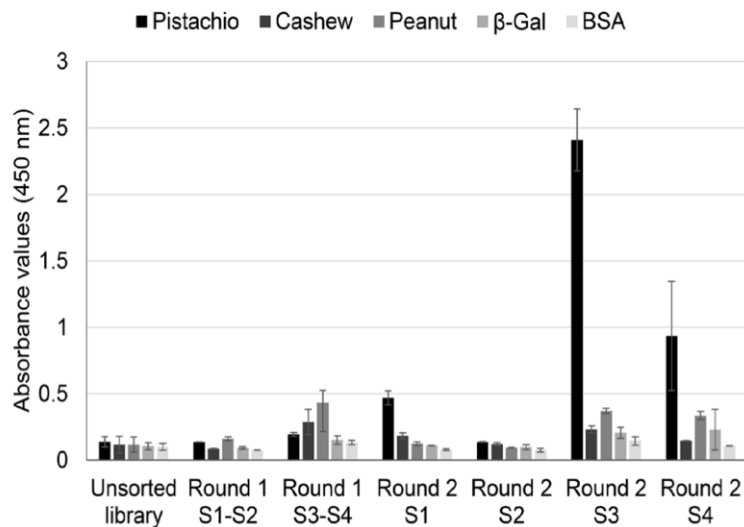


Figure 2. Indirect phage-dAb ELISA results obtained with polyclonal phages rescued at each round of selection from strategies S1–S4 against pistachio. Precipitated phages from each round of selection were analysed against pistachio, cashew and peanut extracts and negative controls (beta-galactosidase and BSA). Absorbance values are the mean of three independent experiments with duplicates. Error bars show the standard deviation for each set of data.

3.2. Screening of Individual Phage-dAb Clones by Monoclonal Phage ELISA

Monoclonal phage ELISA was performed to isolate and identify clones producing dAb that recognised pistachio proteins. Ninety-five *E. coli* TG1 colonies from the titration plates of the second rounds of panning of the different strategies were picked, and phage-dAbs produced in the culture supernatant were analysed. The clones were considered positive when binding to pistachio extract was at least five times higher than binding to the peanut or cashew extracts used as negative controls (A_{450} against pistachio $> 5 \times A_{450}$ against negative control).

When the negative selection was made with peanut (S1), two clones recognizing pistachio were obtained (PVD5 and PVF10), but they also cross-reacted with cashew (Table 2). It is possible that negative subtraction with peanut eliminated clones recognizing other tree nuts, but the remaining pistachio-binding clones also recognised the phylogenetically close cashew. In strategy S2, the negative selection was performed with peanut in round 1 and with cashew in round 2. This strategy yielded just one positive clone that exclusively recognised pistachio (PVG3). Finally, this clone was discarded because its nucleotide sequence revealed that it did not codify for a complete dAb, generating a truncated antibody without the signal factor, the FR1, and part of the CDR1.

Pistachios are characterised by a high fat content (between 40.6–53.5% g per 100 g) with a heart-healthy fatty acid profile [22,23]. They are also rich in polyphenols (around 600 mg per 100 g) [24]. Polyphenols are known to form complexes with proteins leading to changes in the structural, functional and nutritional properties of both compounds [25]. Considering that the high fat content of pistachio and other tree nuts could be hindering obtention of pistachio specific dAb, the same biopanning strategies used with whole extracts (S1 and S2) were performed but using defatted extracts of pistachio, peanut and cashew. In the strategy S3 a total of 13 pistachio binding clones were obtained out of the 95 clones analysed (13.7%) from the second round (Table 2). Three of them showed cross reaction with the cashew extract (PVA7, PVA8 and PVD8), and the remaining clones bound only pistachio (PVB4, PVB9, PVC11, PVC12, PVD6, PVE12, PVF6, PVF9, PVG8, and PVH7). In the S4 strategy, there were four pistachio-binding clones out of 95 clones analysed from the second round (4.2%). Three of them were considered specific to pistachio (PVA1, PVA12, and PVF4), and only one cross-reacted with cashew (PVB12). Following initial screening, eight clones from the second rounds of S3 and S4 were selected for further analysis in a monoclonal ELISA with phage-dAb to assess

specificity against ten allergenic nut species (Figure 3). The eight selected clones bound pistachio with ABS_{450} values higher than 1.5, without cross-reactivity to the rest of the nuts. Only the clone PVA8 (S3) cross-reacted to the cashew extract, and it was then discarded.

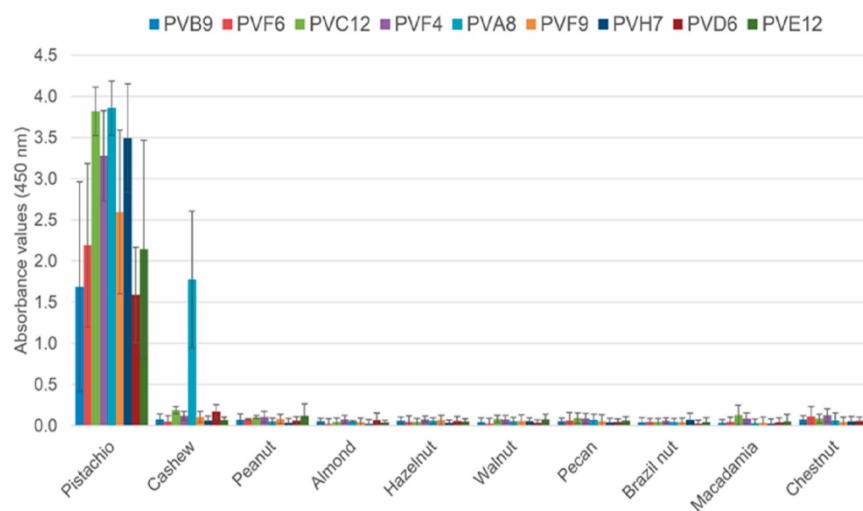


Figure 3. Indirect phage-dAb ELISA results obtained with monoclonal phages selected from the second round of biopanning against a set of tree nuts. Absorbance values are the mean of four independent experiments with duplicates. Error bars show the standard deviation for each set of data.

These results demonstrated that negative biopanning with a closely related but non-target protein (cashew extract) excluded a part of the pistachio reactive phages, but still allowed selection of the most specific phage-dAb. Moreover, the use of defatted extracts was necessary to obtain pistachio-specific clones. The defatting protocol (Section 2.1) was performed with acetone, which is a good method to eliminate fatty acids and also improves the extraction of polyphenols [24,26]. Therefore, the extracts used in strategies S3 and S4 are characterised by a high protein content without elements such as fatty acids and phenols that interact or prevent recognition of the protein epitopes by dAb, thus improving the efficiency of the selection of phage antibodies.

3.3. Sequence Analysis

DNA from the eight pistachio-specific clones selected, and one of the clones cross-reacting with cashew, was amplified by PCR with primers CDR1-2 and CDR3 to estimate the proportion of clones containing the complete VH insert (approximately 360–390 bp); all of them produced PCR fragments of the expected size (not shown). The inserts of the purified plasmids were then sequenced, and the sequences were uploaded to GenBank with the following accession numbers: PVA8-dAb (MN862009), PVB9-dAb (MN631054), PVD6-dAb (MN862010), PVE12-dAb (MN862011), PVF4-dAb (MN612110), PVF6-dAb (MN631055), PVF9-dAb (MN862012), and PVH7-dAb (MN862013). When compared to the NCBI database, the selected positive clones were confirmed to be *Homo sapiens* partial IGHV3-23 gene for immunoglobulin heavy chain variable region. Finally, DNA sequence analysis of the nine clones and their deduced amino acid sequences (Figure 4) demonstrated that they were all different except dAbs PVF4, obtained with strategy S4, and PVC12, obtained with strategy S3, that had the same nucleotide sequence. The clone PVF4 was then selected because of its higher culture stability and phage-dAb production.

```

                                CDR1                CDR2
PV89    MAQVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDNIITPDNMAWVRQAPGKLEWVSTIESTNGST 60
PVF6    MAQVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDSVINQMMSWVRQAPGKLEWVSGIEKPNGST 60
PVC12   MAQVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVSLNN*VMSWVRQAPGKLEWVSTIRFQNGST 59
PVF4    MAQVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVSLNN*VMSWVRQAPGKLEWVSTIRFQNGST 59
PVA8    MAQVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVSLIY*TMWVRQAPGKLEWVSAIYKDGST 59
PVF9    MAQVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMLSY*FMGWVRQAPGKLEWVSAIYRNGST 59
PVH7    MAQVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDSVTN*NTWVRQAPGKLEWVSGITGANGST 59
PVD6    MAQVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDRVSD*VMGWVRQAPGKLEWVSSIYNPDGST 59
PVE12   MAQVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDRISH*VMSWVRQAPGKLEWVSSIGGAGGST 59
*****
                                CDR3
PV89    YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLGNRNDACWPSEQPMDYWG 120
PVF6    YYANSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVLYGS-----AKAFGYWG 113
PVC12   YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAANHS-----T-NAYVGLG 111
PVF4    YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAANHS-----T-NAYVGLG 111
PVA8    YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLVS-----SLYNKFAYWG 112
PVF9    YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATLQG-----GFHPVDFWG 112
PVH7    YYADFVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPVL--VRTSWG*NEMPWG 116
PVD6    YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGTPK---E-----YTSLRSWG 111
PVE12   YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASAYR--RG-----NEYLEYWG 112
***: *****
                                c-Myc      VSV
PV89    QGTLVTVSAAAEQKLISEEDLNSAAHYTDIEMNRLGKGA* 161
PVF6    QGTLVTVSAAAEQKLISEEDLNSAAHYTDIEMNRLGKGA* 154
PVC12   QGTLVTVSAAAEQKLISEEDLNSAAHYTDIEMNRLGKGA* 152
PVF4    QGTLVTVSAAAEQKLISEEDLNSAAHYTDIEMNRLGKGA* 152
PVA8    QGTLVTVSAAAEQKLISEEDLNSAAHYTDIEMNRLGKGA* 153
PVF9    QGTLVTVSAAAEQKLISEEDLNSAAHYTDIEMNRLGKGA* 153
PVH7    QGTLVTVSAAAEQKLISEEDLNSAAHYTDIEMNRLGKGA* 157
PVD6    QGTLVTVSAAAEQKLISEEDLNSAAHYTDIEMNRLGKGA* 152
PVE12   QGTLVTVSAAAEQKLISEEDLNSAAHYTDIEMNRLGKGA* 153
*****

```

Figure 4. Amino acid sequences of the pistachio binding dAbs deduced from the nucleotide sequences by SnapGene tool. Positions of the complementarity determining regions of the variable domains (CDR 1–3) and the c-Myc and VSV tags are indicated as determined by IMGT/V-QUEST tool.

Deduced amino acid sequences of the pistachio-binding clones showing the CDRs and immunoglobulin framework regions (FRs) demonstrated no insertions or deletions in CDR1 and CDR2 in any of the clones. As expected, CDR3 was the most variable in sequence and length among the selected clones, with lengths from 12 to 20 residues. Moreover, a stop codon was present in the CDR1 of six clones, and in CDR3 or one clone, due to an amber mutation (Figure 4). This is frequent in phage displayed antibodies because of randomization of CDR sequences and propagation of phagemids in the amber suppressor TG1 *E. coli* strain [27]. Amber stop codons are interpreted as Gln residues in suppressor strains like TG1, so that these dAb clones can be used in a phage display format, but require site directed mutagenesis to be produced as soluble dAbs in a non-suppressor strain.

The target-binding site of human antibodies is usually composed by the variable domains of the heavy and light chains (VH and VL), that are non-covalently associated, and together contribute for proper target binding. However, there are naturally occurring and genetically engineered single chain antibodies that maintain their ability to recognise antigens with high affinity and specificity [15,17]. That is the case of the human-domain antibody library (dAb) used in this work, which consisted of antibody fragments based exclusively on a single VH domain [17]. Advantageous features of dAbs include their small size (15 kDa), high solubility and stability, and excellent tissue penetration in vivo. Domain antibodies can be genetically linked to peptide tags as c-Myc or His tags to facilitate their purification when produced as soluble antibody fragments.

3.4. Identification of Pistachio Proteins Recognised by the PVF4 Phage-dAb

To identify the protein fractions recognised by the PVF4 phage-dAb, a chromatographic separation of the defatted pistachio extract was performed by FPLC, followed by an indirect phage-dAb ELISA and a Western blot with FPLC fractions.

Size-exclusion chromatography with FPLC system of defatted pistachio protein extract was resolved in a protein profile with two major peaks and three minor peaks at 280 nm (Figure 5A). One hundred microlitres of representative protein fractions obtained from size-exclusion chromatography were analysed in an indirect-phage ELISA using PVF4 phage-dAb (Figure 5B).

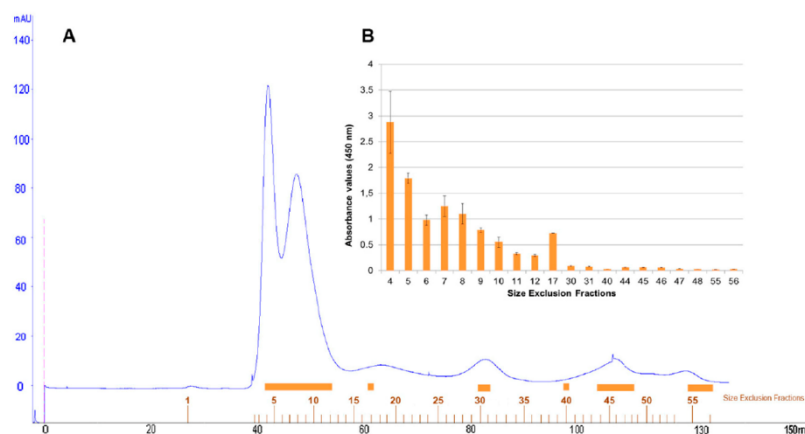


Figure 5. Elution profile of pistachio proteins obtained from preparative FPLC size exclusion column (A) showing absorbance values at 280 nm. (B) Indirect phage-dAb ELISA with some fractions obtained from FPLC (indicated by an orange bar). Absorbance values are the mean of duplicates. Error bars show the standard deviation for each set of data.

Fractions 4–17, belonging to the two major and first minor peaks, were detected by the PVF4 phage-dAb. In order to identify the specific proteins recognised by PVF4 phage-dAb, an SDS-PAGE of the pistachio extract and selected fractions was performed under reducing conditions. The most prominent electrophoretic bands had molecular weights ranging from ~20 kDa to ~35 kDa (Figure 6A).

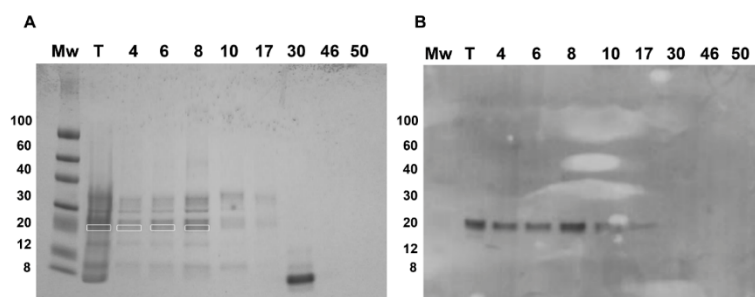


Figure 6. Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in reducing conditions of different fractions obtained in size exclusion chromatography (A) and immunoblot with PVF4 phage-dAb (B) of 10 μ g of pistachio extract (T) and 10 μ L of each fraction sample. Mw of the protein marker bands (ColorBurst™ Electrophoresis Protein Marker, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) is indicated. Highlighted bands were excised and analysed by matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF). Phage-dAb in the immunoblot was detected with anti-M13 monoclonal mouse antibody conjugated with Horseradish peroxidase (HRP).

The electrophoretic and Western blot patterns of total pistachio extract and fractions 4–17 were similar to those reported by Liu et al. [10] under reducing conditions with a murine monoclonal antibody against pistachio. A unique band of ~22 kDa was detected in the Western blot by the PVF4 phage-dAb (Figure 6B). According to Liu et al. [10], the target antigen is likely to be the basic subunit of the pistachio 11S globulin (allergen Pis v 2) that belongs to the cupin superfamily of proteins, and has been identified as a major pistachio allergen [4]. To verify the hypothesis, the bands from total extract and fractions 4, 6, and 8 recognised by the PVF4 phage-dAb were excised and analysed by matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF). As shown in Table S1, the peptides obtained from all the bands were identified in the amino acid sequence of the

11S globulin (*Pistacia vera*) (accession number: ABU42022). The coverage of the 11S sequence obtained was 45% in the case of lane T, 22% for lane 4, 30% for lane 6, and 25% for lane 8 (Table S1).

Here, 11S globulins are defined as bicupins owing to the presence of two cupin domains, each presenting a beta-barrel motif. They are non-glycosylated multimeric structures (hexamers or mixture of trimers) synthesised as a single polypeptide, which is post-translationally cleaved into an acidic (30–40 kDa) and a basic (22–27 kDa) polypeptides linked by a disulphide bond [4,5,10]. It should be noted that most of the peptides obtained from lanes 4, 6, and 8, aligned to the C-terminal region of the protein sequence, while peptides in the band from the total extract aligned throughout the whole sequence (Figure 7).

```

1  MGYSSLLSFS LGFLLLFHCS FAQIEQVVNS QQRQQQRFO TQCOIQNLNA
51  LEPKRRIESE AGVTEFDQNE EEQLQCANVA VFRHTIQSRG LLVPSYNNAP
101 ELVYVVQSGS IHGAVFPGCP ETFQEESQSQ SRSQHSRSEK SQQSGEQHQK
151 VRHIREGDII ALPAGVAHWI YNNGQSKLVL VALADVGNSE NQLDQYLRKF
201 VLGGSPPQEI QGGGQSWVSQ RSSRKGQSN NLSAFDEEI LAQSLNIDTQ
251 LVKKLQREK QRGIIVRVKE DLQVLSPPRQ EKEYSDNGLE ETFCTMTLKI
301 NINDPSRADV YNPRGGRVTS INALNLPILR FLQLSVEKGV LYQNAIMAPH
351 WNMNAHSIVY ITRGNRMQI VSENGSVFD EEIREGQLVV VPONFAVVKR
401 ASSDGFEEVVS FKTNGLAKIS QLAGRISVMR GLPLDVIONS FDISREDAWN
451 LKESRSEMTI FAPGSR_SQRQ RN

```

Figure 7. Amino acid sequence of the 11S globulin (*Pistacia vera*) (accession number: ABU42022). Positions of peptides identified by matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF) from lane ‘T’ in the Western blot are in red bold font. Positions of the peptides identified from the lane ‘4’ are underlined with green solid lines. Positions of the peptides identified from lanes ‘6’ and ‘8’ are discontinuous underlined.

The 3D structure of the pistachio 11S globulin (ABU42022) identified as target of the PVF4 phage-dAb by MALDI-TOF/TOF, was predicted by homology modelling, using the SWISS-MODEL server (Figure 8) <https://swissmodel.expasy.org/> [28]. The model was built through comparison to the closely related sequence and structure of the 11S globulin seed storage protein from *Amaranthus hypochondriacus* L., 3qac.1.A, which served as template. Most of the peptides identified by MALDI-TOF/TOF, seem to belong to the basic protein subunit (Cupine-1) of the 11S globulin [2,4]. This result agrees with Liu et al., [10], indicating that pistachio 11S globulin basic subunit is a good antigen for producing antibodies targeting human allergy relevant epitopes.

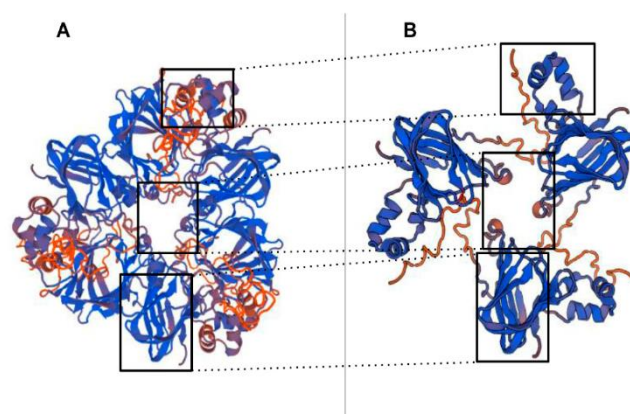


Figure 8. The 11S globulins are hexameric proteins with subunits comprising an acidic polypeptide 30–40 kDa in size that is disulphide-linked to a 20 kDa basic polypeptide. (A) SWISS-MODEL of a homo-trimer of pistachio 11S globulin seed storage protein (ABU42022), (B) SWISS-MODEL of the basic subunit homo-trimer recognised by PVF4-dAb, the rectangles show the possible epitope recognition zones.

3.5. Assay Specificity and Detection Limit

Indirect phage ELISA assay using precipitated phage-dAb antibody from clone PVF4 was able to detect pistachio proteins from all the raw and roasted pistachio kernels of different origins that were analysed (Spain, Iran, and the US). Roasted pistachios were used for the biopanning process in search for pistachio-specific recombinant antibodies because heat treatments may affect the solubility and integrity of the nut proteins and limit their recognition in the ELISA [29].

Experimental pistachio/corn flour mixtures instead of pistachio extract dilutions were prepared and analysed in the indirect phage-dAb ELISA to assess sensitivity because the food matrix may affect assay performance due to the presence of interfering matrix components. It was demonstrated that the assay was able to detect pistachio proteins in a corn flour matrix in a concentration-dependent manner (Figure 9). The four-parameter logistic equation obtained with the experimental data was $y = A_2 + (A_1 - A_2)/(1 + (x/x_0)^p)$; being $A_1 = 0.1735$, $A_2 = 4.2209$, $x_0 = 4.68007$, $p = 15.42781$ and $R^2 = 0.99869$. The limit of detection (LOD) of this indirect phage-dAb ELISA was 3983 mg kg^{-1} . The coefficients of variation were in the range of 2–15% for mixtures containing pistachio above the LOD. This LOD is higher than the detection limits reported for other immunoassays and commercial kits available to detect pistachio using polyclonal or monoclonal antibodies. The LOD of pistachio nut protein reported for the MonoTrace pistachio ELISA kit (BioFront Technologies, Tallahassee, FL, USA) and AgraQuant ELISA pistachio (Romer Labs, Tulln, Austria) are $0.12\text{--}0.13 \text{ mg kg}^{-1}$ in various matrices, while the LOD for several lateral flow devices (LFD) are in the range of $1\text{--}10 \text{ mg kg}^{-1}$ [5,10].

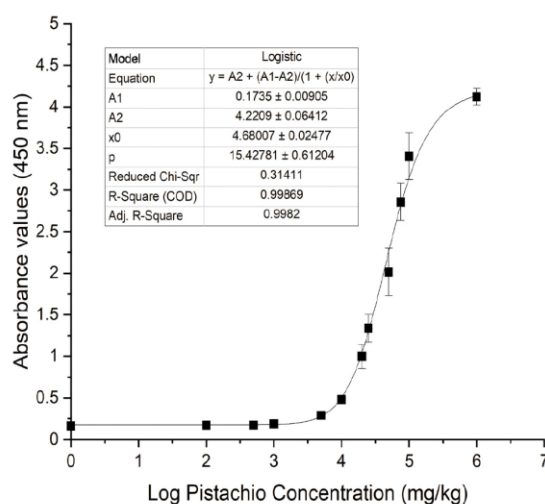


Figure 9. Standard curve of the phage-dAb enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) performed with protein extracts obtained from ground defatted pistachio (■) in corn flour binary mixtures. The plot shows the average values and the standard deviations corresponding to duplicate experiments performed in three different days.

Cross-reactivity of the assay was calculated as the amount of pistachio estimated by interpolating the absorbance values of the heterologous species in the logistic equation. Cross-reactivity assays using PVF4 phage-dAb showed that none of a wide variety of plant and animal species (Table 1) developed an absorbance signal higher than the LOD of pistachio proteins. Only the egg yolk extract produced a cross-reaction of 4.30%, but not the egg white. Even though this could produce some false positives in products containing egg yolk, most commercial products declaring egg usually contain egg white, which also contains most of the egg allergens [30] but does not cross-react in this assay. However, in contrast to other published immunoassays, that present a high cross-reaction with cashew (approximately 12% [5], or even higher than 90% [31]), the PVF4 phage-dAb does not cross-react with cashew. Hence, taken together these results suggest that the PVF4 phage-dAb ELISA is specific but not as sensitive as the previously developed real time PCR technique [11] for pistachio (0.1 mg kg^{-1}), or other published ELISA methods using polyclonal or monoclonal antibodies [32].

3.6. Analysis of Commercial Food Products

The applicability of the indirect phage ELISA method developed for detection of pistachio proteins in foodstuffs was assessed through analysis of 77 commercial products acquired at different stores of Madrid, including bakery and pastry products, energy bars, chocolates, ice creams, yoghurts, beverages, sauces and prepared dishes. The samples were classified into four groups depending on their content in pistachio and other nuts as declared in their labelling (Table 3).

Among the samples analysed, 34 were labelled as containing pistachio as ingredient, five labelled as 'pistachio traces', 29 declared to contain other tree nuts different than pistachio or tree nut traces, and the remaining nine did not declare to contain any nuts or traces thereof. In order to confirm the results obtained in the phage ELISA, samples were also analysed by the pistachio-specific real-time PCR method previously developed in our laboratory [11].

Table 3. Determination of the presence of pistachio in commercial processed food products using PVF4 phage-dAb ELISA and pistachio-specific real-time polymerase chain reaction (PCR).

Label Statement	Product	Number of Samples	Pistachio Phage-dAb ELISA ^a	Real Time PCR ^a
Pistachio declared as ingredient	Biscuit	2	−(2)	+(2)
	Cake	5	+(4)/−(1)	+(5)
	Chocolate	3	+(1)/−(2)	+(2)/−(1)
	Cold Meat	14	+(9)/−(5)	+(14)
	Pistachio Pate	1	−(1)	+(1)
	Breakfast Cereals	1	−(1)	+(1)
	Ice-cream	2	+(1)/−(1)	+(2)
	Snack	6	+(5)/−(1)	+(6)
Pistachio Traces	Biscuits	1	−(1)	−(1)
	Chocolate	1	−(1)	−(1)
	Cold Meat	1	−(1)	+(1)
	Stuffed Pasta	1	+(1)	+(1)
	Sausages	1	+(1)	+(1)
Contain other tree nuts or may contain tree nuts traces	Beverage	1	−(1)	−(1)
	Biscuit	4	−(4)	−(4)
	Bread	2	−(2)	−(2)
	Butter	1	−(1)	−(1)
	Cake	1	−(1)	−(1)
	Breakfast Cereals	4	−(4)	−(4)
	Cream	1	−(1)	−(1)
	Food Bar	7	−(7)	−(7)
	Ice-Cream	2	−(2)	−(2)
	Sandwich	1	−(1)	−(1)
	Sauce	2	−(2)	−(2)
	Snack	1	−(1)	−(1)
	Turrón	1	−(1)	−(1)
Yogurt	1	−(1)	−(1)	
Not declaring to contain nuts or traces	Beverage	1	−(1)	−(1)
	Biscuit	2	−(2)	−(2)
	Bread	2	−(2)	−(2)
	Cake	1	−(1)	−(1)
	Breakfast Cereals	1	−(1)	−(1)
	Ice-Cream	1	−(1)	−(1)
	Snack	1	−(1)	−(1)

^a Commercial food products showing estimated pistachio concentration lower than the limit of detection (LOD) in the phage-dAb ELISA, or $C_p > 30$ (equivalent to 1 mg kg^{-1} in PCR) were considered negative (−). The number of negative (−) and positive (+) samples detected are indicated in parenthesis.

From 34 commercial products containing pistachio in the list of ingredients, only a chocolate sample tested negative by real-time PCR. Nevertheless, 14 samples tested negative for pistachio by phage-dAb ELISA, including biscuits (2), cake (1), cold meat (5), chocolate (2), pate (1), breakfast cereal (1), ice-cream (1), and snack (1). Negative ELISA results could be explained either because the pistachio concentration in the products is below the LOD or because of a denaturation of the epitope recognised

by the phage-dAb due to food processing. In the case of the biscuits, chocolate, and cake samples that tested negative, the pistachio content was not specified in the label, and it could be below the LOD. Some samples that tested negative by ELISA but positive by PCR declared their pistachio content, like the cold meats (0.2–1%), pate (35% boiled pistachio), ice-cream (1.5%), and snack (5%), but they are heat treated products, where the processing temperature may have produced the unfolding of the tertiary structure of the proteins and the aggregation of protein chains, avoiding epitope binding by the phage-dAb [29,33].

Among the five products that included precautionary advisory labelling regarding pistachio, one was positive only by PCR (a cold meat), and two samples tested positive by both methods (a stuffed pasta and a sausage).

In the group of 29 samples with labels indicating that they contain tree nuts other than pistachio or tree nut traces, all samples were negative by the phage-ELISA and real-time PCR methods, verifying a correct food labelling. It should be noted that 10 of the samples declared cashew nuts in the ingredient list and all tested negative in both ELISA and PCR pistachio methods, demonstrating the absence of cross-reaction with cashew. Moreover, those samples tested positive in a cashew-specific real-time PCR method [34]. In the last group of nine nut-free products, all the samples were negative for pistachio.

4. Conclusions

To the best of our knowledge, this is the first time a pistachio-specific recombinant antibody has been produced for detection of allergenic pistachio in food products and the first immunoassay for this purpose that is produced without animal immunization. It was demonstrated that the best biopanning strategies to recover pistachio-specific phage-dAbs were those using defatted pistachio protein extract as the target. The LOD of the pistachio assay developed is higher than that of other reported immunoassays [5,10,31]. The PVF4-dAb targets the pistachio basic subunit of the 11S globulin, and it is absent from cross reactions with the closely related cashew nuts, that are common in commercial ELISAs for pistachio detection.

Supplementary Materials: The following is available online at <http://www.mdpi.com/2304-8158/9/9/1230/s1>, Table S1: Peptides identified by MALDI-TOF/TOF from electrophoretic bands recognised by the PVF4 phage-dAb in the pistachio extract (T) and in the chromatographic fractions 4, 6 and 8.

Author Contributions: Conceptualization—R.M. (Rosario Martín) and T.G.; Data curation—R.M. (Raquel Madrid); Formal analysis—R.M. (Raquel Madrid), A.G.-G., and T.G.; Funding acquisition—R.M. (Rosario Martín) and T.G.; Investigation—R.M. (Raquel Madrid); Methodology—R.M. (Raquel Madrid); Project administration—I.G. and T.G.; Resources—R.M. (Rosario Martín) and T.G.; Supervision—T.G.; Validation—R.M. (Raquel Madrid) and A.G.-G.; Writing—original draft, R.M. (Raquel Madrid); Writing—review and editing, T.G. and R.M. (Rosario Martín). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO, Spain) [AGL2017-84316-R] and by Comunidad de Madrid [Consejería de Educación S2018/BAA-4574]. Raquel Madrid and Aina García-García are recipients of pre- and postdoctoral contracts, respectively, from MINECO (Spain).

Acknowledgments: The proteomic analysis was performed in the Proteomic Unit of Complutense University of Madrid, a member of ProteoRed and is supported by grant PT17/0019, of the PE I+D+I 2017-2020, funded by ISCIII and ERDF. The Genomic analysis was performed in the Genomic Unit of Complutense University of Madrid.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bulló, M.; Juanola-Falgarona, M.; Hernández-Alonso, P.; Salas-Salvadó, J. Nutrition attributes and health effects of pistachio nuts. *Br. J. Nutr.* **2015**, *113*, S79–S93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Tawde, P.D. Allergenic Cross-Reactivity between Cashew and Pistachio Nuts. M.S. Thesis, Florida State University, Tallahassee, FL, USA, 2004.
3. Willison, L.N.; Tawde, P.; Robotham, J.M.; Penney, R.M.; Teuber, S.S.; Sathe, S.K.; Roux, K.H. Pistachio vicilin, Pis v 3, is immunoglobulin E-reactive and cross-reacts with the homologous cashew allergen, Ana o 1. *Clin. Exp. Allergy* **2008**, *38*, 1229–1238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Ahn, K.; Bardina, L.; Grishina, G.; Beyer, K.; Sampson, H.A. Identification of two pistachio allergens, Pis v 1 and Pis v 2, belonging to the 2S albumin and 11S globulin family. *Clin. Exp. Allergy* **2009**, *39*, 926–934. [CrossRef] [PubMed]
5. Costa, J.; Silva, I.; Vicente, A.A.; Oliveira, M.B.P.P.; Mafra, I. Pistachio nut allergy: An updated overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2019**, *59*, 546–562. [CrossRef] [PubMed]
6. World Health Organization and International Union of Immunological Societies, (WHO/IUIS). Allergen Search Results. Available online: http://www.allergen.org/search.php?allergen_source=Pistacia+vera (accessed on 28 August 2020).
7. Sicherer, S.H.; Sampson, H.A. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *141*, 41–58. [CrossRef] [PubMed]
8. Reese, I.; Holzhauser, T.; Schnadt, S.; Dölle, S.; Kleine-Tebbe, J.; Raithel, M.; Worm, M.; Zuberbier, T.; Vieths, S. Allergen and allergy risk assessment, allergen management, and gaps in the European Food Information Regulation (FIR). *Allergo. J. Int.* **2015**, *24*, 180–184. [CrossRef]
9. Costa, J.; Fernandes, T.J.R.; Villa, C.; Oliveira, M.B.P.P.; Mafra, I. Advances in food allergen analysis. In *Food Safety: Innovative Analytical Tools for Safety Assessment*; Spizzirri, G., Cirillo, G., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2017; pp. 305–360. ISBN 9781119160588.
10. Liu, C.; Chhabra, G.S.; Sathe, S.K. Pistachio (*Pistacia vera* L.) detection and quantification using a murine monoclonal antibody-based direct sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 9139–9149. [CrossRef]
11. López-Calleja, I.M.; de la Cruz, S.; González, I.; García, T.; Martín, R. Survey of undeclared allergenic pistachio (*Pistacia vera*) in commercial foods by hydrolysis probe real-time PCR. *Food Control.* **2014**, *39*, 49–55. [CrossRef]
12. European Parliament. European Union Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Off. J. Eur. Union* **2010**, *L276*, 33–79.
13. de la Cruz, S.; Cubillos-Zapata, C.; López-Calleja, I.M.; Ghosh, S.; Alcocer, M.; González, I.; Martín, R.; García, T. Isolation of recombinant antibody fragments (scFv) by phage display technology for detection of almond allergens in food products. *Food Control.* **2015**, *54*, 322–330. [CrossRef]
14. Madrid, R.; de la Cruz, S.; García, A.; Martín, R.; González, I.; García, T. Detection of food allergens by phage-displayed produced antibodies. In *Food Allergens. Methods in Molecular Biology*; Lin, J., Alcocer, M., Eds.; Humana Press: New York, NY, USA, 2017; Volume 1592, pp. 109–128.
15. Bannas, P.; Hambach, J.; Koch-Nolte, F. Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics. *Front. Immunol.* **2017**, *8*. [CrossRef] [PubMed]
16. Hoogenboom, H.R.; de Bruine, A.P.; Hufton, S.E.; Hoet, R.M.; Arends, J.-W.; Roovers, R.C. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* **1998**, *4*, 1–20. [CrossRef]
17. Lee, C.M.Y.; Iorno, N.; Sierro, F.; Christ, D. Selection of human antibody fragments by phage display. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 3001–3008. [CrossRef]
18. Christ, D.; Famm, K.; Winter, G. Tapping diversity lost in transformations—in vitro amplification of ligation reactions. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e108. [CrossRef]
19. Madrid, R.; de la Cruz, S.; García-García, A.; Alcocer, M.J.C.; González, I.; García, T.; Martín, R. Multimeric recombinant antibody (scFv) for ELISA detection of allergenic walnut. An alternative to animal antibodies. *J. Food Compos. Anal.* **2018**, *67*, 201–210. [CrossRef]
20. Sechi, S.; Chait, B.T. Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 5150–5158. [CrossRef] [PubMed]
21. Tanha, J.; Xu, P.; Chen, Z.; Ni, F.; Kaplan, H.; Narang, S.A.; MacKenzie, C.R. Optimal design features of camelized human single-domain antibody libraries. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 24774–24780. [CrossRef] [PubMed]
22. Dreher, M.L. Pistachio nuts: Composition and potential health benefits. *Nutr. Rev.* **2012**, *70*, 234–240. [CrossRef]
23. Küçüköner, E.; Yurt, B. Some chemical characteristics of *Pistacia vera* varieties produced in Turkey. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *217*, 308–310. [CrossRef]
24. Yang, J.; Liu, R.H.; Halim, L. Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds. *LWT-Food Sci. Technol.* **2009**, *42*, 1–8. [CrossRef]
25. Ozdal, T.; Capanoglu, E.; Altay, F. A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Res. Int.* **2013**, *51*, 954–970. [CrossRef]

26. Moo-Huchin, V.M.; Canto-Pinto, J.C.; Cuevas-Glory, L.F.; Sauri-Duch, E.; Pérez-Pacheco, E.; Betancur-Ancona, D. Effect of extraction solvent on the phenolic compounds content and antioxidant activity of Ramon nut (*Brosimum alicastrum*). *Chem. Pap.* **2019**, *73*, 1647–1657. [[CrossRef](#)]
27. Niccheri, F.; Real-Fernández, F.; Ramazzotti, M.; Lolli, F.; Rossi, G.; Rovero, P.; Degl’Innocenti, D. Human recombinant domain antibodies against multiple sclerosis antigenic peptide CSF114(Glc). *J. Mol. Recognit.* **2014**, *27*, 618–626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F.T.; de Beer, T.A.P.; Rempfer, C.; Bordoli, L.; et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W296–W303. [[CrossRef](#)]
29. Sathe, S.K.; Teuber, S.S.; Roux, K.H. Effects of food processing on the stability of food allergens. *Biotechnol. Adv.* **2005**, *23*, 423–429. [[CrossRef](#)]
30. Benedé, S.; López-Expósito, I.; Molina, E.; López-Fandiño, R. Egg proteins as allergens and the effects of the food matrix and processing. *Food Funct.* **2015**, *6*, 694–713. [[CrossRef](#)]
31. Cho, C.Y.; Nowatzke, W.; Oliver, K.; Garber, E.A.E. Multiplex detection of food allergens and gluten. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 4195–4206. [[CrossRef](#)]
32. de la Cruz, S.; López-Calleja, I.; Martín, R.; González, I.; Alcocer, M.; García, T. Recent advances in the detection of allergens in foods. In *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*; Humana Press: New York, NY, USA, 2017; Volume 1592, pp. 263–295.
33. Boles, J.A. Thermal Processing. In *Handbook of Meat Processing*; Blackwell Publishing: Hoboken, NJ, USA, 2010; pp. 169–183. ISBN 9780813821825.
34. López-Calleja, I.M.; de la Cruz, S.; González, I.; García, T.; Martín, R. Development of real-time PCR assays to detect cashew (*Anacardium occidentale*) and macadamia (*Macadamia intergrifolia*) residues in market analysis of processed food products. *LWT-Food Sci. Technol.* **2015**, *62*, 233–241. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article

Phage displayed domain antibodies (dAb) for detection of allergenic pistachio proteins in foods

Raquel Madrid¹, Aina García-García¹, Isabel González¹, Rosario Martín¹ and Teresa García^{1*}

Supplementary material

Table S1. Peptides identified by MALDI-TOF/TOF from electrophoretic bands recognised by the PVF4 phage-dAb in the pistachio extract (T) and in the chromatographic fractions 4, 6 and 8.

Lane	Protein identification	Accession number	Sequence coverage	Total score	Ion scores	Peptide sequences
T	11S globulin [<i>Pistacia vera</i>]	gi 156001070	45 %	179		R.FQTQCQIQNLNALEPKR.R R.RIESEAGVTEFWDQNEEQLQCANVAVFR.H R.SQQSGEQHQK.V K.LVLVALADVGNSENQLDQYLR.K K.LNINDPSRADVYNPR.G R.VTSINALNLPILR.F R.FLQLSVEK.G K.GVLYQNAIMAPHWNMNAHSIVYITR.G R.MQIVSENGESVFDEEIR.E R.EGQLVVVPQNFVAVVVR.A K.RASSDGFVWVSK.T R.GLPLDVIQNSFDISREDAWNLK.E R.SEMTIFAPGSR.S
4	11S globulin [<i>Pistacia vera</i>]	gi 156001070	22 %	217	89 73	K.LNINDPSRADVYNPR.G R.VTSINALNLPILR.F R.FLQLSVEK.G R.MQIVSENGESVFDEEIR.E R.EGQLVVVPQNFVAVVVR.A K.RASSDGFVWVSK.T R.GLPLDVIQNSFDISR.E R.SEMTIFAPGSR.S
6	11S globulin [<i>Pistacia vera</i>]	gi 156001070	30 %	130		K.LNINDPSR.A R.FLQLSVEK.G R.ADVYNPRGGR.V R.SQQSGEQHQK.V R.SEMTIFAPGSR.S R.ASSDGFVWVSK.T R.SQQSGEQHQKVR.H R.VTSINALNLPILR.F R.EGQLVVVPQNFVAVVVR.R R.GLPLDVIQNSFDISR.E K.LNINDPSRADVYNPR.G R.EGQLVVVPQNFVAVVVR.A R.FQTQCQIQNLNALEPKR.R R.MQIVSENGESVFDEEIR.E R.FQTQCQIQNLNALEPKR.R R.GLPLDVIQNSFDISREDAWNLK.E
8	11S globulin [<i>Pistacia vera</i>]	gi 156001070	25 %	276	47 64 114	R.SERSQQSGEQHQK.V K.LNINDPSR.A K.LNINDPSRADVYNPR.G R.VTSINALNLPILR.F R.FLQLSVEK.G R.MQIVSENGESVFDEEIR.E R.EGQLVVVPQNFVAVVVR.A R.ASSDGFVWVSK.T R.GLPLDVIQNSFDISR.E R.SEMTIFAPGSR.S

Figura IV.3.S1. Secuencias nucleotídicas clones dAb.

PVF4 - dAb	caggtgcagctgttggagctctggggaggcttggtacagcctggggggtccctgcgtctc	60
PVD6 - dAb	caggtgcagctgttggagctctggggaggcttggtacagcctggggggtccctgcgtctc	60
PVE12 - dAb	caggtgcagctgttggagctctggggaggcttggtacagcctggggggtccctgcgtctc	60
PVH7 - dAb	caggtgcagctgttggagctctggggaggcttggtacagcctggggggtccctgcgtctc	60
PVA8 - dAb	caggtgcagctgttggagctctggggaggcttggtacagcctggggggtccctgcgtctc	60
PVF9 - dAb	caggtgcagctgttggagctctggggaggcttggtacagcctggggggtccctgcgtctc	60
PVB9 - dAb	caggtgcagctgttggagctctggggaggcttggtacagcctggggggtccctgcgtctc	60
PVF6 - dAb	caggtgcagctgttggagctctggggaggcttggtacagcctggggggtccctgcgtctc *****	60
PVF4 - dAb	tcctgtgcagcctccggagtagccttaacaattaggttatgagctgggtccgccaggct	120
PVD6 - dAb	tcctgtgcagcctccggagtagccttaacaattaggttatgagctgggtccgccaggct	120
PVE12 - dAb	tcctgtgcagcctccggagtagccttaacaattaggttatgagctgggtccgccaggct	120
PVH7 - dAb	tcctgtgcagcctccggagtagccttaacaattaggttatgagctgggtccgccaggct	120
PVA8 - dAb	tcctgtgcagcctccggagtagccttaacaattaggttatgagctgggtccgccaggct	120
PVF9 - dAb	tcctgtgcagcctccggagtagccttaacaattaggttatgagctgggtccgccaggct	120
PVB9 - dAb	tcctgtgcagcctccggagtagccttaacaattaggttatgagctgggtccgccaggct	120
PVF6 - dAb	tcctgtgcagcctccggagtagccttaacaattaggttatgagctgggtccgccaggct ***** ** * * * * * * * * *****	120
PVF4 - dAb	ccaggggaagggctagagtggggtatcaaccattcgtacgcaaacggtagcacatactac	180
PVD6 - dAb	ccaggggaagggctagagtggggtatcaaccattcgtacgcaaacggtagcacatactac	180
PVE12 - dAb	ccaggggaagggctagagtggggtatcaaccattcgtacgcaaacggtagcacatactac	180
PVH7 - dAb	ccaggggaagggctagagtggggtatcaaccattcgtacgcaaacggtagcacatactac	180
PVA8 - dAb	ccaggggaagggctagagtggggtatcaaccattcgtacgcaaacggtagcacatactac	180
PVF9 - dAb	ccaggggaagggctagagtggggtatcaaccattcgtacgcaaacggtagcacatactac	180
PVB9 - dAb	ccaggggaagggctagagtggggtatcaaccattcgtacgcaaacggtagcacatactac	180
PVF6 - dAb	ccaggggaagggctagagtggggtatcaaccattcgtacgcaaacggtagcacatactac ***** * * * * * * * * *****	180
PVF4 - dAb	gcagactccgtgaagggccggttcaccatctcccgtagcaaatccaagaacacgctgtat	240
PVD6 - dAb	gcagactccgtgaagggccggttcaccatctcccgtagcaaatccaagaacacgctgtat	240
PVE12 - dAb	gcagactccgtgaagggccggttcaccatctcccgtagcaaatccaagaacacgctgtat	240
PVH7 - dAb	gcagactccgtgaagggccggttcaccatctcccgtagcaaatccaagaacacgctgtat	240
PVA8 - dAb	gcagactccgtgaagggccggttcaccatctcccgtagcaaatccaagaacacgctgtat	240
PVF9 - dAb	gcagactccgtgaagggccggttcaccatctcccgtagcaaatccaagaacacgctgtat	240
PVB9 - dAb	gcagactccgtgaagggccggttcaccatctcccgtagcaaatccaagaacacgctgtat	240
PVF6 - dAb	gcagactccgtgaagggccggttcaccatctcccgtagcaaatccaagaacacgctgtat *** ** *****	240
PVF4 - dAb	ctgcaaatgaacagcctgcgtgcccaggacaccgcggtatattattgcgcggtaaatcat	300
PVD6 - dAb	ctgcaaatgaacagcctgcgtgcccaggacaccgcggtatattattgcgcggtaaatcat	300
PVE12 - dAb	ctgcaaatgaacagcctgcgtgcccaggacaccgcggtatattattgcgcggtaaatcat	300
PVH7 - dAb	ctgcaaatgaacagcctgcgtgcccaggacaccgcggtatattattgcgcggtaaatcat	300
PVA8 - dAb	ctgcaaatgaacagcctgcgtgcccaggacaccgcggtatattattgcgcggtaaatcat	300
PVF9 - dAb	ctgcaaatgaacagcctgcgtgcccaggacaccgcggtatattattgcgcggtaaatcat	300
PVB9 - dAb	ctgcaaatgaacagcctgcgtgcccaggacaccgcggtatattattgcgcggtaaatcat	300
PVF6 - dAb	ctgcaaatgaacagcctgcgtgcccaggacaccgcggtatattattgcgcggtaaatcat *****	300
PVF4 - dAb	agt-----actaacgcctacgtggggttttgggtcagggga	336
PVD6 - dAb	aag-----gagtacactcgtcagggtcttgggggtcagggga	336
PVE12 - dAb	aggcgt-----gggaacgagtacctcagatttgggggtcagggga	339
PVH7 - dAb	ctggtagggac-----gagttgggggatgtagaacagagatgcccttgggggtcagggga	354
PVA8 - dAb	tc-----gagtcgttacaacaagttccctatttgggggtcagggga	339
PVF9 - dAb	gg-----gggttttggccaccctcgcacttttgggggtcagggga	339
PVB9 - dAb	ggggaataggaatgatcgtgttggccttcggagcagccgatggactatttgggggtcagggga	360
PVF6 - dAb	gggtatagt-----cgaggcgttccgctatttgggggtcagggga * * * *****	339
PVF4 - dAb	accctggtcaccgtctcgagcgcggccgcagaacaaaaactcatctcagaagaggatctg	396
PVD6 - dAb	accctggtcaccgtctcgagcgcggccgcagaacaaaaactcatctcagaagaggatctg	396
PVE12 - dAb	accctggtcaccgtctcgagcgcggccgcagaacaaaaactcatctcagaagaggatctg	399
PVH7 - dAb	accctggtcaccgtctcgagcgcggccgcagaacaaaaactcatctcagaagaggatctg	414
PVA8 - dAb	accctggtcaccgtctcgagcgcggccgcagaacaaaaactcatctcagaagaggatctg	399
PVF9 - dAb	accctggtcaccgtctcgagcgcggccgcagaacaaaaactcatctcagaagaggatctg	399
PVB9 - dAb	accctggtcaccgtctcgagcgcggccgcagaacaaaaactcatctcagaagaggatctg	420
PVF6 - dAb	accctggtcaccgtctcgagcgcggccgcagaacaaaaactcatctcagaagaggatctg *****	399
PVF4 - dAb	aattcggccgcacattatacagacatagagatgaaccgacttggaaagggggccgcatag	456
PVD6 - dAb	aattcggccgcacattatacagacatagagatgaaccgacttggaaagggggccgcatag	456
PVE12 - dAb	aattcggccgcacattatacagacatagagatgaaccgacttggaaagggggccgcatag	459
PVH7 - dAb	aattcggccgcacattatacagacatagagatgaaccgacttggaaagggggccgcatag	474
PVA8 - dAb	aattcggccgcacattatacagacatagagatgaaccgacttggaaagggggccgcatag	459
PVF9 - dAb	aattcggccgcacattatacagacatagagatgaaccgacttggaaagggggccgcatag	459
PVB9 - dAb	aattcggccgcacattatacagacatagagatgaaccgacttggaaagggggccgcatag	480
PVF6 - dAb	aattcggccgcacattatacagacataagatgaaccgacttggaaagggggccgcatag *****	459

IV.4

PRODUCCIÓN DE UN dAb ESPECÍFICO FRENTE A PROTEÍNAS DE PISTACHO, BIOTINILADO *IN VIVO* EN LA LEVADURA METILOTRÓFICA *PICHIA PASTORIS*

En el trabajo anterior se consiguió aislar a partir de un repertorio de dAbs (anticuerpos de dominio único), un fago-anticuerpo que reconoce específicamente al pistacho, denominado PVF4. Este anticuerpo presentaba un codón de stop Ámbar (TAG) en la secuencia del CDR1, pero su producción como fago-anticuerpo no entraña dificultad porque se emplea la cepa supresora de *E. coli* TG1, que traduce el codón TAG por glutamina. El problema surge cuando se dispone de un sistema de expresión a gran escala del anticuerpo soluble que no es supresor de ese codón de stop, como es la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* X33.

Con el fin de mejorar la producción de anticuerpos recombinantes en *Pichia pastoris*, se llevó a cabo mutagénesis dirigida mediante cebadores específicos que permitió el cambio del primer nucleótido del codón de stop TAG por un codón CAG que codifica para una glutamina. Este cambio no afectaba ni a la estructura del anticuerpo ni a su reconocimiento debido a que la glutamina en esa posición es un aminoácido conservado en secuencias de inmunoglobulinas. Mediante secuenciación se comprobó el cambio introducido en el vector de expresión, y este vector se utilizó para la transformación en *Pichia pastoris*. Se realizó a continuación la cotransformación de ese clon mediante la incorporación de la secuencia de la enzima biotín ligasa (BirA) para conseguir la biotinilación *in vivo* de los dAbs.

Para confirmar la especificidad y seleccionar el clon con mayor producción del anticuerpo recombinante PVF4 se realizaron ensayos de inducción de *Pichia pastoris*, electroforesis en SDS, ELISA y *dot blot*. El clon denominado PVF4-m5.BirA fue el seleccionado para la producción a gran escala de anticuerpos recombinantes de tipo dAb específicos de pistacho.

Raquel Madrid, Aina García-García, Isabel González, Rosario Martín, Teresa García (2022). *In vivo* production of biotinylated dAb specific to pistachio protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.

Manuscrito en preparación. Resultados pendientes de publicación.

1. Introducción

En la actualidad, para la producción de proteínas recombinantes se dispone de una gran variedad de sistemas de expresión. Uno de los sistemas más utilizados es *Pichia pastoris*, levadura metilotrófica que utiliza el metanol como fuente de carbono y de energía y que permite el procesamiento y plegamiento de proteínas con modificaciones postraduccionales.

El fago-anticuerpo PVF4 específico de pistacho se obtuvo a partir de una genoteca comercial de dAbs en un modelo bacteriano (*E. coli* TG1). Una vez analizada su sensibilidad, especificidad y empleabilidad para el análisis de productos comerciales mediante el desarrollo de un ELISA indirecto (Madrid *et al.*, 2020), se planteó la producción de los anticuerpos recombinantes solubles y biotinilados para su posterior multimerización. Para ello, se escogió a *Pichia pastoris* X-33 como organismo productor. Esta levadura metilotrófica es un sistema de producción que se caracteriza por su crecimiento hasta alcanzar densidades celulares muy altas, por los fuertes promotores regulados, y por la capacidad de producir gramos de proteína recombinante por litro de cultivo, tanto intracelular como extracelularmente (Ahmad *et al.*, 2014). Tiene, entre otras ventajas, la facilidad de inicio de la transcripción por adición de metanol. Pero esta producción se puede ver truncada por los problemas de proteólisis (reducción del rendimiento del producto, pérdida de actividad biológica y contaminación de la muestra con productos de la degradación) (Jahic, 2003), por la presencia de algún codón de parada en la secuencia de la proteína recombinante o por la presencia de aminoácidos antinaturales que se incorporan en la secuencia traducida en respuesta a la presencia de un codón Ámbar (TAG) (Wiltschi, 2016; Young *et al.*, 2009; Young y Schultz, 2010) .

2. Material y Métodos

2.1. Transformación de *Pichia pastoris* para la producción del dAb PVF4 biotinilado

Para conseguir la producción *in vivo* de los dAbs PVF4 biotinilados en *Pichia pastoris* se partió del vector pPICZα (pRAS002) que contenía el dominio aceptor de biotina (BAP). Posteriormente, el clon obtenido se cotransformó con el vector pPIC6α que contenía la secuencia de la enzima biotín ligasa, BirA (pRAS002.BirA). Los clones obtenidos de esta cotransformación se analizaron mediante técnicas de secuenciación, PCR, *Western blot* y ELISA.

2.2. Mutagénesis dirigida

Para llevar a cabo la mutagénesis, a partir del plásmido pRAS002 obtenido anteriormente, que se encontraba en *E. coli* DH5 α (es importante que se encuentre en esta cepa para que el ADN parental sin la mutación se encuentre metilado), se realizó una amplificación por PCR con 50 ng de plásmido, los dos *primers* (PV4_T100_c_For_1 y PV4_T100_c_Rev_1) diseñados específicamente con este fin, dNTPs y la enzima Taq pFU (*Proofreading high-fidelity*). La amplificación consistió en 15 ciclos, con la fase de anillamiento a 56 °C durante un minuto, y una fase de elongación a 68 °C en la que se emplearon 2 min por cada Kb, es decir, unos 8 min. Tras la amplificación por PCR, el ADN metilado/parental, que no contiene la mutación introducida, se digirió con la enzima de restricción Dpn I durante 1 h y 30 min a 37 °C. Posteriormente, 3 μ L del producto de la digestión se añadieron a 50 μ L de células supercompetentes XL1-Blue, y se transformaron mediante shock térmico. Se seleccionaron 10 colonias al azar para amplificar, extraer el plásmido y secuenciar, para confirmar que la mutación se había introducido.

Para la amplificación de la secuencia de dAb a partir de colonias individuales se usaron los cebadores MJA254 y MJA253, y para la amplificación de la secuencia de los cebadores MJA255 y MJA256 (Tabla IV.1.1). La PCR se llevó a cabo utilizando My Taq Mix 2x (Bioline Reagents Limited, Londres, Reino Unido) y el siguiente programa de PCR: primero 95 °C durante 9 min, después 30 ciclos consistentes en 95 °C durante 30 s, 62 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s, seguidos de una extensión final a 72 °C durante 7 min. Los productos de la PCR se examinaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %.

La transformación en *Pichia pastoris* se detalla en la sección 2.8 del capítulo IV.1, así como, la metodología de la electroporación y la inducción de *Pichia pastoris*. Las transformaciones tanto en XL1 Blue como en HB2151 se llevaron a cabo según las recomendaciones del fabricante.

La producción del dAb, biotinilado y sin biotinar se llevó a cabo según el proceso descrito en la sección 2.9 del capítulo IV.1, pero mediante columna de Ni-NTA con gradiente de imidazol según recomendaciones del fabricante.

Los sobrenadantes se analizaron mediante *dot blot* para comprobar la presencia de dAb biotinilado utilizando ExtrAvidina-HRP (Sigma-Aldrich, SKU E2886) (1:5000 v/v) en BSA al 1 % para su detección, y la membrana se reveló con el sustrato quimioluminiscente Clarity *Western ECL* (Bio-Rad).

Para realizar un ELISA indirecto, se tapizó la placa con extractos de pistacho, nuez, almendra y cacahuete, se bloqueó con BSA al 3 %, se añadió el sobrenadante de *Pichia pastoris* en BSA con TBS en una relación de 1:7,5. Por último, se añadió el anticuerpo secundario anti-His-HRP (1:10.000) y se reveló con sustrato TMB.

Los ensayos electroforéticos para la confirmación de la presencia de los dAb biotinilados se realizaron en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12 % en condiciones no reductoras. El gel se tiñó con Coomassie Brilliant Blue R- 250, y las bandas de interés se recortaron con un bisturí y se sumergieron en una solución de ácido acético al 5 % (v/v). El análisis de los péptidos se realizó en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF Analyzer 4800 Plus (AB SCIEX, MA, USA), en la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid (España). Otros geles de SDS-PAGE se usaron para llevar a cabo ensayos de *Western blot* que se describen en la sección 2.8 del capítulo IV.2.

3. Resultados

El análisis por PCR con los *primers* MJA254 y MJA259 de los clones obtenidos tras la cotransformación de *Pichia pastoris* con los vectores pPICZ α (que contiene la secuencia del BAD) y pMJA180 (que codifica para la enzima BirA) puso de manifiesto que contenían en su interior la secuencia del dAb específico de pistacho (423 pb) tanto en el clon pRAS002 y pRAS002.BirA (Figura IV.4.1A). Además, para corroborar la presencia de la enzima biotín ligasa en el clon pRAS002.BirA, se llevó a cabo otra PCR con los *primers* MJA255 y MJA256 que amplifican la secuencia de BirA, obteniéndose una banda del tamaño correspondiente (~ 900 pb) (Figura IV.4.1B).

El clon pRAS002.BirA fue inducido para la producción del dAb biotinilado, pero ni análisis de *dot blot*, *Western blot* ni ELISA determinaron la presencia de la producción de un anticuerpo válido, porque no reconocía su diana, y tampoco era reconocido por otros anticuerpos comerciales. El sobrenadante inducido fue purificado a través de una columna de afinidad por la proteína A, y no se obtuvo ningún pico de purificación.

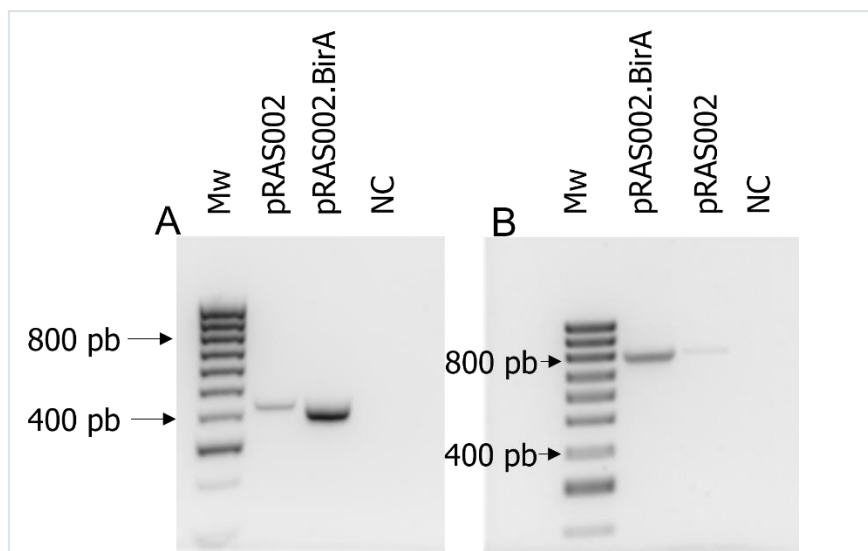


Figura IV.4.1. Análisis electroforético de los productos de las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) obtenidos de los clones pRAS002 y pRAS002.BirA de *Pichia pastoris* usando los primers MJA254/259 que amplifican la secuencia del dAB (A) y MJA255/MJA256 que amplifican la secuencia de la BirA (B). NC=PCR negative control, Mw=molecular weight marker Hyperladder IV.

La secuenciación del clon PVF4 puso de manifiesto la presencia de un codón Ámbar. Por este motivo, se planteó realizar mutagénesis dirigida en el codón TAG, cambiándolo a CAG (Gln), como sería traducido en el sistema supresor de Ámbar de *E. coli* TG1 (Figura IV.4.2). El primer paso consistió en el diseño de cebadores o *primers* que incluyeran el cambio:

- PV4 T100 c for 1 (5'-ctccggagttagccttaacaat**C**aggttatgagctgg-3')
- PV4 T100 c rev 1 (5'-ccagctcataacct**G**attgtaaggctaactccggag-3')

En la mayoría de las genotecas empleadas para la selección de anticuerpos frente a proteínas es frecuente la aparición del codón Ámbar. Esta mutación es generada al azar dentro de la secuencia de codificación del anticuerpo, y no interfiere durante el proceso de *biopanning* y selección de los fagos en la cepa bacteriana *E. coli* TG1, donde el codón TAG se traduce como glutamina, pero impide la expresión del scFv soluble en cepas no supresoras (Marcus *et al.*, 2006; Ossysek *et al.*, 2015).

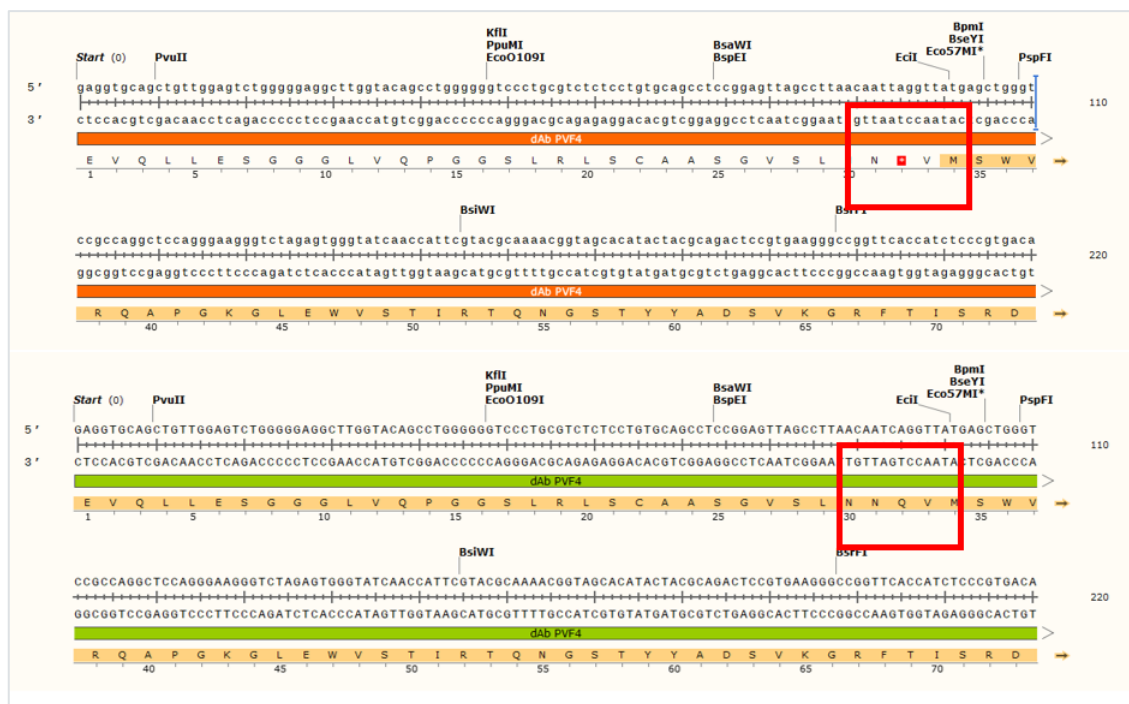


Figura IV.4.2. Secuencia nucleotídica y aminoacídica del clon dAb PVF4. Recuadro rojo marca la posición del codón Ámbar sin mutar (secuencia naranja) y mutado por cambio de TAG a CAG (secuencia verde).

En *E. coli* HB2151 o *Pichia pastoris*, utilizadas para la selección y secreción de anticuerpos solubles, el codón Ámbar se traduce como señal de parada, por lo que no se produce el anticuerpo de longitud completa y no se detecta ninguna unión antígeno-anticuerpo, a no ser que un supresor inhiba la acción de este codón Ámbar (Tolner *et al.*, 2013; Young *et al.*, 2009). En esta Tesis Doctoral también se encontró este problema, ya que las secuencias de numerosos dAbs seleccionados contenían un codón Ámbar en CDR1 del V_H como en el caso del dAb PVF4.

Al confirmarse que las 10 colonias seleccionadas tras la mutagénesis incluían el cambio, se extrajo el fragmento que codifica la secuencia del dAb mutado mediante digestión con enzimas de restricción *Pst I* y *Not I*, y se introdujo en el plásmido pPICZa con el BAD, y ese vector se introdujo en células electrocompetentes HB2151. Se obtuvieron en total 16 colonias, se seleccionó una de ellas y se realizó una PCR con los *primers* MJA253 y MJA254. En la Figura IV.4.3, se demuestra la presencia de la secuencia del dAb de pistacho en el clon mutado.

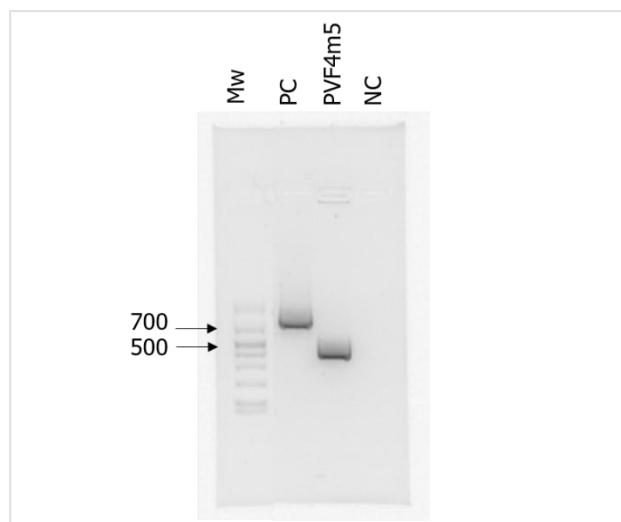


Figura IV.4.3. Análisis electroforético del producto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) obtenido del clon pRAS002 mutado (PVF4m5) usando los primers MJA254 y MJA253. PC=control positivo de PCR (scFv), NC=control negativo, Mw=molecular weight Biomarker Low Bioventures.

El siguiente paso consistió en la transformación de *Pichia pastoris* con el nuevo vector pRAS002m (PVF4m5) que previamente se había linearizado con la enzima de restricción *Sac I*. Se obtuvieron aproximadamente 100 colonias de las que seleccionaron 10 al azar para crecer en medio de cultivo YPD y hacer una PCR con los cebadores MJA253 y MJA254. De las 10 colonias, sólo 6 presentaron el tamaño adecuado para la secuencia del dAb, por lo que la eficiencia de la transformación fue del 60 % (Figura IV.4.4).

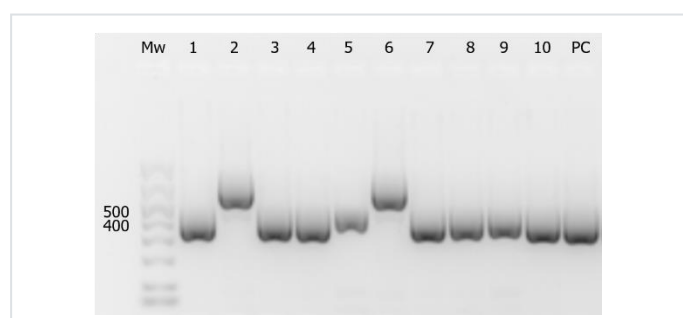


Figura IV.4.4. Análisis electroforético de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) obtenidos de las colonias (de 1 a 10) de *Pichia pastoris* con el vector pRAS002 mutado (PVF4m5) usando los primers MJA254 y MJA253. PC=control positivo de PCR (dAb), Mw=molecular weight Biomarker Low Bioventures.

Antes de cotransformar uno de los clones que contienen el dAb PVF4 con el BAD, con el vector que contiene la enzima biotín ligasa, se quiso confirmar la posibilidad de producción del anticuerpo una vez ha sido mutado. Para ello, los clones 1, 3, 4, 7, 8 y 10 fueron

sometidos a inducción con metanol a diferentes temperaturas (27 °C, 25 °C y 20 °C), y la producción de dAbs en el sobrenadante de *Pichia pastoris* se evaluó por *dot blot* (Figura IV.4.5).

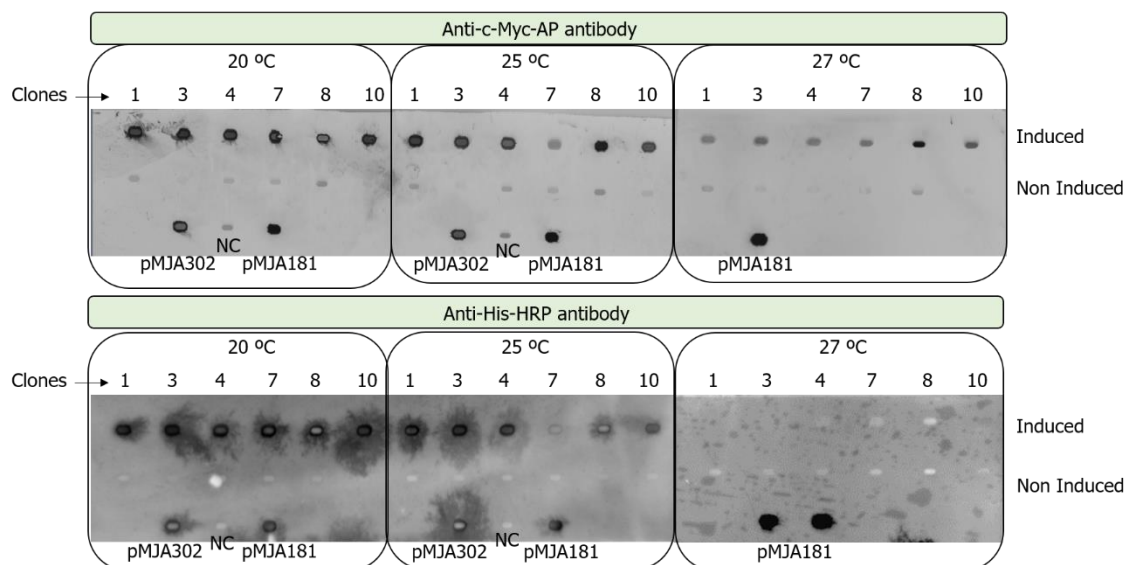


Figura IV.4.5. Análisis por dot blot de los sobrenadantes de cultivo de diferentes clones de *Pichia pastoris* antes y después de la inducción con metanol, revelados con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-c-Myc-AP o con un anticuerpo anti-His-HRP. NC: control negativo, *Pichia pastoris* X-33 sin transformar; Control positivo: pMJA302 (García-García et al., 2020) dAb frente a gluten y pMJA181 (de la Cruz et al., 2016) scFv frente a almendra.

El análisis electroforético de los sobrenadantes de los cultivos de *Pichia pastoris* (Figura IV.4.6), puso de manifiesto la aparición de un mayor número de bandas a la temperatura de incubación de 25 °C y que a 20 °C. A la temperatura de incubación de 27 °C, se observaron las mismas bandas que a 25 °C pero en el clon 8 se puede observar una banda extra de un tamaño aproximado de 20 kDa. Esa banda, junto con las tres bandas diferentes del clon 3, fueron sometidas a un análisis de MALDI-TOF/TOF, en el que las bandas del clon 3 presentaron péptidos de inmunoglobulinas.

Una vez corroborada la presencia de inmunoglobulinas (dAb) producidas en el sobrenadante, se realizó un ELISA indirecto para confirmar que el anticuerpo recombinante permanecía estable para el reconocimiento de pistacho a las temperaturas de 20 y 25 °C.

Las absorbancias obtenidas a 450 nm se detallan en la Figura IV.4.7, donde se observa una mayor inespecificidad a temperaturas bajas que a 25 °C, donde las reacciones cruzadas son casi inexistentes.

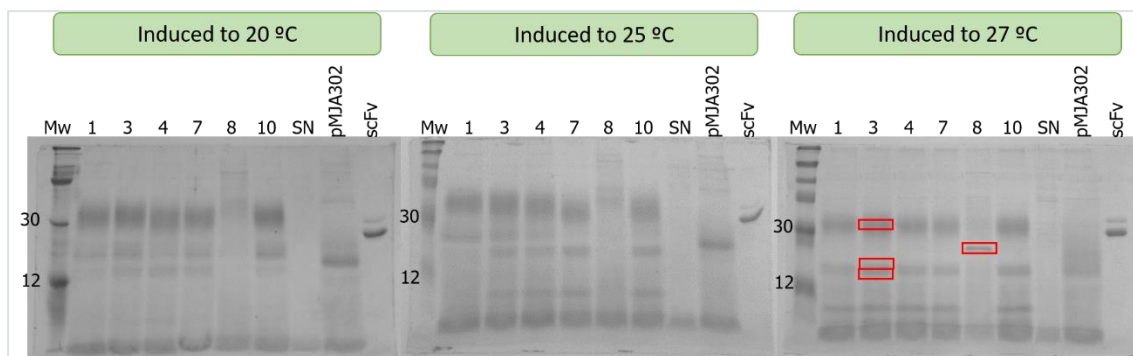


Figura IV.4.6. Análisis electroforético en SDS (sodium dodecyl sulphate) 4-20 % bajo condiciones reductoras, de los sobrenadantes de cultivo de diferentes clones de *Pichia pastoris* inducidos con metanol. Mw: ColorBurst™ Electrophoresis Protein Marker; SN: control negativo, sobrenadante de cultivo de *Pichia pastoris* X-33 sin transformar; Control positivo: pMJA302 (García-García et al., 2020) dAb frente a gluten y pMJA186 (Madrid et al., 2018) scFv frente a nuez. Las bandas resaltadas se cortaron y analizaron mediante desorción láser asistida por matriz/espectrometría de masas en tándem de ionización (MALDI-TOF/TOF).

También, en el análisis de *dot blot* (Figura IV.4.5) se determinó que el clon 1 que presentaba mayor reconocimiento por el pistacho y mostraba buena producción. En consecuencia, el clon 1 fue seleccionado para su posterior cotransformación con el plásmido pMJA180, que contiene la secuencia de la enzima biotín ligasa, con el fin de poder biotinilar y multimerizar los dAbs.

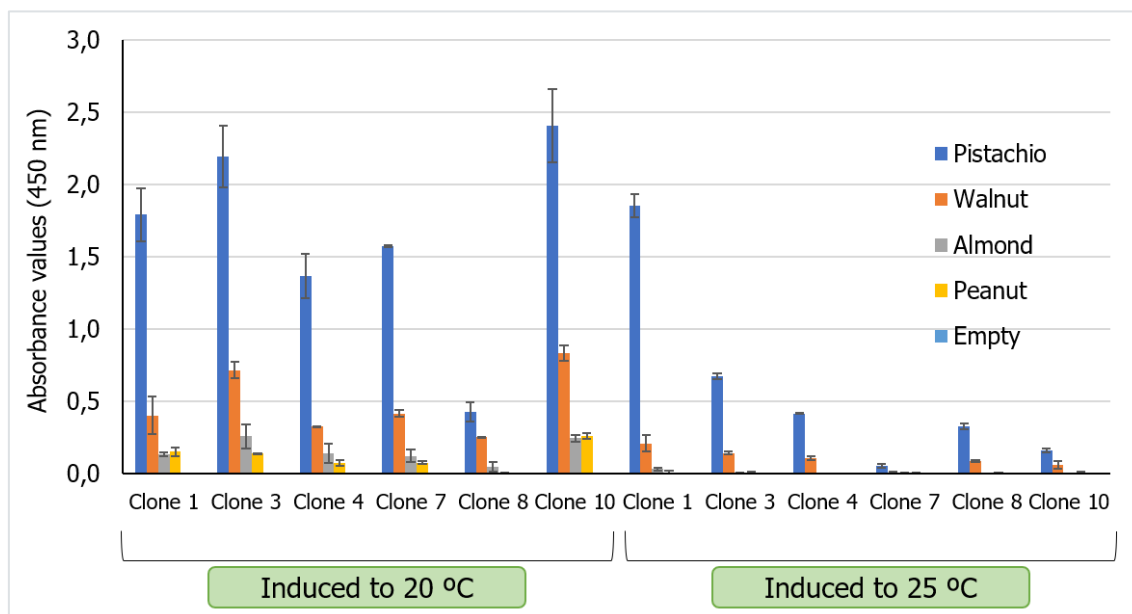


Figura IV.4.7. Resultados de ELISA indirecto obtenidos con el sobrenadante inducido de los clones transformados con PVF4m5 o pRAS002 en *Pichia pastoris*. Los valores de absorbancia son la media de duplicados obtenidos en un mismo experimento. Las barras de error muestran la desviación estándar para cada grupo de datos.

De la cotransformación del clon 1 (pRAS002m o PVF4m5) con el plásmido pMJA180 se obtuvieron multitud de clones, de los cuales se seleccionaron solo 10, pero todos, además

de conservar la secuencia del dAb, incluían la secuencia de la BirA, según se demostró mediante PCR de los clones con los pares de cebadores MJA254-MJA253 (que amplifica el dAb) y MJA255-MJA256 (que amplifica la BirA) (Figura IV.4.8). En la electroforesis se comprobó como el clon pRAS002m o PVF4m5, no cotransformado, presentaba una banda del tamaño correspondiente a la secuencia del dAb (486 pb), pero no las bandas de ~900 pb correspondientes a BirA.

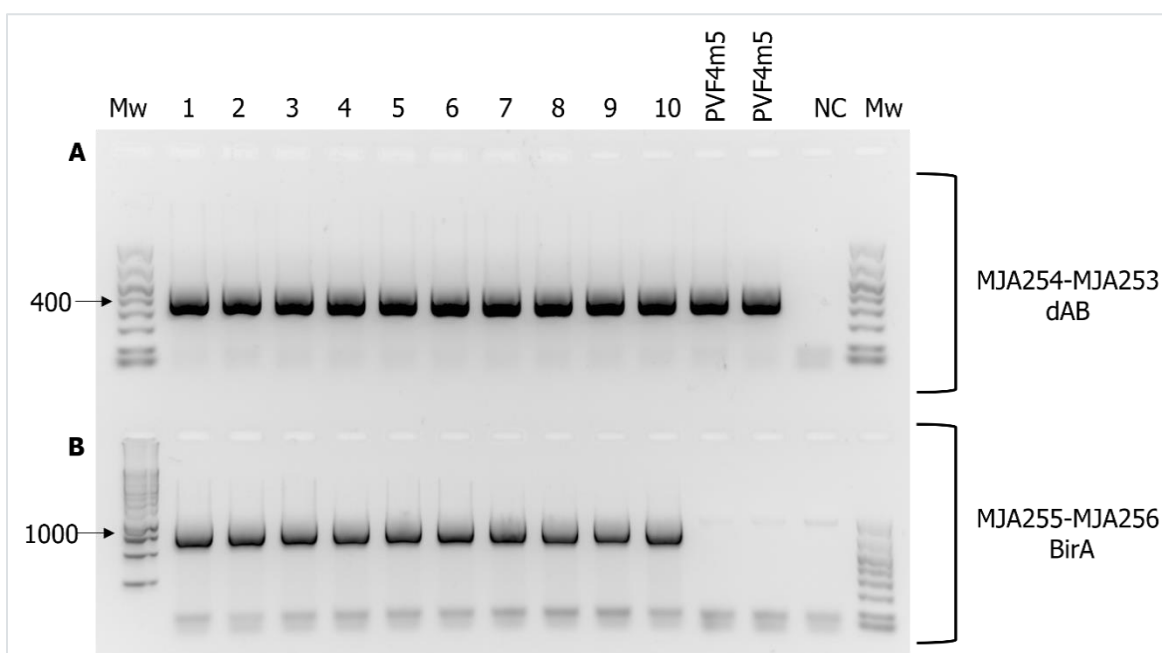


Figura IV.4.8. Análisis electroforético de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) obtenidos de las colonias (de 1 a 10) de *Pichia pastoris* pRAS002m cotransformado con el vector pMJA180, usando los primers MJA254-MJA253 (A) y MJA256-MJA255 (B). NC=PCR negative control, PVF4m5=clon no transformado con BirA; Mw=molecular weight Biomarker Low Bioventures (A) y 1Kb Ladder (B).

Para poder elegir al mejor clon productor del anticuerpo recombinante biotinilado a una temperatura de 25 °C, se realizó un *dot blot* con los sobrenadantes de los clones cotransformados inducidos por metanol, y se compararon con los clones sin inducir y con diferentes anticuerpos de reconocimiento: anti-c-Myc-AP, anti-His-HRP y ExtrAvidina-HRP (que confirma sin el anticuerpo se encuentra biotinilado o no). En la Figura IV.4.9 se muestran las grandes diferencias observadas entre los clones inducidos y sin inducir en los casos A y B, siendo poco apreciables las diferencias en el caso C. De todos ellos, se seleccionó el clon 5 y pasó a denominarse PVF4m5.BirA.

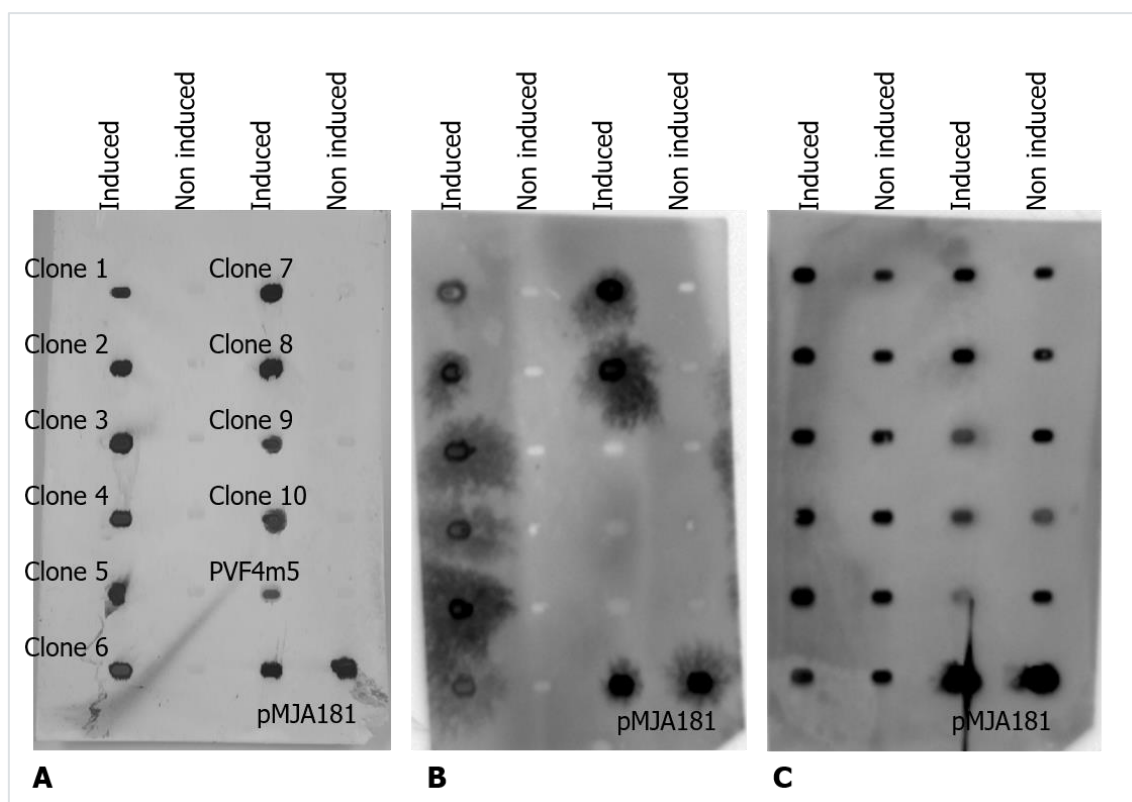


Figura IV.4.9. Análisis dot blot de los sobrenadantes de cultivo de diferentes clones de *Pichia pastoris* cotransformados con pMJA180 y revelados con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Myc AP (A), con un anticuerpo anti-His-HRP (B) y con ExtrAvidina-HRP (C), mostrándose las diferencias entre los inducidos y sin inducir con metanol. Control positivo: pMJA181 (de la Cruz *et al.*, 2016) scFv frente a almendra.

Por último, el clon PVF4m5.BirA fue inducido en un volumen de 500 mL de cultivo BMMY para producir el dAb biotinilado, que se purificó del sobrenadante a través de una columna Ni-NTA con gradiente de imidazol (Figura IV.4.10). Se purificó el dAb biotinilado a partir de 125 mL de sobrenadante y el pico obtenido a la concentración de 78 % de imidazol, alcanzó una absorbancia de 2500 mAu. El pico se recogió en dos fracciones (1 y 2) cuantificándose en el Nanodrop 7 mg mL⁻¹ en 3 mL, por lo que se obtuvieron 21 mg de proteína en solo 125 mL.

Con el fin de identificar las proteínas presentes en las fracciones 1 y 2 del único pico obtenido en la Figura IV.4.10, se realizó una electroforesis SDS-PAGE con 10 µL (20 µg de proteína) de cada fracción bajo condiciones reductoras (Figura IV.4.11A). Las bandas más prominentes que se observaron presentaban un tamaño de ~20 kDa a ~35 kDa. El patrón fue similar al descrito en (Madrid *et al.*, 2020).

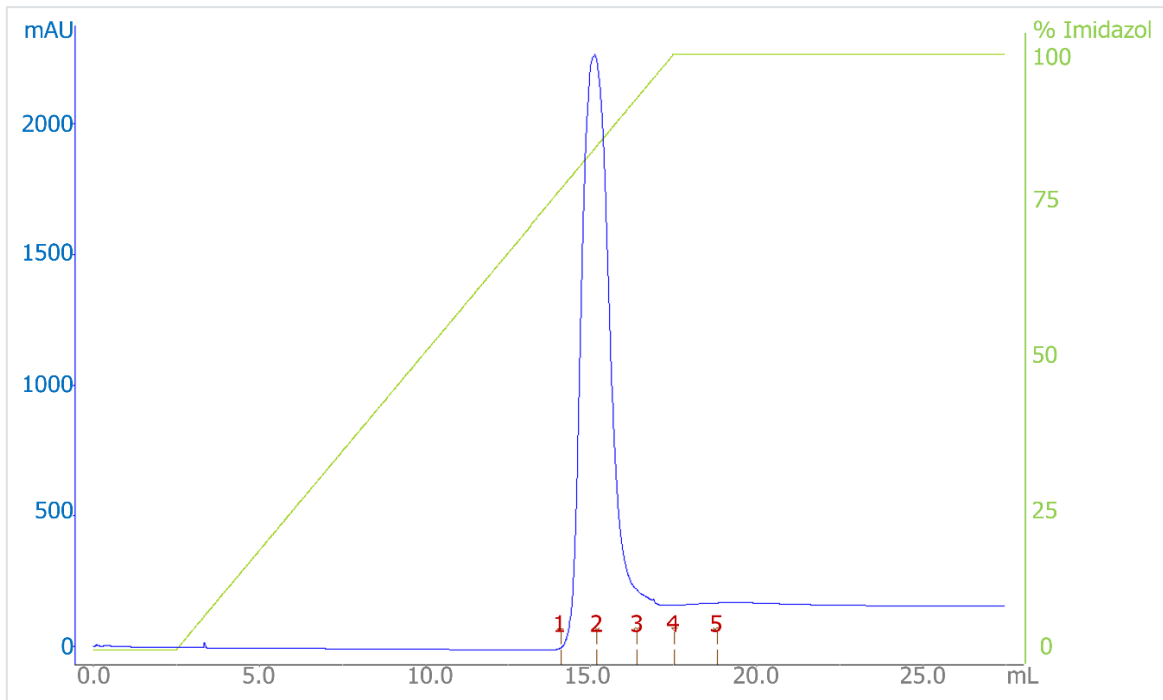


Figura IV.4.10. Perfil de elución del sobrenadante de PVF4m5.BirA obtenido en el FPLC a partir de columna Ni-NTA, mostrando los valores de absorbancia a 280 nm de las fracciones 1 y 2.

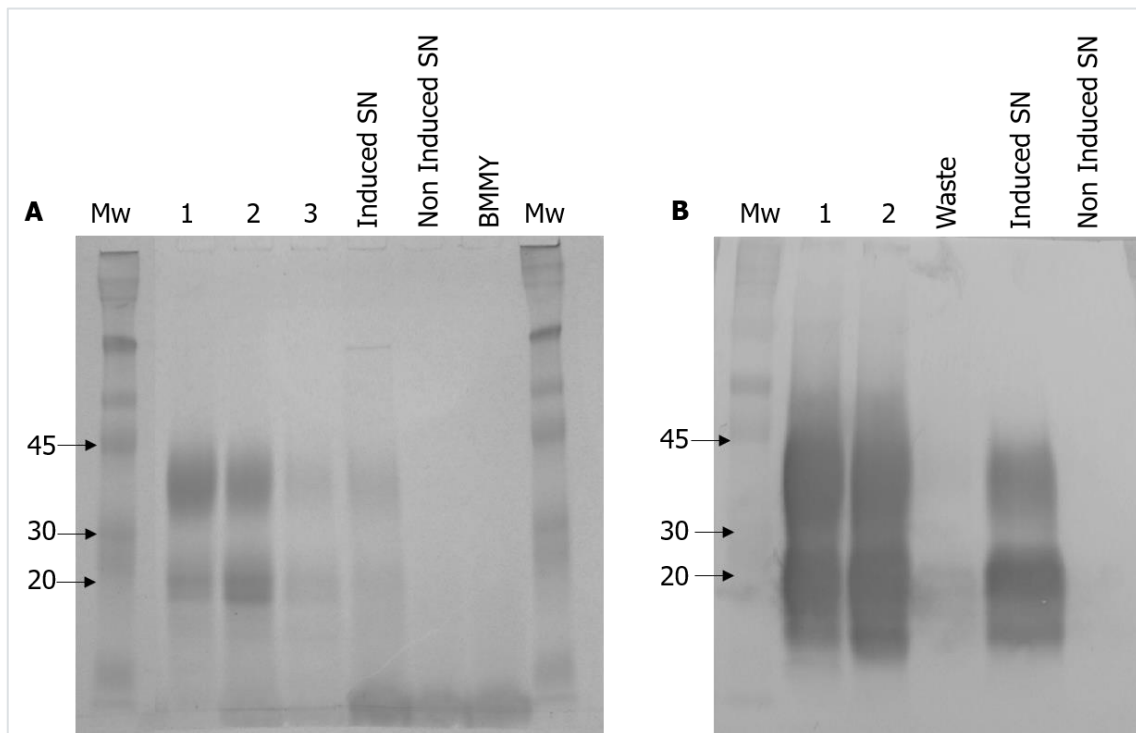


Figura IV.4.11. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS en condiciones reductoras de diferentes fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad Ni-NTA (A) e inmunoblot con anti-c-Myc-AP (B) de 20 μ g de cada fracción o 10 μ L de cada muestra. Mw: ColorBurst™ Electrophoresis Protein Marker; 1, 2 y 3, son las fracciones obtenidas de la cromatografía; BMMY: medio de cultivo; Waste: desecho, muestra que no se ha unido a la columna de afinidad. dAb PVF4m5.BirA en el inmunoblot fue detectado por el anticuerpo anti-c-Myc conjugado con AP.

Una vez verificada la presencia del dAb específico del pistacho (Figura IV.4.11B), se procedió a multimerizar con ExtrAvidina-HRP para usar el anticuerpo recombinante en un análisis de ELISA directo. Sin embargo, el dAb multimerizado no reconoció al pistacho. Se probaron varias opciones de ELISA, pero no se consiguió visualizar una reacción antígeno-anticuerpo.

Capítulo V

DISCUSIÓN INTEGRADORA

V.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES ESPECÍFICOS FRENTE A NUEZ (*JUGLANS REGIA*) MEDIANTE LA TÉCNICA DE PRESENTACIÓN EN FAGOS (*PHAGE DISPLAY*) A PARTIR DE GENOTECAS DE FAGO-ANTICUERPOS RECOMBINANTES TIPO scFv

Las técnicas inmunológicas disponibles para la detección de alérgenos en alimentos emplean anticuerpos policlonales o monoclonales, obtenidos mediante la inmunización de animales con extractos de proteínas solubles totales o proteínas purificadas, alergénicas o no, de la especie de interés. Actualmente existen en el mercado una amplia variedad de genotecas de fagos recombinantes que expresan desde una secuencia aleatoria de oligopéptidos hasta fragmentos de anticuerpos de diferente naturaleza. En este último grupo se encuentran los fragmentos Fab (*fragment antigen-binding*) que incluyen las regiones variables y la primera región constante de las inmunoglobulinas, los fragmentos variables de las cadenas ligera y pesada unidos por un péptido conector (scFv, *single-chain variable fragment*), o solo regiones variables de las cadenas pesadas de los anticuerpos (dAb, *single-domain antibody*).

La tecnología de presentación en fagos (*phage display*) es una herramienta poderosa y eficaz para producir anticuerpos recombinantes sin inmunización animal (Lee *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2012). Mediante esta tecnología y partiendo de la genoteca de scFv Tomlinson I+J, los clones específicos frente a nuez se seleccionaron por afinidad a través de un proceso denominado "*biopanning*". Debido a que los fagos seleccionados se pueden amplificar por propagación en *E. coli*, es posible realizar múltiples rondas de *biopanning* con el objetivo de reducir la selección a sólo aquellos clones que tengan una unión más específica con la molécula diana (Parmley y Smith, 1988). Esta genoteca está basada en un único patrón humano para V_H (V3-23 / DP-47 y JH4b) y V_K (O12 / O2 / DPK9 y Jk1), con cambios incorporados en las posiciones correspondientes a las regiones hipervariables determinantes del reconocimiento del antígeno (CDRs). La CDR3 de la cadena pesada se diseñó para que fuera lo más corta posible y aun así pudiera formar una superficie de unión a antígeno. La genoteca Tomlinson I tiene una diversidad de $1,47 \times 10^8$ variantes y está construida en el plásmido pIT2 (HIS myc tag). Este fagémido contiene el origen de replicación y la señal de empaquetamiento del fago, pero requiere del fago ayudante M13KO7 (*helper phage*) para que le proporcione las proteínas de empaquetamiento y le confiera resistencia a Kanamicina, de forma que la coinfección le otorgue la posibilidad de convertirse en fago filamentoso, con una longitud de las partículas fágicas variable según

la longitud de su ADN. La coinfección fagémido-fago da lugar a viriones híbridos que exhiben pocas copias de la proteína de fusión y que contienen el genoma del fagémido. Fagos y fagémidos son los vectores más frecuentemente usados en la tecnología de *phage display*. Los fagémidos se utilizan en mayor medida que los fagos, debido a que los genomas de fagémidos son más pequeños y pueden incorporar fragmentos largos de ADN exógeno, y en segundo lugar, son más eficientes en la transformación y permiten obtener una genoteca de fagos con una alta diversidad y muchos sitios de restricción de endonucleasas, necesarios para la recombinación de ADN y la manipulación genética (Qi *et al.*, 2012). El fagémido posee la ventaja de expresar en la superficie del fago la proteína exógena mediante fusión a la proteína pIII (Figura I.12). Esta proteína se dirige a la membrana interna antes del ensamblaje de los fagos, debido a que posee una secuencia señal (PelB) localizada en el extremo N-terminal. Es la proteína de la cápside de virus más empleada, debido a que tolera inserciones de mayor tamaño, que deben insertarse entre el péptido señal y el extremo N-terminal de la proteína pIII (Georgieva y Konthur, 2011; Lee *et al.*, 2007). En este trabajo, en la superficie de un fago se expresa un scFv unido a dos epítomos diferentes, c-Myc y 6xHis.

V.1.1. Enriquecimiento de la genoteca Tomlinson I en clones de fago-scFv específicos de nuez

En el proceso de *biopanning* se aislaron clones específicos de nuez a través de tres rondas de selección, utilizando como ligando un extracto de proteína total de nuez cruda y pelada, inmovilizado en un soporte sólido. La eliminación de la piel se debe a su alto contenido en taninos y polifenoles, que se unen y precipitan proteínas y que pueden dificultar el proceso de unión del ligando con el repertorio de fago-scFvs (Sze-Tao y Sathe, 2000). Para asegurar el éxito del *biopanning*, es muy importante que en la primera ronda de selección se disponga de la mayor variedad de clones posibles, partiendo de $1,47 \times 10^8$ variantes y disponiendo de, al menos, un clon de cada variante. Se debe amplificar la genoteca hasta 10^{12} - 10^{13} viriones por mL para empezar el proceso. Los fagos en solución se presentan al antígeno para que se produzca la unión antígeno-fago-anticuerpo. Aquellos viriones que tras la exposición no han tenido afinidad con el antígeno se retiran mediante lavado y los que permanecen unidos se eluyen mediante una digestión con tripsina. Esos fagos eluidos se amplifican de nuevo para obtener nuevos viriones que se emplearán en la siguiente ronda de selección. Hay que tener en cuenta que entre los fagos eluidos pueden encontrarse algunos con uniones inespecíficas o que reconozcan a otras proteínas no diana pero estrechamente relacionadas. Para evitar la inespecificidad, se

realiza un *biopanning* negativo o hibridación sustractiva al comienzo de la estrategia, empleando como ligando las proteínas no diana que pueden interferir en la selección. En este caso, se trata de un extracto de pacana inmovilizado en el soporte. Con el fin de minimizar la selección de variantes de fagos inespecíficas que reconozcan otros componentes presentes en el sistema del soporte, las rondas de selección se llevaron a cabo en diferentes soportes sólidos, alternando las paletas de poliestireno con esferas magnéticas (Dynabeads) que poseen grupos p-toluenosulfonilo, permitiendo la unión covalente de los grupos amino de las proteínas mediante una reacción de sustitución nucleófila (Bakhshinejad *et al.*, 2016).

Finalizado el proceso de *biopanning*, se comparó el número de fagos eluidos en cada ronda con el obtenido en la etapa anterior de *biopanning*. El número de partículas de fago recuperadas después del primer *biopanning* fue de 7×10^5 pfu mL⁻¹, siendo de $1,75 \times 10^6$ pfu mL⁻¹ después de la segunda ronda y de 10^6 pfu mL⁻¹ después de la tercera ronda de selección. En comparación con los resultados descritos por Lee *et al* (2007), el aumento en cada ronda debe ser de 100 veces. Sin embargo, entre la primera y la segunda ronda de selección los fagos eluidos aumentaron solo 2,5 veces, y entre la segunda y tercera ronda de selección el título no aumentó más. Estos resultados pueden indicar que la metodología de hibridación sustractiva descarta gran parte de los fagos reactivos de la nuez, seleccionando los más específicos. Para confirmar esta hipótesis, se realizó un ELISA policlonal enfrentando el conjunto de los fagos eluidos de cada ronda de selección a los antígenos de nuez, pacana y cacahuete. Los resultados mostraron que los valores más altos de absorbancia para las proteínas de nuez correspondían a la segunda y tercera rondas de *biopanning*, y se encontró una reactividad cruzada muy baja frente a seroalbúmina bovina (BSA), pacana y cacahuete (Figura 3 del Anexo I). En definitiva, de acuerdo con estos resultados, la segunda ronda de *biopanning* permitió la selección de la población de fagos que reconocía específicamente a la nuez y no fueron necesarias rondas adicionales.

V.1.2. Selección de clones de fago-scFv individuales mediante ELISA monoclonal

Los fagos que se aislaron de las rondas de selección segunda y la tercera se emplearon para el aislamiento de 95 colonias de *E. coli* TG1 para llevar a cabo un ELISA de fagos monoclonales. Como criterios de selección, se consideraron positivos aquellos clones en los que los valores de absorbancia frente nuez fueran al menos 5 veces superiores a los valores la absorbancia frente al extracto de cacahuete (utilizado como control negativo).

Un total de 8 de las 95 colonias aisladas de la segunda ronda (8,4 %) y 3 de los 95 (3 %) de la tercera ronda, se consideraron como clones positivos para nuez.

Tras la selección inicial, los fagos-scFv producidos por los 11 clones seleccionados se precipitaron con PEG/NaCl y se sometieron de nuevo a un ELISA monoclonal para observar la estabilidad de los resultados. Finalmente, se seleccionaron 6 clones que permanecían constantes en la producción de anticuerpos frente a nuez para un análisis posterior mediante PCR y secuenciación.

V.1.3. Secuenciación y caracterización de los clones seleccionados

Los cebadores LMB3 y PHEN se utilizaron para comprobar mediante la amplificación por PCR, el tamaño del inserto que codifica el scFv de los 6 clones seleccionados. En los clones que contienen el inserto V_H-V_L completo se amplifica un producto de un tamaño aproximado de 935 pb. Sin embargo, únicamente un clon de los 6 analizados, denominado JR35, mostró una banda con el tamaño esperado. Su posterior análisis por secuenciación determinó el marco de lectura de la inmunoglobulina, el péptido de unión (GGGS x4) y las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las cadenas V_H y V_L del scFv, permitiendo deducir la secuencia aminoácidica final. Los 5 clones restantes fueron descartados, debido a que sus secuencias nucleotídicas no eran completas, conteniendo sólo la cadena V_H o V_L, o presentando doble lectura en la secuenciación. Es frecuente la aparición de clones incompletos de este tipo, porque aunque las cadenas pesadas y ligeras suelen ir emparejadas en el sistema inmunológico humano, las V_H y V_L pueden existir en algunas circunstancias de forma aislada, manteniendo su capacidad de reconocer a los antígenos (de la Cruz *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2007). En las genotecas de fragmentos de anticuerpos, esto puede ser debido a los eventos de recombinación *in vivo* que se han utilizado para mejorar su diversidad partiendo de dos vectores separados que codifican los dominios V_H y V_L, respectivamente (Miersch y Sidhu, 2012). A su vez, en una genoteca pueden observarse clones no funcionales, secuencias incompletas y la generación de fragmentos de anticuerpos mal plegados que pueden dar lugar a aglutinantes no específicos. Con el objetivo de minimizar estos inconvenientes que afectan negativamente a las genotecas, se han desarrollado técnicas de síntesis para generar diversidad aleatoria controlada en las regiones determinantes de complementariedad (CDRs), incorporando nucleótidos en diferentes posiciones y utilizando varios enfoques (Acevedo-Rocha *et al.*, 2015; Geyer *et al.*, 2012). En el caso de la genoteca Tomlinson I, se utilizó la degeneración DVT para introducir diversidad en la CDR (normalmente en la CDR3), que se rige por una fórmula específica para la incorporación de las bases (D es 33 % de G, A o T, y V es 33 % de G, A o C). Esta

fórmula produce múltiples combinaciones de codones degenerados que aumentan la diversidad del gen, y los anticuerpos generados presentan mayor afinidad y especificidad en estas genotecas (Ch'ng *et al.*, 2016; Geyer *et al.*, 2012). Este método mejora la calidad de la genoteca limitando la presencia de polipéptidos incompletos, pero no los elimina.

V.1.4. Producción de scFv biotinilados mediante transformación en *Pichia pastoris*

La producción de scFvs solubles en las condiciones reductoras del citoplasma de *E. coli* es ineficiente debido a la dificultad de formarse los enlaces disulfuro y permitir el plegamiento correcto de las proteínas eucariotas. Por lo tanto, los scFvs se segregan en el periplasma como proteínas solubles o se expresan en el citoplasma como cuerpos de inclusión insolubles, lo que dificulta la obtención de los anticuerpos (Vakz y Benhar, 2014). Tras la obtención del fago-anticuerpo, se quiso emplear la forma soluble del scFv para poder utilizarlo en diferentes técnicas inmunoquímicas. Gracias a la sencillez de las técnicas necesarias para la manipulación genética de *Pichia pastoris* y su capacidad de realizar modificaciones postraduccionales eucarióticas, este organismo es ampliamente utilizado como un sistema de expresión que mejora la producción de proteínas recombinantes y heterólogas, ya sea intra o extracelularmente, con respecto a otros sistemas de producción (Damasceno *et al.*, 2012). Para que se produzca la secreción de proteínas es necesario emplear una secuencia señal que la dirija hacia la ruta secretora. Una de las secuencias señal que ha sido empleada con mayor frecuencia es el péptido señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*. La expresión de cualquier gen heterólogo en *Pichia pastoris* requiere la inserción del gen en un vector de transformación que permita la integración por recombinación homóloga de ese gen en el genoma de *Pichia pastoris* (Cregg *et al.*, 2000). Debido a que *Pichia pastoris* no posee plásmidos nativos, se han desarrollado varios vectores de expresión diseñados para transformar tanto a *E. coli* como a *Pichia pastoris*, disponibles en <http://www.invitrogen.com>. Para la expresión de los genes heterólogos, los vectores contienen un cassette de expresión compuesto por una región de DNA de aproximadamente 0,9 Kb que contiene la secuencia 5' (promotor) del gen AOX1 (AOX1p) y un fragmento de aproximadamente 0,3 Kb que contiene la secuencia 3' del gen (terminador de la transcripción) (Koutz *et al.*, 1989). Los fragmentos del promotor y terminador están separados por uno o más sitios únicos de clonación. Además, se ha desarrollado toda una familia de vectores para *Pichia pastoris* que contienen el gen *Sh ble*, el cual confiere resistencia a la zeocina (Higgins *et al.*, 1998) además de pertenecer al tipo de mutantes Mut⁺ que conserva el gen AOX1 genómico intacto y, por lo tanto, emplean el metanol como

fuerza de carbono y como medio de inducción de las proteínas. La expresión de genes dentro de la ruta del metanol (AOX1) está reprimida por la glucosa, el glicerol y el etanol, pero se induce fuertemente por el metanol, aumentando la concentración de la proteína soluble en el medio de cultivo con alta densidad celular (Cregg *et al.*, 2000; Demain y Vaishnav, 2009). Una de las ventajas del uso de *Pichia pastoris* para la producción de proteínas exógenas es que la proteína heteróloga secretada constituye la gran mayoría de la proteína total en el medio y, a su vez, la secreción sirve como una primera etapa para la purificación, ya que evita tener que separar *a posteriori* la proteína heteróloga del conjunto de proteínas celulares. (Cregg *et al.*, 2000).

En esta Tesis Doctoral, la metodología propuesta consistió en fusionar un dominio aceptor de biotina (*biotin acceptor domain*, BAD) al scFv, para añadir una molécula de biotina en un proceso de biotilación *in vivo* y, posteriormente, formar multímeros empleando un núcleo de avidina conjugada con peroxidasa (ExtrAvidina-HRP). Este hecho permitiría unir al núcleo de avidina 4 moléculas de anticuerpo biotilado que reconocerían a su vez 4 epítomos del antígeno, incrementando proporcionalmente la señal, mejorando la sensibilidad y avidéz (Barat y Wu, 2007; Cloutier *et al.*, 2000). Aunque existen técnicas que permiten la biotilación aleatoria de la proteína, estas presentan el inconveniente de que la biotina se puede incorporar en un lugar donde inactive residuos aminoacídicos críticos para el reconocimiento del epítomo (Kumada, 2014). Para permitir la biotilación de los fragmentos scFv solubles, se insertó la secuencia del BAD en el extremo C-terminal del scFv en el vector de expresión pPICZaB, entre la secuencia nucleotídica correspondiente al scFv JR35 y la secuencia del epítomo c-myc, originando el plásmido de expresión pMJA186 (Figura IV.1.1), que se propagó en la cepa de *E. coli* Dh5a. Tras comprobar la correcta orientación del inserto y el mantenimiento del marco de lectura, el plásmido se linearizó y se insertó en el genoma de la cepa de *Pichia pastoris* X-33, para proceder a la expresión de los fragmentos solubles. Además de la secuencia BAD, el scFv expresado por los clones de *Pichia pastoris* contenía un epítomo c-myc (EQKLISEEDL) y una cola de poli-histidina que permiten su purificación y detección. La producción de los fragmentos scFv específicos solubles por 95 clones transformados de *Pichia pastoris*, se confirmó por *dot blot* de los sobrenadantes tras la inducción con metanol. Esta técnica de selección de *dot blot* para la selección de clones es muy útil para asegurar que los clones han sido transformados con éxito y que expresan la proteína de interés (Neophytou y Alcocer, 2017). Uno de los clones con mayor expresión de la proteína de interés (denominado pMJA186-G2) se seleccionó con el fin de biotilar *in vivo* los fragmentos solubles de anticuerpo. Para ello, se construyó un segundo plásmido (pMJA180) que contenía la secuencia nucleotídica codificante de la

enzima biotín ligasa (BirA) en el vector comercial pPIC6a y se cotransformó en el clon pMJA186-G2. Esta enzima cataliza la unión covalente de una molécula de biotina al aminoácido lisina (K) del BAD, en una reacción de dos etapas. Para mejorar la transformación y selección, se utilizaron plásmidos con resistencia a los antibióticos disponibles para *Pichia pastoris*: el gen *Sh ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* (resistencia a zeocina) (Drocourt *et al.*, 1990) y el gen de la blasticidina S-desaminasa de *Aspergillus terreus* (resistencia a la blasticidina) (Kimura *et al.*, 1994). La concentración de blasticidina se incrementó hasta 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para asegurar la selección de clones cotransformados. El ADN del clon cotransformado llamado JrBSF se analizó para demostrar la presencia o ausencia de las secuencias scFv y BirA. Mediante PCR con los cebadores MJA254 y MJA259, se confirmó que el clon JrBSF contenía un fragmento de 780 Kb que consiste en el scFv unido a la secuencia de nucleótidos BAD (Figura IV.1.2) codificado por el plásmido pMJA186. Además, mediante PCR con los cebadores MJA255 y MJA256 se demostró la presencia de una banda de aproximadamente 975 Kb, correspondiente a la secuencia de nucleótidos de la BirA codificada por el plásmido pMJA180, confirmando la cotransformación con los dos vectores en el clon JrBSF. Por el contrario, el clon pMJA186-G2 solo produjo la banda de 780 Kb, correspondiente al vector pMJA186, que contiene el scFv y el BAD (Figura IV.1.2).

Con la finalidad de seleccionar entre los clones de *Pichia pastoris* cotransformados el mejor productor de scFv biotinilado, se realizó la inducción de los clones a pequeña escala (en un volumen de 1 mL). Para optimizar la producción de scFv biotinilado, el clon JrBSF se cultivó en medios tamponados (BMGY y BMMY), ya que los valores de pH de los medios de inducción más apropiados para la producción de scFv son de 6,5-8,0 (Shi *et al.*, 2003). La enzima BirA, también producida por el clon JrBSF, catalizaría la unión de una molécula de biotina al péptido aceptor (BAD) unido al scFv, dando como resultado una producción directa de scFv biotinilado *in vivo*.

Tras la inducción con metanol de los clones cotransformados con el plásmido JrBSF, los sobrenadantes obtenidos se analizaron mediante *dot blot* (Figura IV.1.3) para comprobar la correcta expresión de los fragmentos solubles. La membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) se recubrió con sobrenadantes de cultivo de clones pMJA186-G2 y JrBSF antes y después de la inducción con metanol. Como el plásmido de expresión añade al scFv el epítipo c-Myc, fue sencillo determinar aquellos clones de mayor producción, incubando la membrana con un anticuerpo anti-c-Myc conjugado con fosfatasa alcalina. Así, al revelarse la membrana con sustrato cromogénico AP (Figura IV.1.3A), se detectó

scFv en el sobrenadante de ambos cultivos (pMJA186G2 y JrBSF) inducidos por metanol. Sin embargo, en la membrana que contiene los mismos sobrenadantes, pero que se reveló con ExtrAvidina-HRP (Figura IV.1.3B), se demostró que solo el clon cotransformado de *Pichia pastoris* (JrBSF) era capaz de producir scFv biotinilado. Estos resultados confirman que este clon (JrBSF) fue efectivo en la coexpresión de genes exógenos y en la producción de la enzima BirA funcional. A diferencia de los métodos de biotinilación *in vitro* (Li y Sousa, 2012), que requieren la producción y purificación previa de enzimas, en este trabajo la biotinilación se realizó *in vivo*. Esta tecnología de biotinilación *in vivo* se puede aplicar para la purificación de proteínas, el análisis de la localización de proteínas y la interacción proteína-proteína principalmente en levaduras (de la Cruz *et al.*, 2016; Neophytou y Alcocer, 2017).

La expresión de proteínas heterólogas en *Pichia pastoris* está muy condicionada por su estabilidad. Cuando los scFv no son estables, no se expresan adecuadamente, acumulándose en el interior de la célula y desencadenando una serie de efectos que dificultan su secreción al medio. Entre estos efectos se observa un incremento en los niveles de transcripción de genes responsables de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR, *unfolded protein response*), que se asocian a un aumento de plegamiento del retículo endoplásmico en condiciones de estrés y a la degradación de proteínas incompletas o con plegamiento defectuoso (Whyteside *et al.*, 2011). Por lo tanto, los resultados obtenidos anteriormente mediante *dot blot* confirman que el scFv JrBSF seleccionado es lo bastante estable como para ser expresado y secretado por *Pichia pastoris*.

V.1.5. Producción y caracterización del scFv multimerizado

Una vez seleccionado el clon JrBSF, se utilizó para producir fragmentos de scFv biotinilados a mayor escala (600 mL de medio de cultivo). El sobrenadante obtenido tras la inducción del clon durante 72 h con metanol se purificó mediante una columna de cromatografía de afinidad (proteína L HiTrap). Esta columna contiene una matriz de agarosa unida a la proteína L, que presenta afinidad hacia la región variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulinas y fragmentos de inmunoglobulina (Lee *et al.*, 2007; Ma y O’Kennedy, 2015). El proceso de purificación produjo 6 mL de scFv biotinilado (2 mg mL^{-1}), proporcionando 12 mg de proteína, que se distribuyeron en alícuotas de 100 μL y se mantuvieron congeladas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Esta gran capacidad de *Pichia pastoris* para producir cantidades considerables de proteína por litro de cultivo, llegando en algunas ocasiones al orden de gramos, puede variar en función de las características estructurales de la proteína y de las condiciones de cultivo (Shi *et al.*, 2003).

Con el objetivo de aumentar la valencia de los scFv biotinilados para unirse al antígeno y así aumentar la sensibilidad de los ensayos para la detección de nuez, se procedió a la formación de multímeros mediante la adición de un núcleo de avidina conjugada con peroxidasa de rábano (ExtrAvidina-HRP, Horseradish peroxidase) siguiendo el procedimiento descrito por el del NIH *Tetramer Core Facility*. La avidina es una proteína tetramérica que se une con gran afinidad y de forma no covalente a una molécula de biotina ($K_d = 4 \times 10^{-14}$ M). Debido a esta propiedad, la avidina y la estreptavidina se han utilizado ampliamente como sondas y matrices de afinidad para una amplia variedad de aplicaciones en ensayos bioquímicos, diagnósticos, purificación mediante afinidad y administración de medicamentos. En los últimos años ha habido un interés creciente en explorar esta interacción no covalente en sistemas de administración a nanoescala de agentes terapéuticos, incluyendo pequeñas moléculas, proteínas, vacunas, anticuerpos monoclonales y ácidos nucleicos (Jain y Cheng, 2017; Kipriyanov *et al.*, 1995). La multimerización de scFvs biotinilados se ha utilizado para aumentar la afinidad por el antígeno, mejorando así la avidéz y la señalización en ensayos inmunoenzimáticos (Barat y Wu, 2007; Cloutier *et al.*, 2000; de la Cruz *et al.*, 2016). El empleo de la avidina/estreptavidina marcada con diferentes moléculas, como por ejemplo fluoróforos o enzimas, permite acortar el tiempo de los ensayos al no requerir de anticuerpos secundarios, y permitiría emplear los scFv biotinilados en cualquier técnica inmunoquímica para la detección de alérgenos en alimentos.

Para demostrar la multimerización del scFv, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones no reductoras de scFv monomérico y multimérico (Figura IV.1.4). El análisis electroforético del scFv multimérico mostró una banda con un peso molecular de aproximadamente 220 kDa que no estaba presente en el scFv monomérico, y podría corresponder con el tamaño esperado de los tetrameros (≈ 230 kDa). Para confirmar esta hipótesis, se escindió la banda y se tripsinizó para identificarla mediante espectrometría de masas en tándem de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF/TOF). La comparación con la base de datos de proteínas mostró que la banda contenía una mezcla de péptidos identificados como peroxidasa de *Armoracia rusticana*, cadena pesada de inmunoglobulina de *Homo sapiens* y una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina humana que compartía la misma CDR2 que el scFv JrBSF (Tabla IV.1.3). Este resultado es consistente con la presencia del scFv JrBSF multimerizado. Además, cuando los resultados de la espectrometría de masas se compararon con la secuencia de aminoácidos del JrBSF, la cobertura fue del 34 %.

Se realizaron experimentos de velocidad de sedimentación para estudiar el grado de multimerización alcanzado. Los análisis de ultracentrifugación mostraron diferencias entre el coeficiente de sedimentación (S) del scFv biotinilado monomérico y el scFv multimerizado con ExtrAvidina-HRP (Figura IV.1.6). Aunque se podrían unir hasta 4 moléculas de biotina a un núcleo de ExtrAvidina, los resultados obtenidos solo respaldaron que la mayoría de las moléculas de ExtrAvidina unían 2 scFv biotinilados. Una hipótesis que explica esta multimerización menor de lo esperable es que la conjugación de la ExtrAvidina con peroxidasa ocultaría los sitios de unión de biotina en la molécula de avidina, lo que dificultaría la producción de tetrámeros completos. Este hecho también fue observado por de la Cruz *et al.*, 2016.

V.1.6. Identificación y caracterización, mediante técnicas cromatográficas, electroforéticas, espectroscópicas e inmunoquímicas, de las proteínas de nuez reconocidas por el scFv seleccionado

Debido a que el fago-scFv JR35 se seleccionó frente a un extracto proteico de nuez, era conveniente identificar las dianas proteicas reconocidas específicamente por el fago-anticuerpo y su versión soluble y biotinilada JrBSF. Para caracterizar las proteínas específicas reconocidas por el scFv JrBSF, se realizó una electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE y *Western blot* del extracto de nuez. La electroforesis reveló la presencia de múltiples bandas de diferentes tamaños (aproximadamente 45 kDa, 30-35 kDa, 17 kDa y 15 kDa y 8 kDa). El análisis mediante *Western blot* demostró que la banda de proteína de nuez de aproximadamente 15 kDa fue detectada con mayor intensidad por el scFv (Figura IV.2.3A), cuando la membrana se reveló con los anticuerpos anti-c-Myc y anti-His tag (Figura IV.2.3B-C). También se observó una débil reactividad con otras bandas de mayor tamaño presentes en los extractos de nuez y pacana que corresponderían aproximadamente con 30-35 kDa y 45 kDa.

Para identificar las proteínas de la banda de aproximadamente 15 kDa reconocida por el anticuerpo, se cortó y se analizó en el servicio de proteómica de la Universidad Complutense de Madrid. Mediante MALDI-TOF/TOF se identificaron 19 péptidos de la globulina 11S de tipo 2 (Jug r 4) de *Juglans regia* (Número de acceso: XP_018818401.1) (Tabla IV.2.2) en la banda electroforética, con una cobertura del 31 % de la secuencia, especialmente en su segunda mitad, coincidiendo con la subunidad básica (Figura IV.2.4).

Las proteínas de almacenamiento de las semillas pueden representar hasta el 50 % de la totalidad de contenido de proteínas en la nuez. Las globulinas 11S y 7S y la albúmina 2S son las proteínas de almacenamiento capaces de provocar respuestas alérgicas en individuos sensibles. En particular, la globulina 11S o Jug r 4 está reconocida por la OMS/UIISI (Organización Mundial de la Salud/Unión Internacional de las Sociedades Inmunológicas) como uno de los alérgenos menores pero relevantes de la nuez, capaz de producir reacción alérgica en el 65 % de los pacientes sensibles (Teuber *et al.*, 2003). Esta proteína se encuentra dentro del grupo de las leguminas, funcionando como donante de nitrógeno para el crecimiento de las plántulas durante la germinación. Está codificada por varios genes, cuyos productos de expresión se procesan proteolíticamente durante la traducción, mediante la eliminación del péptido señal hidrofóbico, dando lugar a 2 polipéptidos denominados subunidad ácida (35-40 kDa en SDS-PAGE) y subunidad básica (20-30 kDa) (Shewry *et al.*, 2003; Wallowitz *et al.*, 2006). El alérgeno Jug r 4 o cupina es una proteína de alto peso molecular (aprox. 350 kDa) que consta de tres monómeros (cada uno con una subunidad ácida y otra básica) que forman un homotrímero, y que a su vez se une a otro homotrímero formando una estructura hexamérica (dímeros de trímeros ensamblados cara a cara) que presenta una estabilidad térmica intermedia (Robotham *et al.*, 2009; Shewry *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos por *Western blot* y MALDI-TOF/TOF apoyan la idea de que el clon JrBSF expresa un scFv capaz de reconocer epítomos conformacionales en la subunidad básica de la globulina 11S (Jug r 4). Se determina que es la subunidad básica porque el sitio de separación primario entre las subunidades básicas y ácidas es bastante conservado entre una amplia variedad de plantas (Car i 4, Cor a 9, Ana o 2, Ara h 3) y contiene un enlace péptidico Asn-Gly. Este enlace peptídico es parte de la secuencia aminoácidica NGLEET en Jug r 4, presente en la secuencia la Figura IV.1.4 y que determina la separación de ambas subunidades, ácida y básica (Wallowitz *et al.*, 2006). El reconocimiento de estos epítomos, mayoritariamente de la subunidad básica, se puede observar en el modelo tridimensional del trímero 11S obtenido a partir de la secuencia de los péptidos proporcionada en el análisis del servidor Mascot (Figura V.1.1) con la aplicación web SWISS-MODEL de expasy.org. Este mayor reconocimiento depende de la conservación de la estructura terciaria de la proteína en esa región, que se destruye durante la SDS-PAGE, pero también es posible que el scFv esté reconociendo epítomos concretos de esa proteína (zonas conservadas) o de otras proteínas. En este sentido, Robotham *et al.* (2009), observaron que la mayoría de los epítomos que más reconocimiento tenían por parte de las IgE de pacientes alérgicos se encuentran en el interior de la estructura coincidente con la

subunidad básica. Por consiguiente, se necesitaría de una desnaturalización de las subunidades para exponer al epítopo y se produzca el reconocimiento por parte de la IgE.

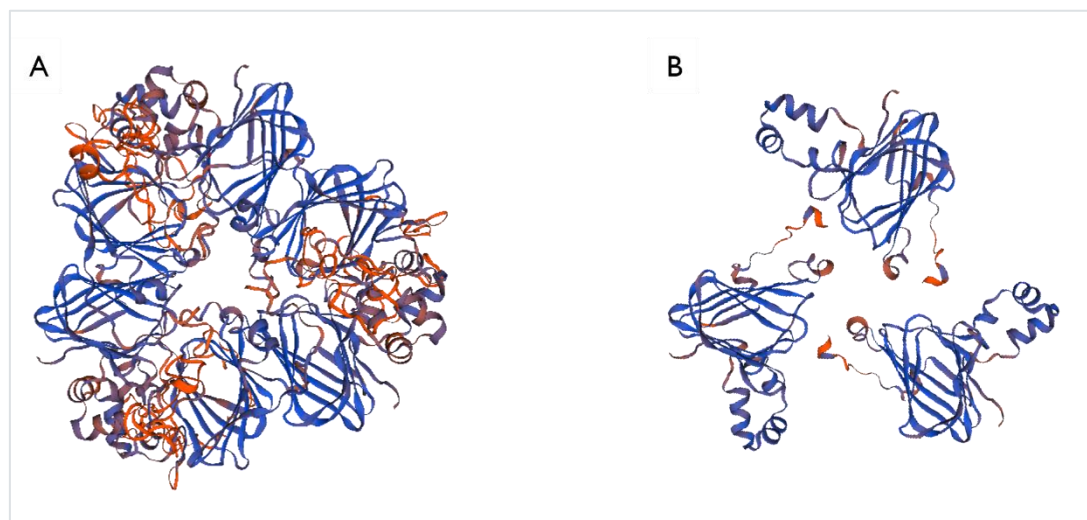


Figura V.1.1. Modelo simulado de una globulina 11S de nuez. A) Homotrímero de 11S de nuez, B) SWISS-MODEL de la subunidad básica reconocida por el scFv JrBSF.

V.1.7. Desarrollo de una técnica de ELISA directo para la detección de nuez utilizando un scFv específico frente a nuez multimerizado con ExtrAvidina-HRP

Una vez obtenido el scFv JrBSF y su multimerización con ExtrAvidina-HRP, los scFv multimerizados se emplearon como sondas de afinidad en un ELISA directo para comprobar si el fragmento de anticuerpo expresado por *Pichia pastoris* continuaba reconociendo a la proteína de nuez, y si se conseguía mejorar la sensibilidad con relación a la técnica de ELISA indirecto con fago-anticuerpos. El anticuerpo multimerizado se empleó en los ensayos a una concentración final de $2 \mu\text{L mL}^{-1}$. El análisis de muestras de nuez de diferentes orígenes geográficos (España y California) no influyó en los valores de absorbancia en el ELISA directo. El análisis de mezclas binarias de nuez en harina de trigo mediante ELISA directo empleando los scFv multimerizados con una molécula de ExtrAvidina-HRP permitió obtener las curvas estándar correspondientes tanto con la nuez cruda como horneada y compararlas con los resultados del ELISA indirecto con el fago-anticuerpo (Figura IV.1.7). El límite de detección (LOD) de nuez cruda en la mezcla binaria se calculó a partir de seis experimentos realizados por triplicado y en diferentes días. Siguiendo las directrices de la IUPAC, el límite de detección (LOD) se definió como la mínima concentración de proteína diana que mostrara un valor de absorbancia mayor que el valor medio de absorbancia del blanco más tres veces su desviación estándar, y se calculó interpolando dicho valor de absorbancia en

la curva estándar correspondiente. El LOD alcanzado por el ELISA directo usando los scFv multimerizados del clon JrBSF fue de 1616 mg Kg⁻¹. En comparación, el LOD del ELISA indirecto para la misma mezcla binaria utilizando el fago-scFv JR35, el LOD fue de 6378 mg Kg⁻¹, un 25,33 % menos sensible. El tratamiento térmico de horneado (160 °C durante 13 min) influyó ligeramente sobre la capacidad del ELISA directo para detectar las proteínas de nuez, elevando el LOD hasta 2466 mg Kg⁻¹. Por lo tanto, la tetramerización del scFv mejoró sustancialmente la sensibilidad del ensayo con relación al fago-anticuerpo. Además, el ELISA directo realizado con scFv multimérico es más rápido y requiere menos manipulación que el ELISA indirecto con fago-scFv. Hay que añadir que el horneado puede desnaturar parcialmente el epítipo reconocido por el scFv multimérico en la proteína de la nuez, elevando el LOD de 1616 a 2466 mg Kg⁻¹ (1,5 veces) en una matriz alimentaria. En general, las cupinas presentan una alta estabilidad térmica manteniendo su conformación a temperaturas inferiores a 94 °C, y una gran resistencia a la proteólisis, lo que permite mantener sus propiedades alergénicas durante el tránsito gastrointestinal (Mills *et al.*, 2002). Varios investigadores han evaluado los cambios inducidos por el tostado, el hervido, el calentamiento por microondas y la cocción a presión en la alergenicidad de las legumbres y los frutos de cáscara, mostrando que el procesamiento basado en la presión y ciertos tratamientos térmicos parecen tener un impacto importante en la capacidad de unión *in vitro* de las IgE (Álvarez-Álvarez *et al.*, 2005; Cabanillas *et al.*, 2012, 2014; Cuadrado *et al.*, 2009, 2011; Maleki *et al.*, 2000; Schmitt *et al.*, 2010). En este trabajo, se ha podido comprobar que, a temperaturas superiores de 160 °C durante 13 min, como la usada en el tratamiento del horneado, la integridad de la globulina 11S se ve afectada y por lo tanto el epítipo reconocido por el scFv JrBSF.

Debido a las relaciones filogenéticas cercanas entre las especies de nuez, pacana y otros frutos de cáscara, así como a la gran variedad de plantas y componentes animales que pueden estar presentes en diferentes productos alimenticios comerciales, es necesario verificar la especificidad del ELISA desarrollado frente a una amplia gama de especies. Con este fin, se analizaron extractos de proteínas de 63 especies no diana, entre las que se incluyen 9 frutos de cáscara, 48 especies vegetales y 6 especies animales (Tabla IV.1.2). Sólo el extracto de pacana mostró una absorbancia diferente a la del blanco, provocando un 2,25 % de reacción cruzada con la nuez. Interpolando la absorbancia obtenida en el ELISA directo por el extracto de pacana en la fórmula logarítmica obtenida de la curva estándar de nuez cruda, sería el equivalente a detectar 22,5 g Kg⁻¹ de nuez. Conviene señalar que la reactividad cruzada entre nuez y pacana está presente con frecuencia en los kits ELISA y en los métodos publicados para la detección de la nuez, debido a que

pertenecen a la misma familia botánica (Juglandaceae) y presentan proteínas alergénicas, como las albúminas, con un 92 % de similitud. La reactividad cruzada con otros frutos de cáscara (pistacho, avellana, nuez de Brasil, castaña, piñón) y otras especies de plantas (quinoa, sésamo, trigo sarraceno y soja) también es relativamente frecuente (Costa *et al.*, 2014; Niemann *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014), pero no fue observada con el scFv JrBSF. La reactividad cruzada de 2,25 % frente a la pacana observada con el JrBSF scFv multimérico hace que este ELISA no sea lo suficientemente específico para la detección de nuez en productos que contienen pacana, aunque la reacción cruzada es menor que la de otros kits ELISA. Varias compañías han desarrollado kits comerciales basados en técnicas de ELISA tipo sándwich para la detección de nuez en alimentos (Tabla I.2). Algunos ELISAs que usan anticuerpos policlonales frente al alérgeno Jug r 1, alcanzan un LOD inferior a 1 mg Kg⁻¹, en numerosas matrices alimentarias como galletas, helados o chocolates (Wang *et al.*, 2014). Sin embargo, con frecuencia la sensibilidad varía en función de la matriz utilizada, debido a la dificultad de extracción de las proteínas de interés o de detección del alérgeno.

V.1.8. Aplicación de la técnica de ELISA directo con scFv multimerizado para verificar la presencia de nuez en alimentos comerciales, y comparación con un kit comercial de ELISA y una técnica de PCR en tiempo real

Una vez puesta a punto la técnica de ELISA con el scFv JrBSF multimerizado para la detección de nuez, se llevó a cabo el análisis de muestras de alimentos con el fin de demostrar la presencia de nuez y verificar el correcto etiquetado de los productos comerciales. Además, los resultados obtenidos de ese análisis se compararon frente a un kit comercial de ELISA para la detección de nuez. Asimismo, se empleó un método de PCR en tiempo real específico de nuez previamente desarrollado por nuestro grupo de investigación (López-Calleja, de la Cruz, González, *et al.*, 2015b), para descartar los posibles falsos negativos o falsos positivos presentes en las técnicas inmunológicas. El método de PCR en tiempo real permite diferenciar la nuez de la pacana y tiene una sensibilidad equivalente a 0,1 mg Kg⁻¹. Con el fin de evaluar la aplicabilidad del ELISA directo desarrollado en esta Tesis Doctoral con relación a otras técnicas disponibles, se utilizó un kit comercial ELISA no competitivo tipo sándwich, que emplea anticuerpos policlonales específicos de nuez (Alertox Walnut, Biomedal Diagnostics, Sevilla). Según la información proporcionada por el fabricante, este kit presenta un LOD y LOQ de 0,6 mg Kg⁻¹ y 2 mg Kg⁻¹, y está diseñado para detectar y cuantificar la nuez en el intervalo de 2-

50 mg Kg⁻¹. La evaluación del kit comercial comenzó por la verificación de los datos de sensibilidad y especificidad aportados por el fabricante.

Con relación a la especificidad, el manual del kit ELISA indicaba que durante su validación no se encontraron reacciones cruzadas significativas frente a 30 matrices alimentarias. Sin embargo, al extrapolar en la ecuación logística obtenida a partir de los estándares proporcionados por el kit los resultados de absorbancia obtenidos en nuestro laboratorio a partir de 8 matrices alimentarias, varias matrices presentaron reacciones cruzadas. Cabe destacar que la almendra, no incluida en la lista del kit, presentó una reactividad cruzada del 8,97 % [0,274 (Abs almendra) / 3,055 (Abs nuez) x100] con respecto a la absorbancia de nuez a una concentración de 100 mg Kg⁻¹ e interpolando la absorbancia de la almendra en la ecuación logística obtenida de los estándares del kit se obtuvo una concentración de 2,38 mg Kg⁻¹ de nuez presente en la almendra. No incluir una advertencia sobre esta reacción cruzada puede dar lugar a un falso positivo, y que se etiquetara el alimento como con presencia de nuez. Las personas alérgicas a la almendra pueden llegar a comprar ese producto confiando en que no les afectará, pudiendo desencadenarles una reacción alérgica. A su vez, personas alérgicas a la nuez no comprarán ese producto por evitar una posible reacción alérgica, a pesar de estar libre de este alérgeno. Y por último, no sería posible especificar la cantidad de alérgeno real que puede haber de nuez si se encuentra junto con almendra en el mismo producto, puesto que se vería enmascarado por la almendra. Por otra parte, la absorbancia de la pacana detectada como nuez obtuvo una reactividad cruzada de 3,04 mg Kg⁻¹ (11,72 % con respecto al valor de 100 mg Kg⁻¹ de nuez), superior al 0,82 % indicado en el manual del kit. Los valores de LOD y LOQ calculados en este trabajo utilizando la curva estándar fueron de 2,2 mg Kg⁻¹ y 3,3 mg Kg⁻¹ respectivamente, siendo ligeramente superiores a los indicados en el manual del kit (0,6 mg Kg⁻¹ y 2 mg Kg⁻¹, respectivamente), por lo que no se podría establecer la concentración real de nuez en un producto comercial. Considerando los resultados obtenidos en este trabajo, sería conveniente que aquellas matrices que según el manual del kit no presentaban reactividad cruzada fueran reevaluadas. Además, estos resultados corroboran que al igual que en otras técnicas y kits comerciales de ELISA para la detección de nuez (Costa *et al.*, 2014), la pacana es la especie que más reacciones cruzadas produce y sería necesario emplear un método de confirmación que pueda diferenciar la nuez de las especies que producen reacciones cruzadas, como la técnica de PCR en tiempo real (López-Calleja, de la Cruz, González, *et al.*, 2015b).

En segundo lugar, se evaluó la sensibilidad del Kit comercial ELISA mediante el análisis de mezclas binarias de nuez en harina de maíz que contenían 50, 20, 10, 5, 2 mg Kg⁻¹ de nuez, siendo el valor más alto el de 50 mg Kg⁻¹. Para evaluar la influencia de los polifenoles presentes en la testa (capa fina por encima de la semilla) sobre el reconocimiento de las proteínas alergénicas de la nuez por los anticuerpos, se prepararon mezclas con nuez pelada y sin pelar. Además, con el fin de evaluar la influencia del tostado en el reconocimiento del epítipo, como se demostró en el caso del JrBSF (Figura IV.1.7), se prepararon las mismas mezclas binarias con nuez cruda y con nuez tostada. Los valores de absorbancia obtenidos de cada mezcla experimental en las diferentes condiciones se representaron frente a la concentración de nuez (100-1 mg Kg⁻¹) y se compararon con la curva de calibración obtenida usando los estándares del kit (50, 15, 5, 2 y 0 mg Kg⁻¹). Se comprobó que las 4 curvas en las diferentes condiciones de nuez fueron similares (Figura IV.2.1), indicando que la presencia de polifenoles en la testa y el tostado a 160 °C no afectan a la detección de nuez por parte del kit. Pero cabe destacar que el valor de absorbancia de la nuez (100 mg Kg⁻¹), y también las mezclas binarias de 50, 20, 10, 5, 2 mg Kg⁻¹ en todas las condiciones de la nuez (cruda, y horneada, con testa y sin ella), sin diluir y siguiendo las instrucciones del fabricante, están por encima del valor de absorbancia más alto (50 mg Kg⁻¹) de los estándares del kit. Por ello, se prepararon diluciones de los extractos a 1:5 y 1:25 en tampón de extracción de proteínas. Las muestras diluidas 25 veces dieron valores de absorbancia por debajo del estándar, por lo que tampoco permitían una correcta cuantificación. Sin embargo, las absorbancias de las muestras diluidas 5 veces fueron las más cercanas a las absorbancias obtenidas con los estándares del kit. De nuevo, a pesar de tener mayor sensibilidad y estabilidad en cuanto al tratamiento de las muestras, el kit ELISA debería ser reevaluado, debido a que la cuantificación no sería fiable. También es posible que la matriz alimentaria empleada para hacer las mezclas binarias o los estándares del kit pueda influir en la eficiencia de la extracción. Atendiendo al tipo de tampón que se emplea en la extracción de proteínas de muestras comerciales procesadas, se ha determinado que el tampón influye de forma considerable en la detección de nuez mediante técnicas inmunoenzimáticas, siendo más efectivo el reconocimiento de las proteínas en PBS y pH alto que con reactivos comerciales (Jayasena *et al.*, 2019). Por lo que el método de extracción elaborado en nuestro laboratorio sería más eficiente e influiría menos en el reconocimiento de la proteína que las extracciones llevadas a cabo con los reactivos comerciales proporcionados en el kit. No obstante, siguiendo las instrucciones del fabricante, se analizaron todos los extractos sin diluir, y la concentración aparente de nuez de los extractos heterólogos se expresó como reactividad cruzada.

De la comparación realizada se puede concluir que el ELISA directo con el scFv JrBSF multimérico desarrollado en esta Tesis Doctoral, y el kit ELISA tienen distintas características. El ELISA directo presenta menos reacciones cruzadas que el kit, pero también menor sensibilidad. Sería adecuado establecer un sistema de análisis complementario mediante PCR en tiempo real, para excluir los falsos negativos o positivos, para tener un resultado más fiable. La principal ventaja y novedad del método de ELISA con scFv multimérico es la selección *in vitro* de anticuerpos, que permite su producción ilimitada sin utilizar animales de experimentación, con la ventaja de incrementar la producción y disminuir el coste. Además, cabe destacar que los anticuerpos recombinantes pueden modificarse *in vitro*, tanto en su secuencia de aminoácidos como por conjugación genética con otras moléculas que mejoren su sensibilidad. La posterior modificación funcional añadiendo una molécula fluorescente o una biotina al anticuerpo podrían emplearse en diferentes plataformas analíticas como los dispositivos de flujo lateral o *arrays*. Una ventaja adicional de las técnicas de ELISA sobre los métodos basados en el ADN es que se detecta la molécula alergénica, es decir, la proteína, en lugar del ADN que no es un componente alergénico en sí mismo.

Después del análisis de muestras de referencia y mezclas experimentales para evaluar las ventajas y limitaciones del kit comercial y del ELISA con scFv multimerizado para la detección de nuez en alimentos, se procedió a evaluar su aplicabilidad para el análisis de alimentos comerciales. En total se analizaron 101 muestras comerciales obtenidas de diferentes establecimientos e incluyendo una gran variedad de tipos de alimentos, para que el muestreo fuera lo suficientemente diverso para observar las limitaciones de todas las técnicas. Con relación a su contenido en nuez, 28 muestras la declaraban como ingrediente en el etiquetado. De las 28 muestras que declaraban contenido de nuez en su etiquetado, 11 produjeron resultados negativos por alguna de las técnicas empleadas, principalmente, la técnica del ELISA directo con scFv, aunque 2 fueron negativas en la técnica de PCR en tiempo real y una para el kit ELISA. Entre las muestras negativas se encontraron un chocolate, una salsa, una bebida, 2 helados, 5 yogures y un sándwich. Las 2 muestras negativas por PCR en tiempo real fueron el chocolate, que no declaraba un porcentaje específico de nuez, y el helado, que declaraba un 10 % de nuez. Para descartar que se tratara de una sustitución fraudulenta de la nuez por otro fruto de cáscara, como la pacana, se realizó una PCR en tiempo real específica para la detección de pacana, resultando igualmente negativo. Sin embargo, con el kit de ELISA se obtuvieron valores de absorbancia a 450 nm de 1,9 en el chocolate y 2,6 en el helado, quedando estos valores por encima de la curva estándar del kit, lo que corroboraría de forma cualitativa que se encuentra por

encima de 50 mg Kg^{-1} , como marca el etiquetado del producto. Dos hipótesis probables que puedan explicar estos datos contradictorios son: la posibilidad de un etiquetado erróneo del producto, en cuyo caso el resultado del kit ELISA estaría mostrando un falso positivo, o bien que la matriz alimentaria que contiene el alérgeno interfiera en el análisis mediante las técnicas de ELISA multimérico y PCR en tiempo real, por lo que se trataría de falsos negativos. Hay que tener en cuenta que el 15,67 % de la proteína total de la nuez corresponde a la fracción de globulinas 11S (Mao y Hua, 2012), es un porcentaje pequeño que por acción mecánica o química durante el procesado, o simplemente por interferencia de la matriz donde se encuentra, tanto en el helado como en el chocolate, puede hacer que esas proteínas se degraden o se oculte su epítipo obteniéndose falsos negativos. En el caso de las 9 muestras que solo resultaron negativas al ser analizadas por ELISA multimérico, se puede concluir que en algunas muestras puede deberse a su mayor LOD y que el procesado de los alimentos afecta a la eficiencia esta la técnica de detección ya que todas las muestras afectadas han recibido al menos un tratamiento de pasteurización. Por lo tanto, los resultados negativos de las 11 muestras (39 %) podrían indicar que se debería llevar a cabo un estudio y análisis más minucioso de las matrices alimentarias particulares a fin de corroborar los resultados negativos y poder determinar la limitación de los métodos analíticos desarrollados. Además, la baja cantidad de proteínas en el chocolate, la presencia de polifenoles y el procesamiento de los alimentos podrían estar interfiriendo con los métodos analíticos (Ozidal *et al.*, 2013; Tomaino *et al.*, 2010).

En el caso de las 2 muestras (chocolate y yogurt) con etiquetado precautorio de alérgenos (PAL) de la posible presencia de trazas de nuez, con ninguno de los tres métodos resultaron ser positivas en la detección de nuez. Hay que tener en cuenta que estos productos PAL surgen para evitar problemas por la presencia inadvertida de alérgenos, pero restringen su elección por parte de los consumidores alérgicos. En este caso puede tratarse de un etiquetado abusivo, ya que se está colocando de forma preventiva en alimentos que no tienen riesgo alguno de contener trazas de dicho alérgeno, lo que puede inducir a que muestren rechazo o desconfianza hacia esos productos. Una buena regulación de la reglamentación del uso de los productos con PAL podría mejorar la seguridad y la calidad de vida de los consumidores sensibles, pero el etiquetado precautorio de los alérgenos sólo debería utilizarse tras una evaluación exhaustiva de los riesgos de contaminaciones cruzadas de alérgenos presentes en la elaboración del producto y de que éstas no se pueden eliminar (DunnGalvin *et al.*, 2015). Una dificultad adicional que afecta al PAL es la falta de dosis de referencia mínimas definidas que pueden causar reacción alérgica. Los umbrales o dosis desencadenantes son la cantidad más baja de un alérgeno alimentario

que puede provocar una reacción alérgica. Cuando se conozcan para los distintos alérgenos, se podrá trabajar para reducir la contaminación cruzada por debajo de estos niveles y que los consumidores estén protegidos ante unos etiquetados precautorios más fiables y puedan ver incrementada su posibilidad de elección del alimento. Pero es muy difícil establecer esos umbrales, porque cada paciente presenta una sensibilidad muy diferente. Si existe el riesgo de que un producto alimenticio se vea afectado por una contaminación cruzada de alérgenos, la etiqueta debe incluir una de las siguientes declaraciones: puede contener "X" o no es adecuado para personas con alergia a "X" (Remington *et al.*, 2020; Taylor *et al.*, 2014).

De los 30 productos analizados que indicaban en su etiquetado que contenían otros frutos de cáscara distintos de nuez, todos los tipos de muestras resultaron negativos excepto algunos de los cereales. Los resultados positivos obtenidos mediante todas las técnicas podrían indicar contaminaciones cruzadas en estos productos. Las 7 muestras positivas (23 %) contenían pacana o una mezcla de pacana con otros frutos de cáscara, como se verificó mediante la técnica PCR en tiempo real específica para la pacana. La reactividad cruzada de la pacana con la nuez suele encontrarse en todos los métodos ELISA disponibles para la detección de nuez (Costa *et al.*, 2014; Niemann *et al.*, 2009), por lo que los métodos ELISA estarían produciendo falsos positivos, detectando una reacción cruzada con la nuez. Por otra parte, 6 de esas muestras resultaron positivas para nuez por PCR en tiempo real, con alrededor de 300 mg Kg⁻¹ de nuez. Según los resultados de la técnica de PCR, 6 de las 7 muestras contenían tanto nueces como pacanas. Solo una muestra resultó negativa para nuez por el método de PCR y por ELISA directo, pero fue positiva para el kit ELISA, conteniendo solo pacanas. Esta muestra debería considerarse como falso positivo y supondría un problema para los consumidores alérgicos. Mediante el método de ELISA directo con el JrBSF, 5 muestras sin nuez declarada, pero que declaraban contenido en pacana, resultaron positivas para nuez (16,67 %). Por lo tanto, no es posible determinar en estas muestras si los resultados de la prueba ELISA detectan la nuez y/o la pacana.

De las 26 muestras analizadas en cuyo etiquetado se indicaba que contenían trazas de otros frutos de cáscara distintos de la nuez, 3 de las muestras de chocolates resultaron positivas mediante la técnica de PCR en tiempo real (11,5 %) y solo 2 de ellas mediante el kit ELISA (7,7 %). En una de las muestras de chocolate, la nuez se detectó solo por PCR a una concentración de 230 mg Kg⁻¹ que, aunque fue negativa en los métodos ELISA, es una concentración suficiente para que un consumidor sensible pueda tener una reacción alérgica. Entre las causas de este positivo pueden encontrarse una contaminación cruzada

del alimento en la industria o en el procesado de la muestra, ya que no se detectó mediante ningún ensayo inmunoenzimático. Los bajos niveles de nuez presentes en la muestra pueden indicar una contaminación involuntaria, ya sea en las materias primas o en el equipo o el entorno de la industria alimentaria. Otra razón por la que puede no detectarse la nuez en las muestras de chocolate puede deberse a la presencia de polifenoles del chocolate, que se unen a las proteínas de la nuez formando complejos que inhiben su reconocimiento (Labuckas *et al.*, 2008; Ozdal *et al.*, 2013), y al tratamiento al que los chocolates son sometidos durante su producción. Dado que las muestras que dieron positivo mediante el kit ELISA de la nuez (absorbancias de 1,87 y 0,121) y la técnica de PCR en tiempo real, no fueron declarados en su etiquetado, estos productos fueron etiquetados incorrectamente y supondrían un peligro para el consumidor sensible.

De acuerdo con estos resultados, hubo entre un 4,95 y 8,91 % de muestras (dependiendo del método analítico) que contenían nuez, pero no la declaraban en su etiquetado, lo que confirma que existe un riesgo para los consumidores alérgicos. De manera similar, Ford *et al.* (2010) informaron de casi un 3,5 % de productos positivos para alérgenos de nuez que no estaban declarados en esos productos, y de un 5,3 % de positivos entre los productos que "pueden contener nuez". Ante estos resultados, se puede entender que los consumidores alérgicos muestren al final cierto rechazo a los productos que declaran "puede contener" en su etiquetado, ya sea por desconfianza al observar el producto, por su conocimiento de la empresa fabricante o por sus experiencias pasadas. Hasta el 8 % de los consumidores alérgicos declaran haber tenido reacciones alérgicas ante la ingestión de productos PAL (Allen y Taylor, 2018). También es importante tener en cuenta que el uso abusivo de etiquetados precautorios crea frustración en el consumidor alérgico, porque limita sus opciones de alimentos a consumir, y finalmente asume riesgos que pueden llegar a perjudicar su salud (DunnGalvin *et al.*, 2015).

Por último, ninguna de las 15 muestras analizadas que no declaraban contener frutos de cáscara o trazas de frutos de cáscara fueron positivas para la nuez en ninguna de las técnicas descritas en este estudio (Tabla IV.2.4).

Del análisis de 101 muestras comerciales realizado para comprobar la veracidad del etiquetado con relación a la presencia de nuez, se deduce la importancia de que los métodos analíticos para detectar ingredientes alergénicos en los alimentos tengan una especificidad y sensibilidad adecuadas para rastrear cantidades muy pequeñas de los alérgenos en matrices complejas de alimentos procesados. Las tres técnicas utilizadas en este estudio tienen ventajas e inconvenientes. La técnica de PCR en tiempo real es la más sensible de

las empleadas, pero es la más costosa y hay que tener en cuenta que no detecta proteínas alergénicas, sino el ADN de la nuez. No obstante, se ha utilizado para confirmar tanto los resultados de falsos negativos como los falsos positivos, porque es capaz de discernir claramente entre el ADN de la nuez y el de la pacana, y además presenta un LOD muy bajo ($0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$). A pesar de que el límite de detección del ELISA con scFv multimerizado era el más alto, había una buena concordancia entre los resultados inmunoenzimáticos y los de la PCR en tiempo real, excepto para algunas muestras líquidas o semisólidas tratadas con calor (lácteos, bebidas, sándwich) o las que contenían pacana. En comparación con la prueba de ELISA directo con scFv multimerizado, el kit de ELISA sándwich de nuez demostró mayor sensibilidad y resultó menos afectado por el procesamiento de las muestras, pero tenía una mayor reactividad cruzada con la pacana y otros frutos de cáscara declarados por el fabricante, lo que producía algunos falsos positivos para la nuez.

Dado que cada método tiene ventajas y limitaciones para la detección de alérgenos, la técnica de PCR en tiempo real y los inmunoensayos ofrecen enfoques complementarios (Holzhauser, 2018). Además, sería conveniente que las industrias alimentarias apliquen buenas prácticas para elaborar un etiquetado fiable de los alérgenos, así como el uso combinado de ambas técnicas para el control interno de contaminaciones cruzadas, incluyendo el análisis del riesgo de los alérgenos en sus planes de APPCC.

V.2. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES ESPECÍFICOS FRENTE A PISTACHO (*PISTACIA VERA*) MEDIANTE LA TÉCNICA DE *PHAGE DISPLAY* PARTIR DE GENOTECAS DE FAGO-ANTICUERPOS RECOMBINANTES TIPO DAB

El segundo objetivo de esta Tesis Doctoral consistió en la obtención de fago-anticuerpos recombinantes frente a pistacho, seleccionados por afinidad mediante *phage display* a partir de una genoteca comercial semisintética de tipo dAb (*single domain antibody*), y su empleo en el desarrollo de una técnica inmunoenzimática (ELISA indirecto) para la detección de pistacho en alimentos.

V.2.1. Enriquecimiento de la genoteca de dAbs en clones de fago-dAb específicos de pistacho mediante diferentes estrategias de *biopanning*

Debido a la creciente demanda de anticuerpos recombinantes en medicina e investigación, se está produciendo un auge de la tecnología de *phage display* o presentación en fagos filamentosos como medio de obtener anticuerpos recombinantes de manera rápida

y económica, permitiendo su producción a gran escala en organismos tanto procariotas como eucariotas. Mediante técnicas de ingeniería genética, o utilización de plásmidos comerciales y cepas bacterianas se puede obtener una producción de hasta 4 g L^{-1} de anticuerpos recombinantes (Gupta y Shukla, 2017; Ledsgaard *et al.*, 2018).

Para conseguir el aislamiento de anticuerpos recombinantes específicos frente a una determinada diana, los principales aspectos a considerar son la calidad de las genotecas que se emplean, es decir, el número de anticuerpos funcionales correctamente plegados que contiene la genoteca, así como una buena estrategia de *biopanning* (Mandrup *et al.*, 2013).

Para desarrollar este segundo objetivo de la Tesis Doctoral, se empleó una genoteca comercial de fago-anticuerpos recombinantes de dominio único (dAb).

La visión de los anticuerpos solo como moléculas compuestas de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, cambió cuando se llevó a cabo un análisis de moléculas de inmunoglobulina G (IgG) total y fraccionada en el suero de un dromedario en el laboratorio del profesor Raymond Hamers de la Vrije Universiteit Brussel de Bélgica (VUB). Un proyecto en el que los estudiantes debían realizar pruebas diagnósticas serológicas de la infección por tripanosoma en camellos dio como resultado un descubrimiento fortuito, demostrando la presencia de anticuerpos que carecían de una cadena ligera y que mantenían la capacidad de unir antígenos (Arbabi-Ghahroudi, 2017).

La genoteca de anticuerpos de dominio único, *single domain antibody* (dAb), está compuesta de fragmentos de anticuerpos humanos que carecen de cadena ligera y solo contienen el dominio variable de la cadena pesada o V_H . Para su enriquecimiento se necesita del fago ayudante M13 K07, que infecta *E. coli* TG1 a través del pili bacteriano usado como receptor y genera títulos de hasta 10^{13} fagos por mililitro de cultivo bacteriano. El empleo de genotecas de dAbs, tiene un gran interés para la selección de sondas específicas debido a que presentan mayor grado de diversidad de fragmentos de anticuerpos y un menor tamaño que las plataformas de anticuerpos convencionales. Entre las ventajas de los dAb también destacan: a) una elevada estabilidad térmica por su mayor contenido en residuos hidrofílicos; b) alta solubilidad al no presentar *linker* artificial como en los scFv que una la V_H con V_L ; c) la facilidad para su subclonación y expresión; d) su coste de producción relativamente bajo; e) la facilidad con que se pueden modificar mediante ingeniería genética; y f) su facilidad de penetración en tejidos (Arbabi-Ghahroudi, 2017).

Por todo ello, se eligió esta genoteca para facilitar la selección de anticuerpos específicos frente a pistacho. Esta es una genoteca semisintética no inmune de anticuerpos de dominio único, con un tamaño (R_z) de 3×10^9 y basada en un marco de V_H de línea germinal humana (V3-23/D47), que fue desarrollada por Daniel Christ en el Laboratorio de Biología Molecular del Consejo de Investigación Médica de Cambridge (Reino Unido) (Lee *et al.*, 2007). La diversidad en estos anticuerpos (en las posiciones H27-33, H35, H50, H52-H54, H94, H95-H100(a-k), H101, H102) se introdujo en los dominios de unión a antígenos mediante mutagénesis dirigida por PCR en las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3). Su tamaño ofrece un extenso repertorio de fago-anticuerpos, aumentando la probabilidad de encontrar clones de alta afinidad por una determinada diana molecular. La genoteca está construida en el vector fagémido pR2, resistente a la ampicilina, que contiene los epítomos MYC y VSV, para facilitar su identificación y purificación. Además, esta genoteca se ha diseñado para minimizar la tendencia a la agregación de los anticuerpos, reduciendo la longitud de la CDR3, pero manteniendo la capacidad de reconocimiento del antígeno.

Uno de los procesos más importantes a la hora de seleccionar los clones específicos es el proceso de *biopanning* (Parmley y Smith, 1988). En esta Tesis Doctoral se plantearon diferentes estrategias de selección para obtener fago-dAbs específicos de pistacho. Se emplearon diferentes superficies para la inmovilización de los antígenos y diferentes dianas proteicas para evitar la selección de los fagos con afinidad por las superficies de inmovilización o por otras proteínas no diana que podrían dar lugar a falsos positivos. Con relación a la diana molecular, la selección se suele llevar a cabo empleando moléculas purificadas (Hoogenboom *et al.*, 1998). Sin embargo, no todos los antígenos están disponibles comercialmente y la purificación de proteínas vegetales, al tener una expresión multigénica, es incompleta y laboriosa. En trabajos anteriores del grupo de investigación, se consiguieron aislar con éxito fago-anticuerpos específicos frente a la nuez del Brasil y frente a la almendra utilizando extractos completos de proteína de las especies diana (de la Cruz *et al.*, 2013, 2015), demostrándose que estos extractos permiten aislar clones más específicos ya que se unen a una variedad más amplia de moléculas (Menendez y Scott, 2005). De forma similar, también se empleó un extracto de nuez en el primer objetivo de esta Tesis Doctoral. Por lo tanto, para seleccionar fago-dAbs frente a pistacho se consideró partir de extractos totales de estos frutos de cáscara, en diferentes condiciones, para evaluar la especificidad y la afinidad de cada estrategia de selección. Como en el caso de la genoteca de scFv, el proceso comienza con la inmovilización del ligando o diana de interés en un soporte sólido sobre el que se añaden los fago-dAbs de la genoteca en solución, para

que se produzca la unión al antígeno (diana) de los fago-dAbs específicos. Aquellas partículas de fago-dAbs inespecíficas que no se han unido a la fase sólida se eliminan durante los pasos de lavado, y las que permanecen unidas al antígeno inmovilizado se eluyen mediante la adición de tripsina. Este hecho favorece la recuperación cuantitativa de todos los fagos con independencia de la afinidad de la interacción, a diferencia de la elución convencional mediante cambios de pH que preferentemente rompen las interacciones más débiles, produciendo un sesgo con aquellos anticuerpos que tienen baja afinidad (Thomas y Smith, 2010). Los fagos específicos del antígeno pueden amplificarse en una cepa apropiada de *E. coli* para sus aplicaciones posteriores o para el siguiente ciclo de selección, facilitando un mayor enriquecimiento. La ronda final de selección puede determinarse mediante la evaluación de que no se produzca un aumento adicional en el rendimiento de los fagos eluidos. Aun así, debido a la existencia de uniones inespecíficas que limitan el enriquecimiento en cada ronda de selección, al menos hay que llevar a cabo dos rondas de selección, alternando el tipo de soporte, y escoger aquellos clones que presenten una afinidad real y específica por el antígeno.

Se llevaron a cabo diferentes estrategias de *biopanning* (S1-S4) para obtener clones específicos de pistacho (Tabla IV.3.2). En todas las estrategias se utilizaron paletas de poliestireno como fase sólida para la primera ronda de *biopanning* y esferas magnéticas para la segunda ronda, a fin de evitar el aislamiento de fago-dAbs que reconozcan a la fase sólida y que producirían falsos positivos. Otro aspecto que se debe controlar es la posibilidad de seleccionar clones que produzcan reacciones cruzadas con especies no diana. Para minimizarlo, se incluyó previamente en cada ronda de selección una etapa de hibridación sustractiva o *biopanning* negativo, que consiste en la incubación de la genoteca con el soporte unido al extracto frente al cual no debe haber reconocimiento, como ocurre entre el pistacho y el anacardo. Ambos pertenecen a la familia de las Anacardiáceas y, debido a su proximidad filogenética, es difícil obtener anticuerpos específicos del pistacho que no tengan una reacción cruzada con el anacardo (Tawde, 2004). Las dos rondas de selección se llevaron a cabo utilizando extractos de proteínas de pistacho, anacardo y cacahuete enteros (S1 y S2) o desengrasados (S3 y S4). El proceso de desengrasado se incorporó en las estrategias debido a que este tipo de frutos de cáscara tienen prácticamente la mitad de contenido en grasa, que interfiere en la reacción de reconocimiento de la diana por parte del fago-dAb. Este proceso se realizó con acetona, que a su vez permite la eliminación de polifenoles presentes en los frutos, que también interfieren en el reconocimiento (Moo-Huchin *et al.*, 2019; Ozdal *et al.*, 2013; Tomaino *et al.*, 2010). En S1 y S3 la estrategia de *biopanning* consistió en una hibridación sustractiva con cacahuete en la primera y segunda

rondas de selección y una selección positiva con pistacho en ambas rondas. Se observó que en la estrategia con el extracto desengrasado (S3) se recuperaron muchos más clones que en S1. En las estrategias S2 y S4 se realizó una selección negativa frente a cacahuete en la primera ronda y frente a anacardo en la segunda. Esta doble selección negativa favoreció la aparición de clones más específicos, pero en menor número (Figura IV.3.2 y Tabla IV.3.2). El aumento en el número de fagos eluidos conforme se realizan las rondas de selección está relacionado con el enriquecimiento de la genoteca en variantes de fagos que presentan afinidad por el pistacho, lo que indicaría que el proceso de *biopanning* transcurrió de forma acorde a lo descrito en la bibliografía. Para confirmar esta hipótesis, se realizó un ELISA de fago-dAbs policlonales con el conjunto de fago-dAbs recuperados al final de cada ronda de selección, enfrentándolos a los extractos de pistacho, anacardo y cacahuete, y utilizando BSA y β -galactosidasa como controles negativos (Figura IV.3.2). Los resultados mostraron un aumento en los valores de absorbancia frente a las proteínas de pistacho después de la segunda ronda, con importantes diferencias entre las estrategias. Cuando se utilizaron extractos proteicos no desengrasados como diana, la unión al pistacho aumentó sólo ligeramente en la estrategia S1, y no aumentó con relación a la primera ronda en S2. Por el contrario, la utilización de extractos desengrasados como diana permitió un claro enriquecimiento de la genoteca en fago-dAbs frente a pistacho, con valores más altos registrados en la S3 que en la S4. Este resultado podría significar que la selección negativa contra el anacardo produjo la recuperación de un número menor de fagos con afinidad por el pistacho, pero más específicos. Se encontró una reactividad cruzada muy baja en los pocillos tapizados con BSA, β -galactosidasa, anacardo y cacahuete. Por tanto, según estos resultados, el uso de extractos desengrasados aumentó la eficiencia del proceso de *biopanning*, de manera que la población de fagos que reconoció específicamente al pistacho se enriqueció considerablemente en la segunda ronda, evitando la necesidad de rondas adicionales de selección. En consecuencia, se procedió al aislamiento de 95 clones individuales a partir de los fago-dAbs recuperados de la segunda ronda de selección.

V.2.2. Selección de clones de fago-dAb individuales mediante ELISA monoclonal

Dado que el propósito final de los anticuerpos seleccionados es desarrollar un inmunoensayo para la detección de pistacho en alimentos, se requiere que los clones seleccionados presenten afinidad hacia pistacho. Por ello, se realizó un ELISA de fago-dAbs monoclonales para aislar e identificar los clones que producían dAbs que reconocen proteínas de pistacho. Se aislaron 95 colonias de *E. coli* TG1 de las placas de titulación de

las segundas rondas de selección de las diferentes estrategias, y se analizaron los fago-dAbs producidos en el sobrenadante del cultivo. Los clones se consideraron positivos cuando la unión al extracto de pistacho fue al menos 5 veces mayor que la unión a los extractos de cacahuete o anacardo utilizados como controles negativos (A450 frente al pistacho $> 5 \times$ A450 frente al control negativo). Cuando se realizó la selección negativa con el cacahuete entero (S1), se obtuvieron solo 2 clones que reconocieron el pistacho (PVD5 y PVF10), pero también mostraron reacción cruzada con el anacardo (Tabla IV.3.2). Es posible que la sustracción con el cacahuete eliminara los clones que reconocen a otros frutos de cáscara, disminuyendo la posibilidad de obtener fagos libres que se pudieran unir a pistacho. En la estrategia S2, la selección negativa se realizó con el cacahuete en la ronda 1 y con el anacardo en la ronda 2. Esta estrategia dio como resultado un solo clon positivo que reconoció exclusivamente el pistacho (PVG3). Finalmente, este clon fue descartado porque su secuencia de nucleótidos reveló que no codificaba para un dAb completo, generando un anticuerpo truncado que carecía del péptido señal y la región FR1, y parte de la CDR1.

Los pistachos se caracterizan por su alto contenido en grasa (entre 40,6 y 53,5 %), con un perfil de ácidos grasos cardiosaludables (Dreher, 2012; Tomaino *et al.*, 2010). También son ricos en polifenoles (alrededor de 600 mg por 100 g), que forman complejos con las proteínas provocando cambios en las propiedades estructurales, funcionales y nutricionales de ambos compuestos (Ozidal *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta que el alto contenido de grasa del pistacho y otros frutos secos podría estar obstaculizando la obtención de dAb específicos del pistacho, se realizaron las mismas estrategias de *biopanning* utilizadas con los extractos enteros (S1 y S2), pero utilizando extractos desengrasados de pistacho, cacahuete y anacardo. En la estrategia S3, de los 95 clones analizados de la segunda ronda se obtuvieron un total de 13 clones (13,7 %) que reconocían al pistacho (Tabla IV.3.2). Tres de ellos mostraron reacción cruzada con el extracto de anacardo (PVA7, PVA8 y PVD8), y los clones restantes solo reconocían al pistacho (PVB4, PVB9, PVC11, PVC12, PVD6, PVE12, PVF6, PVF9, PVG8 y PVH7). En la estrategia S4, se obtuvieron 4 clones que se unieron a pistacho de los 95 clones analizados de la segunda ronda (4,2 %). Tres de ellos se consideraron específicos del pistacho (PVA1, PVA12 y PVF4), y sólo 1 reaccionó también con el anacardo (PVB12). Tras el examen inicial, se seleccionaron 8 clones de las segundas rondas de S3 y S4 para evaluar mediante un ELISA monoclonal con fago-dAb su especificidad frente a 10 especies de frutos de cáscara alergénicos (Figura IV.3.3). Solo hubo un clon, PVA8 (S3), que presentó reacción cruzada con el extracto de anacardo y fue desechado. El resto de los clones fueron completamente específicos frente a pistacho. Estos

resultados demostraron que el proceso de hibridación sustractiva con una proteína estrechamente relacionada con el pistacho, como el extracto de anacardo, excluía una parte de los fagos reactivos de pistacho, pero aun así permitía la selección de los fago-dAbs más específicos. Además, el uso de extractos desengrasados era necesario para obtener clones específicos de pistacho, eliminando los ácidos grasos y polifenoles. Por lo tanto, los extractos utilizados en las estrategias S3 y S4 se caracterizan por un alto contenido de proteínas sin elementos como los ácidos grasos y los fenoles que interactúan o impiden el reconocimiento de los epítomos de las proteínas por parte de los dAb, mejorando así la eficiencia de la selección de los anticuerpos.

En definitiva, para llevar a cabo una buena estrategia de *biopanning* hay que tener en cuenta: a) el tipo de extractos que se emplean, conociendo su contenido en proteína, polifenoles y ácidos grasos, así como las relaciones filogenéticas entre ellos; b) el soporte o combinación de soportes que se emplean para eliminar inespecificidades con el material empleado; c) llevar a cabo hibridaciones sustractivas, considerando las relaciones filogenéticas, para eliminar aquellos clones que puedan producir falsos positivos; y d) realizar al menos dos rondas de selección que permitan ver el incremento en el número de fagos obtenidos.

V.2.3. Secuenciación y caracterización de los clones seleccionados

El ADN de los 8 clones específicos de pistacho seleccionados, y 1 de los clones con reacción cruzada con el anacardo, se amplificó mediante PCR con los cebadores CDR1-2 y CDR3 para estimar la proporción de clones que contenían el inserto completo de V_H (aproximadamente 360-390 pb) y todos ellos produjeron fragmentos de amplificación del tamaño esperado. Se secuenciaron los insertos de los plásmidos purificados para corroborar el correcto marco de lectura de la secuencia y que integraran los epítomos c-Myc y VSV. Las secuencias se publicaron en *GenBank* con los siguientes números de acceso: PVA8-dAb (MN862009), PVB9-dAb (MN631054), PVD6-dAb (MN862010), PVE12-dAb (MN862011), PVF4-dAb (MN612110), PVF6-dAb (MN631055), PVF9-dAb (MN862012), y PVH7-dAb (MN862013). Al compararlos con la base de datos del NCBI y IMGT/V-quest, se confirmó que la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina de los clones positivos seleccionados correspondía al gen de la línea germinal IGHV3-23 de *Homo sapiens*. Por último, el análisis de las secuencias de aminoácidos deducidas para los 9 clones (Figura IV.3.4) demostró que todos eran diferentes, excepto el dAb PVF4, obtenido con la estrategia S4, y el PVC12, obtenido con la estrategia S3, que tenían la misma secuencia de nucleótidos. Por este motivo, al aparecer un mismo clon específico en dos estrategias diferentes se

decidió seleccionar el clon PVF4 por su mayor estabilidad de cultivo y producción de fago-dAb. Las secuencias de aminoácidos deducidas de los dAbs específicos de pistacho no contenían inserciones o deleciones en CDR1 y CDR2 en ninguno de los clones. Como era de esperar, la mayor variabilidad entre los clones seleccionados se encontraba en CDR3, tanto en secuencia como en longitud, con longitudes de 12 a 20 residuos. Además, cabe destacar la presencia de un codón de parada que estaba presente en la CDR1 de 6 clones, y en CDR3 de un clon (PVH7), debido a una mutación de tipo Ámbar. Estas mutaciones son frecuentes en este tipo de genotecas debido a la aleatorización de las secuencias de las CDRs y a que se emplea la cepa supresora Ámbar de *E. coli* TG1. Esta cepa *K12Δ (lac-proAB) supE thi hsdD5/F' traD36 proA⁺B lac^r lacZΔM15* es una cepa supresora Ámbar (supE) que se utiliza para la propagación de los fagos y la expresión de las proteínas heterólogas fusionadas con la proteína pIII de la cubierta. El codón Ámbar (UAG) es un codón de terminación de la traducción que no codifica para ningún aminoácido. Las cepas supresoras de Ámbar portan mutaciones en la secuencia del anticodón de un gen que codifica para un ARNt. Este ARNt portador de la mutación en el anticodón (ARNt^{G^{LN}}) permite reconocer y traducir un triplete UAG como glutamina (Gln). El supresor Ámbar supE se encuentra en muchas cepas de *E. coli* K-12 de uso común (Niccheri *et al.*, 2014; Singaravelan *et al.*, 2010). Los clones de dAb afectados por mutaciones Ámbar pueden utilizarse para la selección de fagos, pero para producir los dAb en forma soluble en una cepa no supresora es necesario realizar una mutagénesis dirigida para suprimir la mutación. Cuando se producen como fragmentos de anticuerpos solubles, los dAb de esta genoteca se secretan unidos a los péptidos marcadores de c-Myc y VSV para facilitar su purificación del cultivo donde son excretados.

V.2.4. Identificación y caracterización, mediante técnicas cromatográficas, electroforéticas, espectroscópicas e inmunoquímicas, de las dianas moleculares reconocidas por los anticuerpos recombinantes frente a pistacho

Para identificar las fracciones de proteína reconocidas por el fago-dAb PVF4, se realizó una separación cromatográfica del extracto de pistacho desengrasado mediante cromatografía líquida rápida de proteínas o *Fast protein liquid chromatography* (FPLC), seguida de un ELISA indirecto y un *Western blot* con las fracciones obtenidas. La separación cromatográfica se realizó mediante una columna de exclusión molecular con extracto de pistacho desengrasado, obteniéndose hasta 56 fracciones diferentes de un volumen aproximado de 1 mL. El perfil de proteínas (Figura IV.3.5A) presentó 2 picos principales y

3 picos menores a una longitud de onda de 280 nm. De las fracciones más representativas de cada uno de los picos obtenidos, se analizaron 100 μ L en un ELISA indirecto frente a los fago-anticuerpos producidos por el clon PVF4. Las fracciones 4-17, pertenecientes a los dos picos mayores y los primeros menores, fueron detectadas por el fago-dAb PVF4 (Figura IV.3.5B). Con el fin de identificar las proteínas específicas reconocidas por este clon, se realizó una electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras del extracto total de pistacho y de las fracciones seleccionadas. Las principales bandas electroforéticas obtenidas tenían pesos moleculares que iban de \sim 20 kDa a \sim 35 kDa (Figura IV.3.6A). Los patrones electroforéticos y del *Western blot* obtenidos con el extracto total de pistacho y con las fracciones 4-17, fueron similares a los descritos por Liu, Chhabra, y Sathe, (2015) en condiciones reductoras empleando un anticuerpo monoclonal murino frente a pistacho. En el *Western blot* con el fago-dAb PVF4 solo se produjo una banda de \sim 22 kDa (Figura IV.3.6B). Comparando el resultado con el de Liu et al., 2015, es probable que el antígeno reconocido por el dAb-PVF4 sea la subunidad básica de la globulina 11S del pistacho (alérgeno Pis v 2) que pertenece a la superfamilia de proteínas de las cupinas, y que se ha identificado como uno de los principales alérgenos del pistacho (Ahn et al., 2009).

Para verificar esta hipótesis, las bandas reconocidas por el fago-dAb se escindieron del gel de SDS-PAGE y se analizaron por espectrometría de masas en tándem de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF/TOF). Como se muestra en la Tabla IV.3.S1, los péptidos obtenidos de todas las bandas se identificaron en la secuencia de aminoácidos de la globulina 11S (*Pistacia vera*) (número de acceso: ABU42022). La cobertura de la secuencia 11S obtenida fue del 45 % en el caso de la banda correspondiente al extracto total de pistacho, del 22 % en la fracción 4 obtenida de la cromatografía, del 30 % en la fracción 6 y del 25 % en la fracción 8.

Las globulinas 11S se definen como bicupinas debido a la presencia de dos dominios de cupina, cada uno presentando un motivo en forma de barril beta. Son estructuras multiméricas no glicosiladas (hexámeros o mezcla de trímeros) sintetizadas como un polipéptido único, que se divide después de la traducción en un polipéptido ácido (30 - 40 kDa) y un polipéptido básico (22 - 27 kDa) unidos por un enlace de disulfuro (Ahn et al., 2009; Costa et al., 2019). Cabe señalar que la mayoría de los péptidos obtenidos de las bandas 4, 6 y 8, se alinean con la región C-terminal de la secuencia de la proteína, mientras que los péptidos de la banda del extracto total se alinean a lo largo de toda la secuencia (Figura IV.3.7).

Con el fin de conocer mejor la interacción entre el fago-dAb PVF4 y la globulina 11S del pistacho (ABU42022) identificada por MALDI-TOF/TOF, se elaboró un modelo tridimensional (Figura IV.3.8) utilizando el servidor SWISS-MODEL <https://swissmodel.expasy.org/>. El modelo se construyó mediante la comparación con la secuencia y estructura de la proteína más estrechamente relacionada disponible en la base de datos, que es la proteína de almacenamiento de la semilla (globulina 11S) de *Amaranthus hypochondriacus* L., 3qac.1.A, y que sirvió de plantilla al servidor para generar la estructura terciaria más cercana a la del pistacho. La mayoría de los péptidos identificados por MALDI-TOF/TOF, pertenecen a la subunidad de proteína básica (Cupina-1) de la globulina 11S, como se observa en los recuadros que se señalan en la Figura IV.3.8. Este resultado concuerda con el de Liu *et al* (2015), indicando que la subunidad básica de la globulina 11S del pistacho es un buen antígeno para producir anticuerpos dirigidos a los epítomos relevantes para la alergia humana.

V.2.5. Desarrollo de una técnica inmunoenzimática de ELISA indirecto, utilizando un fago-anticuerpo específico para la detección de pistacho en alimentos

Una vez seleccionado el clon PVF4 por su capacidad de producir fago-dAbs frente a pistacho sin producir reacciones cruzadas frente a otros frutos de cáscara, se procedió a desarrollar una técnica de ELISA indirecto para la detección de pistacho en alimentos empleando dicho fago-dAb. Previamente a la realización de los ensayos de ELISA indirecto, se titularon los fagos precipitados y se optimizó el número de partículas a utilizar en los inmunoensayos, fijándose finalmente en 10^{11} fago-dAb por pocillo. Para determinar la especificidad del fago-dAb PVF4 se analizaron mediante ELISA indirecto 67 especies heterólogas (frutos de cáscara, vegetales y animales) y no se observaron reacciones cruzadas, como se indica en la tabla IV.3.1. A continuación, se procedió a evaluar la sensibilidad de la técnica de ELISA indirecto con mezclas binarias de harina de maíz y pistacho tostado molido, que contenían desde 10^5 hasta 100 mg Kg^{-1} de pistacho en la mezcla. Debido a que la mayoría de los alimentos que contienen pistacho como ingrediente, suelen incluirlo tostado, el proceso de *biopanning* se llevó a cabo con pistachos tostados. Además, se comprobó que el fago-anticuerpo dAb-PVF4 permite la detección del pistacho tanto crudo como tostado un ELISA indirecto. Otros investigadores también han analizado mediante inmunoensayos pistacho crudo, tostado en seco y cocido al vapor, comprobando que la inmunorreactividad sólo disminuye cuando el tratamiento térmico se realiza con vapor o con calor y presión en las condiciones más duras (Noorbakhsh *et al.*, 2011; Sanchiz,

Cuadrado, *et al.*, 2018). En este trabajo se prepararon las mezclas binarias con el pistacho tostado, para asemejarlo lo más posible a la realidad de los productos comerciales. Sin embargo la realidad de los productos comerciales es muy heterogénea y, si se quisiera emplear la técnica con fines cuantitativos para determinar la sensibilidad del fago-anticuerpo, las mezclas binarias deberían tener una composición y tratamiento tecnológico lo más parecida posible a los productos comerciales que se van a analizar, ya que estos también son sometidos a diferentes tratamientos térmicos, de altas presiones o enzimáticos que pueden disminuir la alergenicidad del pistacho y por tanto su reconocimiento. Recientemente, se ha puesto de manifiesto que cuando anacardo y pistacho se someten a un tratamiento térmico junto con incremento de presión, disminuye su capacidad de unión a las IgE, siendo aún más marcada esta inhibición en el anacardo (Blanco *et al.*, 2018). También se observó que el tratamiento combinado temperatura/presión reducía el contenido total de proteína del extracto, debido a la disminución de su solubilidad por la formación de agregados (Vicente *et al.*, 2020).

Para evaluar la sensibilidad de la técnica, los pocillos de las placas ELISA se tapizaron con los extractos proteicos obtenidos de las mezclas binarias con diferentes concentraciones de pistacho (100 %, 10 %, 7,5 %, 5 %, 2,5 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 % y 0 %) en una matriz de harina de maíz. El pistacho de las muestras se detectó con el fago-dAb PVF4 (Figura IV.3.9). La curva dosis-respuesta obtenida dibuja una sigmoidal que se ajusta mediante una ecuación logística de 4 parámetros a un R^2 de 0,99869. El límite de detección se calculó como la concentración aparente de pistacho que presentaba una absorbancia superior a la media de las absorbancias de los frutos de cáscara no diana, más tres veces su desviación estándar. El valor que se obtuvo fue de 3983 mg Kg⁻¹. Los coeficientes de variación de cada uno de los puntos se encontraron entre el 2 % y el 15 %, dispersión aceptable para una buena reproducibilidad del método, puesto que los valores deben estar por debajo del 10 % para una buena reproducibilidad y son aceptables hasta el 20 %. Este LOD obtenido es más alto que los límites de detección publicados para otros inmunoensayos y kits comerciales disponibles para detectar pistacho usando anticuerpos policlonales o monoclonales. Por ejemplo, los kits de ELISA de pistacho MonoTrace de BioFront Technologies y AgraQuant ELISA de Romer Labs presentan un LOD de 0,12-0,13 mg Kg⁻¹ en varias matrices alimentarias, mientras que los dispositivos de flujo lateral tienen un LOD 10 veces superior (Costa *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2015). La matriz alimentaria puede tener un efecto considerable en la detección del alérgeno mediante ELISA, ya que numerosos factores pueden afectar a los resultados. Entre ellos se encuentra la dificultad de extraer y recuperar las proteínas alergénicas de forma cuantitativa de esas matrices

alimentarias. Las condiciones de pH, fuerza iónica, etc., pueden disminuir la solubilidad de las proteínas, causar modificaciones químicas y agregados de proteínas (Lim, 2010; Taylor *et al.*, 2009).

Por tanto, es necesario validar el método analítico para distintas matrices alimentarias porque, en definitiva, la capacidad de un método ELISA para detectar proteínas de alérgenos alimentarios en una muestra se ve afectada por la eficiencia con la que estas proteínas se extraen de la muestra, así como por la eficiencia con la que el anticuerpo detecta estas proteínas en el extracto de la muestra. El rendimiento global de un método basado en ELISA para la detección de alérgenos alimentarios es una función de estos dos parámetros (Abbott *et al.*, 2010).

Una vez calculado el LOD, se calculó la reactividad cruzada del ensayo como la cantidad estimada de pistacho que se obtiene al interpolar los valores de absorbancia de las especies heterólogas en la ecuación logística obtenida. De las 67 especies vegetales y animales analizadas, solo el huevo desarrolló una absorbancia mayor que el LOD de las proteínas de pistacho. Un estudio más exhaustivo de esta reacción cruzada demostró que solo aparecía en la yema de huevo (4,30 %) mientras que la clara de huevo presentaba niveles de absorbancia muy similares al blanco. Aunque este hecho podría suponer la aparición de falsos positivos en el análisis de muestras comerciales que contengan yema de huevo, es muy frecuente que los productos que declaran huevo en su etiquetado normalmente contengan solo clara de huevo, que además es la fracción del huevo dónde se concentran la mayoría de sus alérgenos (Benedé *et al.*, 2015). Por otra parte, la técnica de ELISA indirecto con el fago-anticuerpo PVF4 es específico de pistacho y no reconoce al anacardo como sí lo hacen otros inmunoensayos publicados, que presentan una reacción cruzada entre el 12 % e incluso hasta el 90 % (Cho *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2019). A pesar de la mayor especificidad del ELISA con PVF4-dAb, su sensibilidad es inferior a la de otros métodos de ELISA publicados que usan tanto anticuerpos monoclonales como policlonales para la detección de pistacho con una sensibilidad en torno a 1 mg Kg⁻¹ (Costa *et al.*, 2019; de la Cruz *et al.*, 2017; Lim, 2010; Liu *et al.*, 2015). Las técnicas disponibles para la detección de ADN de pistacho también tienen mayor sensibilidad. La técnica de PCR en tiempo real con sondas de ADN bloqueado (LNA *probe-real time* PCR) alcanza una sensibilidad de 10 mg Kg⁻¹ (Sanchiz *et al.*, 2017), la de FAST *real time* PCR alcanza una sensibilidad de 40 mg Kg⁻¹ (Torricelli *et al.*, 2020), un ensayo combinado de PCR decaplex junto con electroforesis capilar tiene un LOD de 50 mg Kg⁻¹ (Cheng *et al.*, 2016) y la sensibilidad de la técnica de PCR en tiempo real desarrollada en nuestro laboratorio para

pistacho es de $0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$ (López-Calleja *et al.*, 2014). A diferencia de las técnicas inmunológicas, la PCR no detecta proteínas alergénicas en los alimentos, sino el ADN, por lo que se considera una técnica indirecta de detección de alérgenos. Esto puede suponer un inconveniente para utilizar la técnica de PCR con el fin de controlar la eliminación de las proteínas alergénicas en las instalaciones de elaboración de alimentos.

La aplicabilidad del ELISA indirecto desarrollado para determinar la presencia o ausencia de pistacho con el fago-dAb PVF4, se evaluó mediante el análisis de 77 productos comerciales adquiridos en tiendas de Madrid, incluyendo productos de panadería y pastelería, barritas energéticas, chocolates, helados, yogures, bebidas, salsas y platos preparados. Las muestras se clasificaron atendiendo al etiquetado en 4 grupos según su contenido en pistacho y otros frutos secos (Tabla IV.3.3). Entre las muestras analizadas, 34 se incluyeron en el grupo de "pistacho declarado como ingrediente", 5 tenían etiquetado precautorio indicando "trazas de pistacho", 29 declaraban otros frutos de cáscara como ingredientes o como trazas, y las 9 restantes no declaraban contener frutos de cáscara ni trazas de ellos. A fin de confirmar los resultados obtenidos en el ELISA indirecto, las muestras también fueron analizadas mediante la técnica de PCR en tiempo real específica para pistacho que se había desarrollado previamente en nuestro laboratorio (López-Calleja *et al.*, 2014).

De las 34 muestras que declaraban contener pistacho como ingrediente, sólo un chocolate resultó negativo por la técnica de PCR en tiempo real (97 %). Por el contrario, sólo 20 muestras resultaron positivas mediante el ELISA indirecto con PVF4-dAb (58,8 %). Los resultados negativos del ELISA podrían deberse a que el contenido de pistacho se encuentre por debajo del LOD de la técnica, como en el caso de las galletas, chocolate y pastel, cuyo contenido en pistacho no está especificado en el etiquetado. También los resultados negativos pueden deberse a la influencia del tratamiento térmico de estos alimentos, puesto que la temperatura de procesado puede haber producido el despliegue de la estructura terciaria de las proteínas y la agregación de las cadenas proteicas, o que una matriz alimentaria compleja afecte al reconocimiento del epítipo por parte del anticuerpo, lo que a menudo conduce a resultados de falsos negativos o falsos positivos. En este caso pueden encontrarse las muestras de embutido, paté, helado y snack, que a pesar de presentar en el etiquetado el porcentaje de pistacho y ser detectado por PCR en tiempo real, resultaron negativas por ELISA. Otra posibilidad para dar respuesta a un falso negativo sería la sustitución fraudulenta del pistacho por otro producto menos costoso. El alto precio del pistacho ha suscitado preocupaciones sobre la autenticidad de algunos

productos relacionados con el pistacho en la industria de la confitería. Comúnmente se adultera añadiendo un guisante verde, debido a la similitud del color de su núcleo, que va del amarillo claro al verde intenso (Eksi-Kocak *et al.*, 2016). Pero este hecho no es muy frecuente, ya que normalmente su presencia en productos elaborados se debe a una contaminación accidental en la industria alimentaria, lo que representa un importante riesgo para la salud de las personas alérgicas (Sanchiz *et al.*, 2017).

Entre los 5 productos que incluían un etiquetado de advertencia sobre posibles trazas de pistacho, 1 dio positivo solo por PCR (un embutido) (20 %), y 2 muestras dieron positivo por ambos métodos (una pasta rellena y una salchicha) (40 %). Hay que tener en cuenta que sólo 2 muestras resultaron negativas (40 %) por lo que no presentaban trazas y podrían ser consumidas por pacientes alérgicos. Es esencial un etiquetado adecuado de aquellos productos comerciales que puedan contener alérgenos para ayudar a las personas alérgicas a identificar fácilmente los alimentos que deben evitar, ya que pueden suponer un grave riesgo para su salud. Un uso exhaustivo de estas técnicas de detección puede conducir a un menor uso del etiquetado precautorio, evitando así restricciones dietéticas innecesarias para las personas alérgicas al pistacho que pueden afectar negativamente a su nutrición, salud y calidad de vida. Asimismo, el uso de técnicas de detección en las industrias alimentarias ayudará a cumplir de forma más eficiente con las directrices de etiquetado establecidas en el Reglamento (UE) 1169/2011 (Allen y Taylor, 2018; DunnGalvin *et al.*, 2015; European Union, 2011; Lim, 2010).

En el grupo de 29 muestras etiquetadas con contenido de otros frutos de cáscara distintos del pistacho o sus trazas, todas las muestras fueron negativas por los métodos ELISA con fago-dAb y PCR en tiempo real, verificando la ausencia de pistacho en estos productos. Cabe señalar que las 10 muestras que declaraban anacardos en la lista de ingredientes, todas resultaron negativas tanto por el método ELISA como con el método PCR para la detección de pistachos, por lo que se vuelve a demostrar la ausencia de reacción cruzada con el anacardo en las técnicas desarrolladas en este trabajo. Además, esas muestras dieron positivo en el método de PCR en tiempo real específico para el anacardo, también desarrollado en nuestro grupo (López-Calleja, de la Cruz, González, *et al.*, 2015a). En el último grupo de 9 productos sin frutos de cáscara declarados, todas las muestras dieron negativo para el pistacho.

La aplicación de estos anticuerpos puede resultar útil para la detección de alérgenos de una forma rápida y específica, protegiendo la salud de los consumidores alérgicos al pistacho. Además, si se implementara la técnica ELISA en todas las industrias alimentarias,

facilitaría el cumplimiento de las normas de etiquetado de alérgenos, evitando alimentos con reacciones cruzadas, etiquetados incorrectos o un etiquetado precautorio abusivo.

Para finalizar, se debe mejorar la sensibilidad y la facilidad de producción de estos anticuerpos para su empleo en matrices complejas como chocolates, galletas o yogures. Es necesario conocer las características de la interacción entre los alérgenos y los anticuerpos recombinantes obtenidos. Mediante la modificación de las CDRs de los anticuerpos seleccionados por mutagénesis sería posible mejorar la afinidad de los anticuerpos con el antígeno. Se trata de llegar a niveles de detección similares a otras técnicas inmunológicas (1 mg Kg^{-1}) para garantizar la trazabilidad y etiquetado correcto de alérgenos. Además, cabe destacar, que es posible añadir *in vitro* a los anticuerpos otras moléculas que mejoren su sensibilidad. La posterior modificación funcional añadiendo una molécula fluorescente o una biotina al anticuerpo podrían emplearse en diferentes plataformas analíticas como los dispositivos de flujo lateral o *arrays*. Estos puntos se llevaron a cabo en el siguiente apartado.

V.2.6. Producción de dAb biotinilados *in vivo*, específicos frente a las proteínas de pistacho en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*

Como se describe en el capítulo IV.4, antes de conocer el problema de la presencia del codón Ámbar en la secuencia del clon PVF4, se llevó a cabo la producción de dAb biotinilados mediante la transformación en *Pichia pastoris*. En la Figura IV.4.1 se muestran los resultados de las amplificaciones de PCR con diferentes parejas de cebadores que amplifican el dAb o la secuencia de BirA de los clones obtenidos tras las transformaciones (pRAS002 y pRAS002.BirA). En ambos casos, se obtuvieron bandas del tamaño adecuado. Sin embargo, después de realizar varios ensayos de *dot blot*, *Western blot*, ELISA y purificación por columna de afinidad de proteína A y no obtener ningún resultado, se determinó que, en la transformación, el ADN del dAb se insertó en el genoma de *Pichia pastoris*, pero al estar presente el codón Ámbar TAG y este organismo ser incapaz de suprimirlo, éste se tradujo como señal de parada. En consecuencia, era necesario eliminar ese codón Ámbar antes de inducir la producción soluble del dAb en *Pichia pastoris*. Así, se llegó a la conclusión que era necesaria la realización de mutagénesis dirigida cambiando el codón TAG a CAG (Gln) (Figura IV.4.2) mediante unos cebadores específicos en el plásmido pRAS002. Después de la transformación en células XL1 Blue, se obtuvieron 10 clones y todos ellos presentaban el nucleótido cambiado. Se obtuvo una eficiencia de esos cebadores del 100 %. La secuencia mutada se introdujo en pPICZa y en células HB2151 electrocompetentes donde se obtuvieron 16 colonias. En la figura IV.4.3 se confirmó la

presencia de la secuencia mutada de PVF4 para continuar con el proceso de transformación en *Pichia pastoris* con el vector pRAS002m (PVF4m5) que contiene el dominio aceptor de biotina (BAD). De las 10 colonias que se obtuvieron de la transformación, solo 6 presentaron el tamaño adecuado para la secuencia del dAb, por lo que la eficiencia de la transformación fue del 60 % (Figura IV.4.4).

Tras el análisis por *dot blot* de los sobrenadantes de cultivo de diferentes clones mutados (PVF4m5) y antes de la cotransformación en *Pichia pastoris* con el vector que contiene la enzima BirA (Figura IV.4.5), se observó que la temperatura puede influir en el rendimiento de la proteína recombinante, mejorando la producción a través de la inducción con metanol en las temperaturas de 20 y 25 °C. Este hecho también se observa en la Figura IV.4.6 donde se observa un mayor número de bandas a la temperatura de 20 y 25 °C. A 27 °C las bandas eran más claras en el clon 3, y en el clon 8 aparecía un patrón diferente. Tanto las tres bandas del clon 3 como la banda anómala del clon 8 fueron analizados por MALDI-TOF/TOF, lo que nos aseguró la presencia de péptidos de inmunoglobulinas, a pesar de tratarse de péptidos inducidos a la temperatura de 27 °C. La influencia de la temperatura en la inducción también se observó en la Figura IV.4.7, donde el ELISA indirecto con los sobrenadantes del PVF4m5 presenta mayor inespecificidad a temperaturas bajas. Sin embargo, a 25 °C, las reacciones cruzadas son casi inexistentes. Esta influencia de la temperatura en la inducción de *Pichia pastoris* en todas las metodologías realizadas puede ser debida a la escasa estabilidad de la proteína recombinante producida a temperaturas más altas, a la liberación de más proteasas de las células muertas y a los problemas de plegamiento a temperaturas más altas (Hong *et al.*, 2002). Li *et al.* (2001) han demostrado que la reducción de la temperatura del proceso de inducción de 30 a 23 °C aumentó el rendimiento de las proteínas con un incremento del 29 % en la producción de proteínas recombinantes. Es posible que la adición de inhibidores de la proteasa específicos al medio de cultivo pueda mejorar la producción. Se identificaron 3 tipos de proteasas presentes en el medio de cultivo de *Pichia pastoris* que expresan scFv: aspárticas, cisteínas y serinas. Cuando se añadió un inhibidor de la serina al medio de cultivo se redujo la actividad de la proteasa un 53 %, y un 30 % con un inhibidor de la proteasa aspártica (Shi *et al.*, 2003).

Dado que el clon 1 presentó mayor reconocimiento por el pistacho en el ELISA indirecto (Figura IV.4.7) y mayor producción en el análisis de *dot blot* (Figura IV.4.5), éste fue el utilizado para la cotransformación con el plásmido pMJA180 que contiene la secuencia de la enzima biotín ligasa para biotilinar y multimerizar los dAbs. De esa cotransformación, se obtuvieron multitud de clones pero sólo 10 fueron seleccionados. Todos se analizaron por

PCR y posterior electroforesis (Figura IV.4.8) y mostraron amplificaciones del tamaño deseado. Por lo tanto, la eficiencia de la cotransformación resultó en un 100 %.

Para la selección de los mejores clones, se realizó un *dot blot* de los sobrenadantes de todos los clones obtenidos tras la cotransformación, inducidos y sin inducir. En la Figura IV.4.9 se muestran las grandes diferencias observadas entre los clones inducidos y sin inducir, así como las diferencias entre clones, ya que los clones 9 y 10 parece que han perdido el epítipo de la cola de histidinas al no observarse luminiscencia, pero sí han producido anticuerpo, porque son reconocidos por el anti-c-Myc. De todos ellos, se seleccionó el clon 5 y pasó a denominarse PVF4m5.BirA. A partir de ese momento se procedió a la inducción en un mayor volumen (500 mL) de medio de cultivo donde los dAb biotinilados se excretaban. El medio de cultivo (125 mL) se purificó a través de columna Ni-NTA con gradiente de imidazol, donde el pico se obtuvo a una concentración de 78 % de imidazol. A su vez, se determinó que la producción de *Pichia pastoris* fue realmente buena, obteniendo 21 mg de proteína (dAb) de los 125 mL, por lo que la mutagénesis podría también influir en la producción al no tener el impedimento del codón de parada.

En el *Western blot* (Figura IV.4.11) el anticuerpo anti-c-Myc-AP fue capaz de reconocer a las bandas más prominentes, al igual que el sobrenadante sin purificar. Ni en el desecho de la purificación (aquellos que no se une a la columna) ni en el sobrenadante del clon PVF4m5.BirA sin inducir, se encontró ninguna banda reconocida por el anti-c-Myc-AP. En consecuencia, el sistema empleado para la producción de proteína exógena en *Pichia pastoris* es eficiente y limpio. El reconocimiento del dAb a lo largo de todo el carril de electroforesis podría estar indicando diferentes formas de este mismo anticuerpo presentes en el medio. Es posible que esté formando dímeros y por eso aparezca de un mayor tamaño, o que se esté degradando por la presencia de proteasas en el medio de cultivo. También, la presencia de glicosilaciones en el dAb puede cambiar su estructura conformacional y por lo tanto su tamaño.

En el *immunoblot* (Figura IV.4.11B) se comprobó la producción de una gran cantidad de anticuerpo con distintos tamaños. Es posible que, a pesar de emplear el medio BMMY y conseguir mejorar la producción a 25 °C, no se esté eliminando la presencia de proteasas, aunque este medio es específico para disminuir su presencia. La adición de inhibidores de la proteasa específicos al medio de cultivo podría mejorar la producción y la integridad del anticuerpo (Shi *et al.*, 2003).

La mayor ventaja de *Pichia pastoris* para expresar proteínas heterólogas como proteínas secretadas, es que secreta niveles muy bajos de proteínas nativas. Dado que en el medio mínimo de *Pichia pastoris* hay una cantidad muy baja de proteínas, la secreción de la proteína de interés comprende la gran mayoría de la proteína total del medio y sirve como un primer paso en la purificación de la proteína (Sreekrishna *et al.*, 1997).

Sin embargo, las modificaciones postraduccionales (PTM) se producen en la gran mayoría de las proteínas y son esenciales para la función. La glicosilación es un tipo de PTM, y está implicada en el plegamiento, transporte y función de las proteínas (Hamby y Hirst, 2008). Es frecuente que *Pichia pastoris* introduzca esas modificaciones postraduccionales y si hay sitios de glicosilación reconocidos (Asn-X-Ser/Thr) en la secuencia de la proteína de interés, la glicosilación puede ocurrir en estos sitios. Diversos estudios han puesto de manifiesto efectos positivos y negativos de la glicosilación en la afinidad de los anticuerpos por los antígenos. Suelen estar presentes en alrededor del 15 % de los dominios variables. Por este motivo, se emplearon 2 programas informáticos, N-GlyDE (Pitti *et al.*, 2019) y NetNGlyc 1.0 Server, para evaluar la presencia de posibles sitios de glicosilación en el dAb PVF4. Mediante el análisis informático, se predijeron 2 sitios de glicosilación posibles, uno en el aminoácido 146 situado en CDR2 y otro en el 190 en CDR3. Ambos se encuentran en regiones importantes de reconocimiento y plegamiento de la proteína. La estructura del carbohidrato adherido a esa región puede afectar a la actividad de los anticuerpos (Wright y Morrison, 1997) impidiendo su reconocimiento o unión al antígeno. Además, la introducción de glicanos en CDR3 de la cadena pesada podría ser más perjudicial para la unión de antígenos en comparación con los otros bucles, debido a las limitaciones estéricas (Van De Bovenkamp *et al.*, 2018).

Por tanto, es necesario seguir trabajando en esta línea de investigación para mejorar los anticuerpos ya obtenidos, o modificarlos para que presenten mayor afinidad por el antígeno en la técnica de ELISA directo.

Capítulo VI

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

Primera. Se han aislado por primera vez sondas de afinidad de tipo scFv específicas frente a la nuez (*Juglans regia*), a partir de genotecas no inmunes de fago-anticuerpos recombinantes. El fago-anticuerpo JR35 se ha empleado con éxito para la detección específica de nuez en alimentos mediante una técnica inmunoenzimática de ELISA indirecto, con un LOD de 6378 mg Kg⁻¹.

Segunda. Se ha conseguido producir el scFv específico frente a nuez en forma soluble y biotinilado *in vivo* (JrBSF) en el organismo eucariota metilotrófico *Pichia pastoris*, mediante cotransformación con dos vectores de expresión. La multimerización del scFv JrBSF sobre un núcleo de ExtrAvidina-HRP, permitió desarrollar un ELISA directo que mejoró la capacidad de reconocer a la nuez, disminuyendo el LOD a 1616 mg Kg⁻¹. La aplicabilidad de este anticuerpo se ha demostrado mediante el análisis de numerosos alimentos comerciales.

Tercera. Se han aislado por primera vez sondas de afinidad específicas frente al pistacho (*Pistacia vera*) a partir de genotecas no inmunes de fago-anticuerpos recombinantes de tipo dAb. El fago-anticuerpo PVF4 se ha empleado con éxito para desarrollar una técnica de ELISA indirecto para la detección de pistacho con un LOD de 3983 mg Kg⁻¹, que no presentó reacción cruzada con el anacardo, pese a su proximidad filogenética con el pistacho. La aplicabilidad del fago-anticuerpo PVF4 en la técnica de ELISA indirecto se evaluó mediante el análisis de productos comerciales.

Cuarta. Mediante técnicas electroforéticas, cromatográficas, espectroscópicas y de ultracentrifugación, se ha determinado que los anticuerpos recombinantes scFv JrBSF y dAb PVF4 reconocen epítopos en la globulina 11S de la nuez y el pistacho, alérgenos Jug r 4 y Pis v 2 respectivamente, reconociendo en ambos casos la subunidad básica del alérgeno.

First. Walnut-specific (*Juglans regia*) scFv affinity probes have been isolated for the first time from non-immune recombinant phage display antibody libraries. The phage-antibody JR35 has been successfully used for the specific detection of walnut in food by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique with a LOD of 6378 mg Kg⁻¹.

Second. The production of *Juglans regia* Biotinylated Soluble scFv Fragments specific (JrBSF) for walnut, has been achieved *in vivo* in the methylotrophic eukaryotic organism *Pichia pastoris* after cotransformation with two expression vectors. The multimerisation of the JrBSF scFv on an ExtrAvidin-HRP core allowed the development of a direct ELISA that improved the ability to recognise walnut, decreasing the LOD to 1616 mg Kg⁻¹. The applicability of this antibody has been demonstrated by analysis of numerous commercial foods.

Third. Pistachio-specific (*Pistacia vera*) dAb affinity probes have been isolated for the first time from non-immune recombinant phage display antibody libraries. The phage-antibody PVF4 has been successfully used to develop an indirect ELISA method for the detection of pistachio with a LOD of 3983 mg Kg⁻¹, which did not cross-react with cashew, despite its phylogenetic proximity to pistachio. The applicability of the phage-antibody PVF4 in the indirect ELISA technique was evaluated by analysis of commercial products.

Fourth. Using electrophoretic, chromatographic, spectroscopic and ultracentrifugation techniques, it has been determined that the recombinant antibodies scFv JrBSF and dAb PVF4 recognise epitopes in the 11S globulin of walnut and pistachio, allergens Jug r 4 and Pis v 2 respectively, recognising in both cases the basic subunit of the allergen.

Capítulo VII

TRABAJO FUTURO

Como resultado del desarrollo de esta Tesis Doctoral es importante ampliar el número de alérgenos detectados, así como mejorar la sensibilidad y facilidad de uso de los anticuerpos recombinantes para su empleo en el análisis de matrices complejas. Para conseguir estos objetivos es muy importante la disponibilidad de repertorios de anticuerpos recombinantes de alta calidad a partir de los cuales buscar sondas específicas frente las dianas de interés mediante la tecnología de presentación en fagos. Los repertorios de que disponemos ya han sido amplificados para obtener anticuerpos recombinantes contra diferentes alérgenos, y nuevas reamplificaciones darían lugar a la degeneración del repertorio y a la pérdida de su diversidad, por lo que la probabilidad de éxito en el proceso de cribado sería remota. Por estas razones, se plantea abordar la generación de anticuerpos recombinantes mediante la construcción de repertorios de fagos recombinantes que puedan ser aplicados para el aislamiento de sondas específicas frente a otros alérgenos de interés.

Los anticuerpos policlonales de conejos han sido ampliamente utilizados para el desarrollo de técnicas inmunológicas, puesto que el conejo representa una fuente excepcional de anticuerpos de alta afinidad y especificidad. Los conejos, además de utilizar la hipermutación somática para diversificar sus genes IgH, como ocurre en humanos y ratones, utilizan un mecanismo similar a la conversión somática de genes, que implica la recombinación homóloga entre los segmentos del gen VH y los genes VDJ reordenados (Peng *et al.*, 2017; Winstead *et al.*, 1999). Teniendo en cuenta estos factores, se propone la generación de un repertorio de scFvs no inmune a partir de material genético de conejo, utilizando como fuente los órganos linfoides de conejos no inmunizados. Para ello, se obtendrá médula ósea y bazo de animales sacrificados para consumo humano en un matadero de conejos. De este modo, a partir de un número reducido de animales, se obtendrá el material genético necesario para generar un repertorio de anticuerpos recombinantes que permita la selección de anticuerpos recombinantes frente a multitud de dianas diferentes.

En la actualidad, la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS) se aplica cada vez más en diferentes campos, como la inmunología básica y aplicada. Esto incluye la secuenciación de los repertorios emparejados de cadenas pesadas y ligeras humanas, tanto de células B *naïve* como específicas de antígeno, así como de repertorios de anticuerpos o de receptores de células T. En este sentido, se utilizará la tecnología NGS para estudiar los nuevos repertorios obtenidos y evaluar su enriquecimiento en anticuerpos recombinantes específicos.

Las plataformas NGS que requieren la amplificación por PCR están inevitablemente influidas por la tasa de error innata de las polimerasas. En consecuencia, se propone el uso del dispositivo de secuenciación MinION (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido) que hace uso de la tecnología de secuenciación *Nanopore* (nanoporos embebidos en membrana) para secuenciar los repertorios generados, ya que no requiere amplificación por PCR y proporciona las mayores longitudes de lectura logradas hasta la fecha (Rouet *et al.*, 2018). Para la preparación del repertorio de secuenciación se utilizará el kit rápido de código de barras. Este kit incluye identificadores moleculares únicos (IMU), que son un tipo de código de barras molecular que permite corregir errores y aumentar la precisión durante la secuenciación. Las subpoblaciones de fagos recuperadas tras las rondas de selección se analizarán en un único experimento de secuenciación etiquetando cada muestra con un IMU que permite su estudio individualizado. Esta aproximación se empleará para validar los repertorios de fagos construidos, determinar con precisión el tamaño de los repertorios generados y evaluar su diversidad clonal.

Además, se utilizarán diferentes herramientas bioinformáticas para llevar a cabo la modelización de los anticuerpos recombinantes obtenidos y evaluar los posibles residuos de aminoácidos implicados en la unión antígeno-anticuerpo. Para ello, se emplearán herramientas que realizan la predicción de parátomos (Antibody i-Patch), la predicción de epítomos (EpiPred) o la orientación VH-VL (ABangle), entre otras. Para identificar el sitio más probable de unión del antígeno, se han diseñado programas como AutoDock4 y PepSite2, siendo este último ampliamente utilizado para predecir la unión de péptidos a la superficie de las proteínas. La herramienta más novedosa y actual que podemos emplear para la predicción de la estructura de los anticuerpos es AlphaFold, que es un sistema de inteligencia artificial desarrollado por DeepMind que predice la estructura 3D de una proteína a partir de su secuencia de aminoácidos. También existe la posibilidad del uso de métodos de *biopanning* informáticos como el banco de datos de *biopanning* (BDB), sin necesidad de llevar a cabo el proceso de selección por afinidad. El BDB almacena datos de fago-anticuerpos secuenciados por tecnologías convencionales (Sanger) y de NGS (He *et al.*, 2018). Estas tecnologías informáticas pueden suponer recursos importantes para obtener resultados acerca de posibles interacciones entre antígenos y anticuerpos sin necesidad de realizar el *biopanning* en el laboratorio.

Capítulo VIII

BIBLIOGRAFÍA

A

- Aas, K. (1978). What makes an allergen an allergen. *Allergy*, 33(1), 3-14.
<https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1978.tb01501.x>
- Abbott, M., Hayward, S., Ross, W., Godefroy, S. B., Ulberth, F., Van Hengel, A. J., Roberts, J., Akiyama, H., Popping, B., Yeung, J. M., Wehling, P., Taylor, S. L., Poms, R. E., y Delahaut, P. (2010). Validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods: Community guidance and best practices. *Journal of AOAC International*, 93(2), 442-450.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/93.2.442>
- Acevedo-Rocha, C. G., Reetz, M. T., y Nov, Y. (2015). Economical analysis of saturation mutagenesis experiments. *Scientific Reports*, 5, 1-12.
<https://doi.org/10.1038/srep10654>
- Adda, C., Anders, R., Tilley, L., y Foley, M. (2002). Random Sequence Libraries Displayed on Phage: Identification of Biologically Important Molecules. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 5(1), 1-14.
<https://doi.org/10.2174/1386207023330561>
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., y Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(12), 5301-5317.
<https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>
- Ahmad, Z. A., Yeap, S. K., Ali, A. M., Ho, W. Y., Alitheen, N. B. M., y Hamid, M. (2012). ScFv antibody: Principles and clinical application. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012.
<https://doi.org/10.1155/2012/980250>
- Ahn, K., Bardina, L., Grishina, G., Beyer, K., y Sampson, H. A. (2009). Identification of two pistachio allergens, Pis v 1 and Pis v 2, belonging to the 2S albumin and 11S globulin family. *Clinical & Experimental Allergy*, 39(6), 926-934.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03259.x>
- Allen, K. J., Remington, B. C., Baumert, J. L., Crevel, R. W. R., Houben, G. F., Brooke-Taylor, S., Kruizinga, A. G., y Taylor, S. L. (2014). Allergen reference doses for precautionary labeling (VITAL 2.0): Clinical implications. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(1), 156-164.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.06.042>
- Allen, K. J., y Taylor, S. L. (2018). The Consequences of Precautionary Allergen Labeling: Safe Haven or Unjustifiable Burden? *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 6(2), 400-407.
<https://doi.org/10.1016/j.jaip.2017.12.025>
- Álvarez-Álvarez, J., Guillamón, E., Crespo, J. F., Cuadrado, C., Burbano, C., Rodríguez, J., Fernández, C., y Muzquiz, M. (2005). Effects of extrusion, boiling, autoclaving, and microwave heating on lupine allergenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 1294-1298.
<https://doi.org/10.1021/JF0490145/ASSET/IMAGE/S/LARGE/JF0490145F00005.JPEG>
- Alves, R. C., Pimentel, F. B., Nouws, H. P. A., Correr, W., González-García, M. B., Oliveira, M. B. P. P., y Delerue-Matos, C. (2015). Detection of the peanut allergen Ara h 6 in foodstuffs using a voltammetric biosensing approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(23), 7157-7163.
<https://doi.org/10.1007/S00216-015-8879-8/FIGURES/4>
- Alves, R. C., Pimentel, F. B., Nouws, H. P. A., Marques, R. C. B., González-García, M. B., Oliveira, M. B. P. P., y Delerue-Matos, C. (2015). Detection of Ara h 1 (a major peanut allergen) in food using an electrochemical gold nanoparticle-coated screen-printed immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 64, 19-24.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.026>
- Andorf, S., Borres, M. P., Block, W., Tupa, D., Bollyky, J. B., Sampath, V., Elizur, A., Lidholm, J., Jones, J. E., Galli, S. J., Chinthrajah, R. S., y Nadeau, K. C. (2017). Association of clinical reactivity with sensitization to allergen components in multifeed-allergic children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 5(5), 1325-1334.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.jaip.2017.01.016>
- Arbabi-Ghahroudi, M. (2017). Camelid single-domain antibodies: Historical perspective and future outlook. *Frontiers in Immunology*, 8(NOV).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01589>
- Arora, S., Saxena, V., y Ayyar, B. V. (2017). Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. En *Methods* (Vol. 116, pp. 84-94). Academic Press Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2016.12.010>

- Ayyar, B. V., Arora, S., Murphy, C., y O'Kennedy, R. (2012). Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods*, *56*(2), 116-129. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2011.10.007>
- B**
- Bakshinejad, B., Zade, H. M., Shekarabi, H. S. Z., y Neman, S. (2016). Phage display biopanning and isolation of target-unrelated peptides: in search of nonspecific binders hidden in a combinatorial library. *Amino Acids*, *48*(12), 2699-2716. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2329-6>
- Ballmer-Weber, B. K., Fernández-Rivas, M., Beyer, K., Defernez, M., Sperrin, M., Mackie, A. R., Salt, L. J., Hourihane, J. O. B., Asero, R., Belohlavkova, S., Kowalski, M., De Blay, F., Papadopoulos, N. G., Clausen, M., Knulst, A. C., Roberts, G., Popov, T., Sprickelman, A. B., Dubakiene, R., ... Mills, E. N. C. (2015). How much is too much? Threshold dose distributions for 5 food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *135*(4), 964-971. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2014.10.047>
- Bandaranayake, A. D., y Almo, S. C. (2014). Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Letters*, *588*(2), 253-260. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.11.035>
- Barat, B., y Wu, A. M. (2007). Metabolic biotinylation of recombinant antibody by biotin ligase retained in the endoplasmic reticulum. *Biomolecular Engineering*, *2*(3), 283-291. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.02.003>
- Barroso, J., Halder, M., y Whelan, M. (2020). *EURL ECVAM Recommendation on Non-Animal-Derived Antibodies*. EUR 30185 EN, Publications Office of the European Union. <https://doi.org/10.2760/80554>
- Baumert, J. L., y Tran, D. H. (2015). Lateral flow devices for detecting allergens in food. En *Handbook of Food Allergen Detection and Control*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9781782420217.2.219>
- Benedé, S., López-Expósito, I., Molina, E., y López-Fandiño, R. (2015). Egg proteins as allergens and the effects of the food matrix and processing. *Food & Function*, *6*(3), 694-713. <https://doi.org/10.1039/C4FO01104J>
- Berkowitz, S. A., y Day, L. A. (1976). Mass, length, composition and structure of the filamentous bacterial virus fd. *Journal of Molecular Biology*, *102*(3), 531-547. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90332-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90332-6)
- Bertoglio, F., Meier, D., Langreder, N., Steinke, S., Rand, U., Simonelli, L., Heine, P. A., Ballmann, R., Schneider, K.-T., Roth, K. D. R., Ruschig, M., Riese, P., Eschke, K., Kim, Y., Schäckermann, D., Pedotti, M., Kuhn, P., Zock-Emmenthal, S., Wöhrle, J., ... Hust, M. (2021). SARS-CoV-2 neutralizing human recombinant antibodies selected from pre-pandemic healthy donors binding at RBD-ACE2 interface. *Nature Communications*, *12*(1), 1577. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21609-2>
- Bettazzi, F., Lucarelli, F., Palchetti, I., Berti, F., Marrazza, G., y Mascini, M. (2008). Disposable electrochemical DNA-array for PCR amplified detection of hazelnut allergens in foodstuffs. *Analytica Chimica Acta*, *614*(1), 93-102. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.03.027>
- Beyer, K., Grishina, G., Bardina, L., Grishin, A., y Sampson, H. A. (2002). Identification of an 11S globulin as a major hazelnut food allergen in hazelnut-induced systemic reactions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *110*(3), 517-523. <https://doi.org/10.1067/mai.2002.127434>
- Bischoff, S. C., y Selge, G. (2014). The Immunological Basis of IgE-Mediated Reactions. *Food Allergy: Adverse Reactions to Foods and Food Additives: Fifth Edition*, 16-30. <https://doi.org/10.1002/9781118744185.ch2>
- Bitencourt, A. L. B., Campos, R. M., Cline, E. N., Klein, W. L., y Sebollela, A. (2020). Antibody fragments as tools for elucidating structure-toxicity relationships and for diagnostic/therapeutic targeting of neurotoxic amyloid oligomers. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(23), 1-18. <https://doi.org/10.3390/ijms21238920>
- Blanc, M. R., Anouassi, A., Abed, M. A., Tsikis, G., Canepa, S., Labas, V., Belghazi, M., y Bruneau, G. (2009). A one-step exclusion-binding procedure for the purification of functional heavy-chain and mammalian-type γ -globulins from camelid sera. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *54*(4), 207-212. <https://doi.org/10.1042/ba20090208>
- Blanco, D., De Las Cuevas, N., Barranco, R., Fernández Crespo, J. F., y Dieguez, M. C. (2018). Effects of pressure and thermal processing on cashew and

- pistachio *in vitro* allergic reactivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(2), AB243.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.12.770>
- Branston, S. D., Stanley, E. C., Ward, J. M., y Keshavarz-Moore, E. (2013). Determination of the survival of bacteriophage M13 from chemical and physical challenges to assist in its sustainable bioprocessing. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18(3), 560-566.
<https://doi.org/10.1007/s12257-012-0776-9>
- Bratkovič, T. (2010). Progress in phage display: Evolution of the technique and its applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(5), 749-767. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0192-2>
- Breiteneder, H., y Ebner, C. (2000). Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(1 I), 27-36.
<https://doi.org/10.1067/mai.2000.106929>
- Breiteneder, H., y Mills, E. N. C. (2005). Plant food allergens - Structural and functional aspects of allergenicity. En *Biotechnology Advances* (Vol. 23, Número 6, pp. 395-399). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.05.004>
- Breiteneder, H., y Mills, E. N. C. (2009). Food allergens: molecular and immunological characteristics. En *Food Allergy: Adverse Reactions to Foods and Food Additives, Fourth Edition* (pp. 43-61). Blackwell Publishing Ltd.
<https://doi.org/10.1002/9781444300062.ch4>
- Breiteneder, H., y Radauer, C. (2004). A classification of plant food allergens. En *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (Vol. 113, Número 5, pp. 821-830). Mosby Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.01.779>
- Bulló, M., Juanola-Falgarona, M., Hernández-Alonso, P., y Salas-Salvadó, J. (2015). Nutrition attributes and health effects of pistachio nuts. *British Journal of Nutrition*, 113(S2), S79-S93.
<https://doi.org/10.1017/S0007114514003250>
- Burks, W., Helm, R., Stanley, S., y Bannon, G. A. (2001). Food allergens. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 1(3), 243-248.
<https://doi.org/10.1097/00130832-200106000-00008>
- Burks, W., Sampson, H. A., Plaut, M., Lack, G., y Akdis, C. A. (2018). Treatment for food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(1), 1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.004>
- C**
- Cabanillas, B., Maleki, S. J., Rodríguez, J., Burbano, C., Muzquiz, M., Jiménez, M. A., Pedrosa, M. M., Cuadrado, C., y Crespo, J. F. (2012). Heat and pressure treatments effects on peanut allergenicity. *Food Chemistry*, 132(1), 360-366.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.10.003>
- Cabanillas, B., Maleki, S. J., Rodríguez, J., Cheng, H., Teuber, S. S., Wallowitz, M. L., Muzquiz, M., Pedrosa, M. M., Linacero, R., Burbano, C., Novak, N., Cuadrado, C., y Crespo, J. F. (2014). Allergenic properties and differential response of walnut subjected to processing treatments. *Food chemistry*, 157, 141-147.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.025>
- Cerecedo, I., Zamora, J., Fox, M., Voordouw, J., Plana, N., Rokicka, E., Fernández-Rivas, M., Vázquez Cortés, S., Reche, M., Fiandor, A., Kowalski, M., Antonides, G., Mugford, M., Frewer, L. J., y de la Hoz, B. (2014). The impact of double-blind placebo- controlled food challenge (DBPCFC) on the socioeconomic cost of food allergy in Europe. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 24(6), 418-424.
- Cérutti, M., y Golay, J. (2012). Lepidopteran cells: An alternative for the production of recombinant antibodies? En *mAbs* (Vol. 4, Número 3, pp. 294-309). Taylor & Francis.
<https://doi.org/10.4161/mabs.19942>
- Ch'ng, A. C. W., Choong, Y. S., y Lim, T. S. (2016). Phage display-derived antibodies: application of recombinant antibodies for diagnostics. En *Proof and Concepts in Rapid Diagnostic Tests and Technologies*. InTech.
<https://doi.org/10.5772/63927>
- Cheng, F., Wu, J., Zhang, J., Pan, A., Quan, S., Zhang, D., Kim, H. Y., Li, X., Zhou, S., y Yang, L. (2016). Development and inter-laboratory transfer of a decaplex polymerase chain reaction assay combined with capillary electrophoresis for the simultaneous detection of ten food allergens. *Food Chemistry*, 199, 799-808.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.058>
- Cho, C. Y., Nowatzke, W., Oliver, K., y Garber, E. A. E. (2015). Multiplex detection of food allergens and gluten. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*,

- 407(14). <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8645-y>
- Christ, D., Famm, K., y Winter, G. (2006). Tapping diversity lost in transformations *in vitro* amplification of ligation reactions. *Nucleic Acids Research*, 34(16), e108-e108. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl605>
- Christ, D., Famm, K., y Winter, G. (2007). Repertoires of aggregation-resistant human antibody domains. *Protein Engineering, Design and Selection*, 20, 413-416. <https://doi.org/10.1093/protein/gzm037>
- Christopoulou, S., Karaiskou, S., y Kalogianni, D. P. (2018). Microbead-based simultaneous fluorometric detection of three nut allergens. *Microchimica Acta*, 185(1), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2559-7>
- Cloutier, S. M., Couty, S., Terskikh, A., Marguerat, L., Crivelli, V., Pugnères, M., Mani, J.-C., Leisinger, H.-J., Mach, J. P., y Deperthes, D. (2000). Streptabody, a high avidity molecule made by tetramerization of *in vivo* biotinylated, phage display-selected scFv fragments on streptavidin. *Molecular Immunology*, 37(17), 1067-1077. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00023-2](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00023-2)
- Comisión Europea. (2021). Reglamento (UE) 2021/382 de la Comisión de 3 de marzo de 2021 por el que se modifican los anexos del Reglamento (CE) n.º 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la higiene de los productos alimenticios, en lo que respecta a la gestión de. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L47/3.
- Comisión Europea. (2022). Comunicación de la Comisión sobre la aplicación de sistemas de gestión de la seguridad alimentaria que contemplan buenas prácticas de higiene y procedimientos basados en los principios del APPCC, especialmente la facilitación/flexibilidad respecto de su a. *Diario Oficial de la Unión Europea*, C355(September 16).
- Conrad, U., y Scheller, J. (2005). Considerations on antibody-phage display methodology. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 8(2), 117-126. <https://doi.org/10.2174/1386207053258532>
- Costa, J., Carrapatoso, I., Oliveira, M. B. P. P., y Mafra, I. (2014). Walnut allergens: Molecular characterization, detection and clinical relevance. *Clinical and Experimental Allergy*, 44(3), 319-341. <https://doi.org/10.1111/cea.12267>
- Costa, J., Fernandes, T. J. R., Villa, C., Oliveira, M. B. P. P., y Mafra, I. (2016). Advances in food allergen analysis. En G. Spizzirri & G. Cirillo (Eds.), *Food Safety: Innovative Analytical Tools for Safety Assessment* (pp. 305-360). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781119160588.ch9>
- Costa, J., Silva, I., Vicente, A. A., Oliveira, M. B. P. P., y Mafra, I. (2019). Pistachio nut allergy: An updated overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(4), 546-562. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1379947>
- Costa, R., Costa, J., Sagastizábal, I., Brandão, A. T. S. C., Moreira, P., Mafra, I., Silva, A. F., y Pereira, C. M. (2021). Electrochemical and optical biosensing platforms for the immunorecognition of hazelnut Cor a 14 allergen. *Food Chemistry*, 361, 130122. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130122>
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., y Higgins, D. R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, 16(1), 23-52. <https://doi.org/10.1385/MB:16:1:23>
- Crivianu-Gaita, V., y Thompson, M. (2016). Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: An overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements. *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 32-45. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.04.091>
- Cuadrado, C., Cabanillas, B., Pedrosa, M. M., Muzquiz, M., Haddad, J., Allaf, K., Rodríguez, J., Crespo, J. F., y Burbano, C. (2011). Effect of instant controlled pressure drop on ige antibody reactivity to peanut, lentil, chickpea and soybean proteins. *International Archives of Allergy and Immunology*, 156(4), 397-404. <https://doi.org/10.1159/000324443>
- Cuadrado, C., Cabanillas, B., Pedrosa, M. M., Varela, A., Guillamón, E., Muzquiz, M., Crespo, J. F., Rodríguez, J., y Burbano, C. (2009). Influence of thermal processing on IgE reactivity to lentil and chickpea proteins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(11), 1462-1468. <https://doi.org/10.1002/MNFR.200800485>
- D**
- Dalton, A. C., y Barton, W. A. (2014). Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein Science*, 23(5), 517-525. <https://doi.org/10.1002/pro.2439>

- Damasceno, L. M., Huang, C.-J., y Batt, C. A. (2012). Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *93*(1), 31-39. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3654-z>
- Dammeyer, T., Steinwand, M., Krüger, S. C., Dübel, S., Hust, M., y Timmis, K. N. (2011). Efficient production of soluble recombinant single chain Fv fragments by a *Pseudomonas putida* strain KT2440 cell factory. *Microbial Cell Factories*, *10*. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-11>
- Davies, J. M., O'Hehir, R. E., y Suphioglu, C. (2000). Use of phage display technology to investigate allergen-antibody interactions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *105*(6 II), 1085-1092. <https://doi.org/10.1067/mai.2000.107040>
- de la Cruz, S., Alcocer, M., Madrid, R., García, A., Martín, R., González, I., y García, T. (2016). Production of in vivo biotinylated scFv specific to almond (*Prunus dulcis*) proteins by recombinant *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, *227*, 112-119. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.04.024>
- de la Cruz, S., Cubillos-Zapata, C., López-Calleja, I. M., Ghosh, S., Alcocer, M., González, I., Martín, R., y García, T. (2015). Isolation of recombinant antibody fragments (scFv) by phage display technology for detection of almond allergens in food products. *Food Control*, *54*, 322-330. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.011>
- de la Cruz, S., López-Calleja, I. M., Alcocer, M., González, I., Martín, R., y García, T. (2013). Selection of recombinant antibodies by phage display technology and application for detection of allergenic Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) in processed foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, *61*(43), 10310-10319. <https://doi.org/10.1021/jf403347t>
- de la Cruz, S., López-Calleja, I., Martín, R., González, I., Alcocer, M., y García, T. (2017). Recent advances in the detection of allergens in foods. En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1592, pp. 263-295). Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6925-8_20
- de la Hoz, B. (2015). Alergia a los alimentos. En *Alergológica 2015* (pp. 206-228).
- De Martinis, M., Sirufo, M. M., Suppa, M., y Ginaldi, L. (2020). New perspectives in food allergy. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(4). <https://doi.org/10.3390/ijms21041474>
- de Silva, D., Halken, S., Singh, C., Muraro, A., Angier, E., Arasi, S., Arshad, H., Beyer, K., Boyle, R., du Toit, G., Eigenmann, P., Grimshaw, K., Hoest, A., Jones, C., Khaleva, E., Lack, G., Szajewska, H., Venter, C., Verhasselt, V., y Roberts, G. (2020). Preventing food allergy in infancy and childhood: Systematic review of randomised controlled trials. *Pediatric Allergy and Immunology*, *31*(7), 813-826. <https://doi.org/10.1111/pai.13273>
- Demain, A. L., y Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, *27*(3), 297-306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>
- Demeke, T., Lee, S. J., y Eng, M. (2022). Increasing the efficiency of canola and soybean GMO detection and quantification using multiplex droplet digital PCR. *Biology*, *11*(2). <https://doi.org/10.3390/biology11020201>
- Diao, X. (2017). An update on food allergen management and global labeling regulations. En *University of Minnesota*. University of Minnesota.
- Dreher, M. L. (2012). Pistachio nuts: composition and potential health benefits. *Nutrition Reviews*, *70*(4), 234-240. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2011.00467.x>
- Drocourt, D., Calmels, T., Reynes, J.-P., Baron, M., y Tiraby, G. (1990). Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus ble* gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. *Nucleic Acids Research*, *18*(13), 4009-4009. <https://doi.org/10.1093/nar/18.13.4009>
- DunnGalvin, A., Chan, C. H., Crevel, R., Grimshaw, K., Poms, R., Schnadt, S., Taylor, S. L., Turner, P., Allen, K. J., Austin, M., Baka, A., Baumert, J. L., Baumgartner, S., Beyer, K., Bucchini, L., Fernández-Rivas, M., Grinter, K., Houben, G. F., Hourihane, J., ... Roberts, G. (2015). Precautionary allergen labelling: perspectives from key stakeholder groups. *Allergy*, *70*(9), 1039-1051. <https://doi.org/10.1111/all.12614>

E

- EFSA. (2014). Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. En *EFSA Journal* (Vol. 12, Número 11). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3894>

- EFSA. (2017). Dietary Reference Values for nutrients Summary report. En *EFSA Supporting Publications* (Vol. 14, Número 12).
<https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.e15121>
- Ehlert, A., Demmel, A., Hupfer, C., Busch, U., y Engel, K. H. (2009). Simultaneous detection of DNA from 10 food allergens by ligation-dependent probe amplification. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 26(4), 409-418.
<https://doi.org/10.1080/02652030802593529>
- Eissa, S., L'Hocine, L., Sij, M., y Zourob, M. (2013). A graphene-based label-free voltammetric immunosensor for sensitive detection of the egg allergen ovalbumin. *Analyst*, 138(15), 4378-4384.
<https://doi.org/10.1039/c3an36883a>
- Eksi-Kocak, H., Menten-Yilmaz, O., y Boyaci, I. H. (2016). Detection of green pea adulteration in pistachio nut granules by using Raman hyperspectral imaging. *European Food Research and Technology*, 242(2), 271-277.
<https://doi.org/10.1007/s00217-015-2538-3>
- European Commission, y Joint Research Centre. (2018). EURL ECVAM status report on the development, validation and regulatory acceptance of alternative methods and approaches. En *Publications Office of the European Union*.
<https://doi.org/10.2760/818599>
- European Union. (2011). Regulation (EU) No 1169/2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Di. *Official Journal of the European Union*, L304, 18-63.
- F**
- Famm, K., Hansen, L., Christ, D., y Winter, G. (2008). Thermodynamically stable aggregation-resistant antibody domains through directed evolution. *Journal of Molecular Biology*, 376(4), 926-931.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.10.075>
- FAO. (2018). *FAOSTAT*.
<http://www.fao.org/faostat/es/#data/CC>
- FAO, WHO, y WHO/IUIS. (2020). Codex Alimentarius. Código de prácticas sobre la gestión de los alérgenos alimentarios por parte de los operadores de empresas de alimentos CXC 80-2020 Adoptado en 2020. *Codex Alimentarius*, 1-23. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/ar/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXC%2B80-2020%252FCXC_080s.pdf
- FARRP. (2021). *Thresholds for Allergenic Foods*.
<https://farrp.unl.edu/thresholds-for-allergenic-foods>
- Fernández-Robledo, J. A., y Vasta, G. R. (2010). Production of recombinant proteins from protozoan parasites. *Trends in Parasitology*, 26(5), 244-254.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.02.004>
- Fernández, L. A., Sola, I., Enjuanes, L., y De Lorenzo, V. (2000). Specific secretion of active single-chain Fv antibodies into the supernatants of *Escherichia coli* cultures by use of the hemolysin system. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11), 5024-5029.
<https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.5024-5029.2000>
- FIAB. (2016). Etiquetado Preventivo de Alérgenos (EPA): Un enfoque científico basado en la evaluación cuantitativa del riesgo. En *Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas*.
- Fierro, V., Di Girolamo, F., Marzano, V., Dahdah, L., y Mennini, M. (2017). Food labeling issues in patients with severe food allergies: Solving a hamlet-like doubt. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 17(3), 204-211.
<https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000362>
- Flajnik, M. F., Deschacht, N., y Muyldermans, S. (2011). A case of convergence: Why did a simple alternative to canonical antibodies arise in Sharks and Camels? *PLoS Biology*, 9(8), e1001120.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001120>
- Flanagan, S. (2015). Handbook of Food Allergen Detection and Control. En *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition: Number 264*. Elsevier Science and Technology.
<https://www.bookdepository.com/es/Handbook-Food-Allergen-Detection-Control-Simon-Flanagan/9781782420125>
- Ford, L. S., Taylor, S. L., Pacenza, R., Niemann, L. M., Lambrecht, D. M., y Sicherer, S. H. (2010). Food allergen advisory labeling and product

- contamination with egg, milk, and peanut. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *126*(2), 384-385. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2010.05.034>
- Freitas, M., Carvalho, A., Nouws, H. P. A., y Delerue-Matos, C. (2022). Tracking *Arachis hypogaea* Allergen in Pre-Packaged Foodstuff: A Nanodiamond-Based Electrochemical Biosensing Approach. *Biosensors*, *12*(6), 429. <https://doi.org/10.3390/bios12060429>
- Freitas, M., Nouws, H. P. A., y Delerue-Matos, C. (2021). Voltammetric immunosensor to track a major peanut allergen (Ara h 1) in food products employing quantum dot labels. *Biosensors*, *11*(11), 1-13. <https://doi.org/10.3390/bios11110426>
- Frenzel, A., Hust, M., y Schirrmann, T. (2013). Expression of recombinant antibodies. *Frontiers in Immunology*, *4*(JUL). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00217>
- G**
- Gamella, M., Bueno-Díaz, C., Ruiz-Valdepeñas Montiel, V., Povedano, E., Reviejo, A. J., Villalba, M., Campuzano, S., y Pingarrón, J. M. (2020). First electrochemical immunosensor for the rapid detection of mustard seeds in plant food extracts. *Talanta*, *219*. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2020.121247>
- García-García, A., Madrid, R., García, T., Martín, R., y González, I. (2018). Use of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for screening of wheat, barley, rye and oats in foods. *Food Control*, *84*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.037>
- García-García, A., Madrid, R., González, I., García, T., y Martín, R. (2020). A novel approach to produce phage single domain antibody fragments for the detection of gluten in foods. *Food Chemistry*, *321*, 126685. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126685>
- García-García, A., Madrid, R., Sohrabi, H., de la Cruz, S., García, T., Martín, R., y González, I. (2019). A sensitive and specific real-time PCR targeting DNA from wheat, barley and rye to track gluten contamination in marketed foods. *LWT*, *114*, 108378. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108378>
- García-Merino, A. (2011). Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. *Neurología*, *26*(5), 301-306. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2010.10.005>
- Garino, C., De Paolis, A., Coisson, J. D., Bianchi, D. M., Decastelli, L., y Arlorio, M. (2016). Sensitive and specific detection of pine nut (*Pinus spp.*) by real-time PCR in complex food products. *Food chemistry*, *194*, 980-985. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.08.114>
- Gasser, B., y Mattanovich, D. (2007). Antibody production with yeasts and filamentous fungi: On the road to large scale? *Biotechnology Letters*, *29*(2), 201-212. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9237-x>
- Geiselhart, S., Hoffmann-Sommergruber, K., y Bublin, M. (2018). Tree nut allergens. *Molecular Immunology*, *100*, 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.03.011>
- Gendel, S. M. (2012). Comparison of international food allergen labeling regulations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *63*(2), 279-285. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.04.007>
- Georgieva, Y., y Konthur, Z. (2011). Design and screening of M13 phage display cDNA libraries. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *16*(2), 1667-1681. <https://doi.org/10.3390/molecules16021667>
- Geyer, C. R., McCafferty, J., Dübel, S., Bradbury, A. R. M., y Sidhu, S. S. (2012). Recombinant antibodies and *in vitro* selection technologies. *Methods in Molecular Biology*, *901*, 11-32. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-931-0_2
- Goletz, S., Christensen, P. A., Kristensen, P., Blohm, D., Tomlinson, I., Winter, G., y Karsten, U. (2002). Selection of large diversities of antidiotypic antibody fragments by phage display. *Journal of Molecular Biology*, *315*(5), 1087-1097. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5314>
- Goli, A. H., Barzegar, M., y Sahari, M. A. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, *92*, 521-525. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.020>
- González-Fernández, Á., Bermúdez Silva, F. J., López-Hoyos, M., Cobaleda, C., Montoliu, L., Del Val, M., y Leech, K. (2020). Non-animal-derived monoclonal antibodies are not ready to substitute current hybridoma technology. *Nature Methods*, *17*(11), 1069-1070. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-00977-5>

- Gray, A. C., Bradbury, A. R. M., Knappik, A., Plückthun, A., Borrebaeck, C. A. K., y Dübel, S. (2020). Animal-derived-antibody generation faces strict reform in accordance with European Union policy on animal use. *Nature Methods*, *17*(8), 755-756. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0906-9>
- Grothaus, G. D., Bandla, M., Currier, T., Giroux, R., Jenkins, G. R., Lipp, M., Shan, G., Stave, J. W., y Pantella, V. (2006). Immunoassay as an analytical tool in agricultural biotechnology. *Journal of AOAC International*, *89*(4), 913-928. <https://doi.org/10.1093/jaoac/89.4.913>
- Guo, J. Q., You, S. Y., Li, L., Zhang, Y. Z., Huang, J. N., y Zhang, C. Y. (2003). Construction and high-level expression of a single-chain Fv antibody fragment specific for acidic isoferritin in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, *102*(2), 177-189. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00020-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00020-8)
- Gupta, R. S., Springston, E. E., Warriar, M. R., Smith, B., Kumar, R., Pongracic, J., y Holl, J. L. (2011). The prevalence, severity, and distribution of childhood food allergy in the United States. *Pediatrics*, *128*(1), e9-e17. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-0204>
- Gupta, S. K., y Shukla, P. (2017). Microbial platform technology for recombinant antibody fragment production: A review. *Critical Reviews in Microbiology*, *43*(1), 31-42. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2016.1150959>
- ## H
- Hamby, S. E., y Hirst, J. D. (2008). Prediction of glycosylation sites using random forests. *BMC Bioinformatics*, *9*(1), 500. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-500>
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hammers, C., Songa, E. B., Bendahman, N., y Hammers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, *363*(6428), 446-448. <https://doi.org/10.1038/363446a0>
- Hammers, C. M., y Stanley, J. R. (2014). Antibody phage display: Technique and applications. *Journal of Investigative Dermatology*, *134*(2), 1-5. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.521>
- Hayes, D., Angove, M. J., Tucci, J., y Dennis, C. (2015). Walnuts (*Juglans regia*) chemical composition and research in human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.760516>
- He, B., Jiang, L., Duan, Y., Chai, G., Fang, Y., Kang, J., Yu, M., Li, N., Tang, Z., Yao, P., Wu, P., Derda, R., y Huang, J. (2018). Biopanning data bank 2018: Hugging next generation phage display. *Database*, *2018*(2018), 32. <https://doi.org/10.1093/database/bay032>
- Henry, K. A., y MacKenzie, C. R. (2018). Antigen recognition by single-domain antibodies: structural latitudes and constraints. *mAbs*, *10*(6), 815-826. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1489633>
- Higgins, D. R., Busser, K., Comiskey, J., Whittier, P. S., Purcell, T. J., y Hoeffler, J. P. (1998). Small vectors for expression based on dominant drug resistance with direct multicopy selection. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *103*, 41-53. <https://doi.org/10.1385/0-89603-421-6:41/COVER/>
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, S., y Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Nature Biotechnology*, *10*, 667-674.
- Holzhauser, T. (2018). Protein or No Protein? Opportunities for DNA-Based Detection of Allergenic Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(38), 9889-9894. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03657>
- Holzhauser, T., Johnson, P., Hindley, J. P., O'Connor, G., Chan, C. H., Costa, J., Fæste, C. K., Hirst, B. J., Lambertini, F., Miani, M., Robert, M. C., Röder, M., Ronsmans, S., Bugyi, Z., Tömösközi, S., y Flanagan, S. D. (2020). Are current analytical methods suitable to verify VITAL® 2.0/3.0 allergen reference doses for EU allergens in foods? En *Food and Chemical Toxicology* (Vol. 145, p. 111709). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111709>
- Holzhauser, T., Stephan, O., y Vieths, S. (2002). Detection of potentially allergenic hazelnut (*Corylus avellana*) residues in food: A comparative study with DNA PCR-ELISA and protein sandwich-ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(21), 5808-5815. <https://doi.org/10.1021/jf025600r>
- Hong, F., Meinander, N. Q., y Jönsson, L. J. (2002). Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia*

- pastoris. *Biotechnology and Bioengineering*, 79(4), 438-449. <https://doi.org/10.1002/bit.10297>
- Hoogenboom, H. R. (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nature Biotechnology*, 23(9), 1105-1116. <https://doi.org/10.1038/nbt1126>
- Hoogenboom, H. R., y Chames, P. (2000). Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunology Today*, 21(8), 371-378. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01667-4](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01667-4)
- Hoogenboom, H. R., de Bruijne, A. P., Hufton, S. E., Hoet, R. M., Arends, J.-W., y Roovers, R. C. (1998). Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology*, 4(1), 1-20. [https://doi.org/10.1016/S1380-2933\(98\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1380-2933(98)00007-4)
- Houhoula, D., Papatheodorou, S. A., Moschou, D., Pappa, S., Tsaatazoglou, N., Koussissis, S., Tsaknis, J., Lougovois, V., Impe, J. F. M. Van, y Tsakali, E. (2019). Evaluation of a Real Time PCR assay and a ELISA method for the detection of walnuts and almonds allergen traces in food products. *Journal of Food Research*, 8(3), 71. <https://doi.org/10.5539/jfr.v8n3p71>
- I**
- Ito, M., Mizota, T., Kitaguchi, T., Ohno, K., Ohba, T., y Tanaka, M. (2018). Simultaneous detection of eight species of tree nut in foods using two tetraplex polymerase chain reaction assays. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 82(11), 1985-1991. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1497940>
- J**
- Jahic, M. (2003). Process techniques for production of recombinant proteins with *Pichia pastoris*. En *Royal Institute of Technology, Stockholm*.
- Jain, A., y Cheng, K. (2017). The principles and applications of avidin-based nanoparticles in drug delivery and diagnosis. *Journal of Controlled Release*, 245, 27-40. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.016>
- Jayasena, S., Smits, M., Fiechter, D., De Jong, A., Nordlee, J., Baumert, J., Taylor, S. L., Pieters, R. H., y Koppelman, S. J. (2015). Comparison of six commercial ELISA kits for their specificity and sensitivity in detecting different major peanut allergens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(6), 1849-1855. <https://doi.org/10.1021/jf504741t>
- Jayasena, S., Wijeratne, S. S. K., Taylor, S. L., y Baumert, J. L. (2019). Improved extraction of peanut residues from a wheat flour matrix for immunochemical detection. *Food Chemistry*, 278, 832-840. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.123>
- Jespers, L., Schon, O., Famm, K., y Winter, G. (2004). Aggregation-resistant domain antibodies selected on phage by heat denaturation. *Nature Biotechnology*, 22(9), 1161-1165. <https://doi.org/10.1038/nbt1000>
- Jespers, L., Schon, O., James, L. C., Vepintsev, D., y Winter, G. (2004). Crystal structure of HEL4, a soluble, refoldable human VH single domain with a germ-line scaffold. *Journal of Molecular Biology*, 337(4), 893-903. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.02.013>
- Johnson, P., Bessant, C., Valeria, C., Giosafatto, L., y Heick, J. (2011). Current perspectives and recommendations for the development of mass spectrometry methods for the determination of allergens in foods. *Article in Journal of AOAC International*, 94(4), 1026-1033. <https://doi.org/10.1093/jaoac/94.4.1026>
- Jones, S., y Burks, W. (2008). The Spectrum of Allergic Reactions to Foods. En D. D. Metcalfe, H. A. Sampson, & R. A. Simon (Eds.), *Food Allergy: Adverse Reactions to Foods and Food Additives* (Fourth). Wiley-Blackwell Publishing Ltd.
- K**
- Kanyavuz, A., Marey-Jarossay, A., Lacroix-Desmazes, S., y Dimitrov, J. D. (2019). Breaking the law: unconventional strategies for antibody diversification. *Nature Reviews Immunology*, 19(6), 355-368. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0126-7>
- Karlsson, F., Borrebaeck, C. A. K., Nilsson, N., y Malmberg-Hager, A. C. (2003). The mechanism of bacterial infection by filamentous phages involves molecular interactions between TolA and phage protein 3 domains. *Journal of Bacteriology*, 185(8), 2628-2634. <https://doi.org/10.1128/JB.185.8.2628-2634.2003>
- Kavita, V. (2017). DNA Biosensors-A Review. *Journal of Bioengineering & Biomedical Science*, 07(02). <https://doi.org/10.4172/2155-9538.1000222>
- Kilic, T., Philipp, P. J., Giavedoni, P., y Carrara, S. (2020). Milk allergen detection: sensitive label-

- free voltammetric immunosensor based on electropolymerization. *BioNanoScience*, 1(2), 512-522. <https://doi.org/10.1007/s12668-020-00730-4>
- Kim, E. H., y Burks, W. (2015). Immunological basis of food allergy (IgE-mediated, Non-IgE-mediated, and tolerance). *Chemical Immunology and Allergy*, 101, 8-17. <https://doi.org/10.1159/000371646>
- Kimura, M., Kamakura, T., Zhou Tao, Q., Kaneko, I., y Yamaguchi, I. (1994). Cloning of the blasticidin S deaminase gene (BSD) from *Aspergillus terreus* and its use as a selectable marker for *Schizosaccharomyces pombe* and *Pyricularia oryzae*. *MGG Molecular & General Genetics*, 242(2), 121-129. <https://doi.org/10.1007/BF00391004>
- Kipriyanov, S. M., Breitling, F., Little, M., y Dübel, S. (1995). Single-chain antibody streptavidin fusions: tetrameric bifunctional scFv-complexes with biotin binding activity and enhanced affinity to antigen. *Human antibodies and hybridomas*, 6(3), 93-101.
- Klatt, S., y Konthur, Z. (2012). Secretory signal peptide modification for optimized antibody-fragment expression-secretion in *Leishmania tarentolae*. *Microbial Cell Factories*, 11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-97>
- Köhler, G., y Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495-497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>
- Konstantinou, G. N. (2017). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1592, pp. 79-94). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6925-8_7
- Koutz, P., Davis, G. R., Stillman, C., Barringer, K., Cregg, J., y Thill, G. (1989). Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast*, 5(3), 167-177. <https://doi.org/10.1002/yea.320050306>
- Kristensen, P., y Winter, G. (1998). Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. *Folding & design*, 3(5), 321-328. [https://doi.org/10.1016/S1359-0278\(98\)00044-3](https://doi.org/10.1016/S1359-0278(98)00044-3)
- Krüger, C., Hu, Y., Pan, Q., Marcotte, H., Hultberg, A., Delwar, D., Van Dalen, P. J., Pouwels, P. H., Leer, R. J., Kelly, C. G., Van Dollenweerd, C., Ma, J. K., y Hammarström, L. (2002). In situ delivery of passive immunity by lactobacilli producing single-chain antibodies. *Nature Biotechnology*, 20(7), 702-706. <https://doi.org/10.1038/nbt0702-702>
- Kumada, Y. (2014). Site-specific immobilization of recombinant antibody fragments through material-binding peptides for the sensitive detection of antigens in enzyme immunoassays. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1844(11), 1960-1969. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2014.07.007>
- Kumar, A., y Kumar, S. (2008). Recent advances in DNA biosensors. *Sensors and transducers*, 9(25), 122-133. <https://doi.org/10.1080/03067310108044375>
- Kumar, R., Parray, H. A., Shrivastava, T., Sinha, S., y Luthra, K. (2019). Phage display antibody libraries: A robust approach for generation of recombinant human monoclonal antibodies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 907-918. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.006>
- Labuckas, D. O., Maestri, D. M., Perelló, M., Martínez, M. L., y Lamarque, A. L. (2008). Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins. *Food Chemistry*, 107(2), 607-612. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.051>
- Langjahr, P., y Sotelo, P. (2016). Present and future of therapeutic recombinant antibodies. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 14(2), 110-121. [https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2016.014\(02\)110-121](https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2016.014(02)110-121)
- Ledsgaard, L., Kilstrup, M., Karatt-Vellatt, A., McCafferty, J., y Laustsen, A. H. (2018). Basics of antibody phage display technology. *Toxins*, 10(6), 236. <https://doi.org/10.3390/toxins10060236>
- Lee, C. M. Y., Iorno, N., Sierro, F., y Christ, D. (2007). Selection of human antibody fragments by phage display. *Nature Protocols*, 2(11), 3001-3008. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.448>
- Lei, C., Qian, K., Li, T., Zhang, S., Fu, W., Ding, M., y Hu, S. (2020). Neutralization of SARS-CoV-2 spike pseudotyped virus by recombinant ACE2-Ig. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16048-4>
- Li, K., Zettlitz, K. A., Lipianskaya, J., Zhou, Y., Marks, J.

- D., Mallick, P., Reiter, R. E., Wu, A. M., y Bradbury, A. (2015). A fully human scFv phage display library for rapid antibody fragment reformatting. *Protein Engineering, Design and Selection*, 28(10), 307-315. <https://doi.org/10.1093/protein/gzv024>
- Li, R., Liu, L., Zhu, H., y Li, Z. (2018). Synthesis of gold-palladium nanowaxberries/dodecylamine-functionalized graphene quantum dots-graphene micro-aerogel for voltammetric determination of peanut allergen Ara h 1. *Analytica Chimica Acta*, 1008, 38-47. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2018.01.031>
- Li, Y., y Sousa, R. (2012). Expression and purification of *E. coli* BirA biotin ligase for *in vitro* biotinylation. *Protein Expression and Purification*, 82, 162-167. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.12.008>
- Li, Z., Xiong, F., Lin, Q., D'Anjou, M., Daugulis, A. J., Yang, D. S. C., y Hew, C. L. (2001). Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 21(3), 438-445. <https://doi.org/10.1006/prep.2001.1395>
- Lim, P. W. (2010). Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the detection of pistachio residues in processed foods. En *Dissertations, Theses, & Student Research in Food Science and Technology. University of Nebraska - Lincoln*. <https://digitalcommons.unl.edu/foodscidiss/10>
- Lin, H. Y., Huang, C. H., Park, J., Pathania, D., Castro, C. M., Fasano, A., Weissleder, R., y Lee, H. (2017). Integrated magneto-chemical sensor for on-site food allergen detection. *ACS Nano*, 11(10), 10062-10069. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b04318>
- Linacero, R., Ballesteros, I., Sanchiz, A., Prieto, N., Iniesto, E., Martinez, Y., Pedrosa, M. M., Muzquiz, M., Cabanillas, B., Rovira, M., Burbano, C., y Cuadrado, C. (2016). Detection by real time PCR of walnut allergen coding sequences in processed foods. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.132>
- Linacero, R., Sanchiz, A., Ballesteros, I., y Cuadrado, C. (2019). Application of real-time PCR for tree nut allergen detection in processed foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-17. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1557103>
- Liu, C., Chhabra, G. S., y Sathe, S. K. (2015). Pistachio (*Pistacia vera* L.) detection and quantification using a murine monoclonal antibody-based direct sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(41), 9139-9149. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03066>
- Liu, C., Chhabra, G. S., Zhao, J., Zaffran, V. D., Gupta, S. K., Roux, K. H., Gradziel, T. M., y Sathe, S. K. (2017). Comparison of laboratory-developed and commercial monoclonal antibody-based sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for almond (*Prunus dulcis*) detection and quantification. *Journal of Food Science*, 82(10), 2504-2515. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13829>
- Loh, B., Kuhn, A., y Leptihn, S. (2019). The fascinating biology behind phage display: filamentous phage assembly. *Molecular Microbiology*, 111(5), 1132-1138. <https://doi.org/10.1111/mmi.14187>
- Lonberg, N. (2008). Human Monoclonal Antibodies from Transgenic Mice. En *Handbook of experimental pharmacology* (Vol. 181, Número 181, pp. 69-97). Handb Exp Pharmacol. https://doi.org/10.1007/978-3-540-73259-4_4
- López-Calleja, I. M., Cruz, S. D. La, Pegels, N., González, I., García, T., y Martín, R. (2013). High resolution TaqMan real-time PCR approach to detect hazelnut DNA encoding for ITS rDNA in foods. *Food Chemistry*, 141(3), 1872-1880. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.05.076>
- López-Calleja, I. M., de la Cruz, S., González, I., García, T., y Martín, R. (2014). Survey of undeclared allergenic pistachio (*Pistacia vera*) in commercial foods by hydrolysis probe real-time PCR. *Food Control*, 39, 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.034>
- López-Calleja, I. M., de la Cruz, S., González, I., García, T., y Martín, R. (2015a). Development of real-time PCR assays to detect cashew (*Anacardium occidentale*) and macadamia (*Macadamia intergrifolia*) residues in market analysis of processed food products. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 233-241. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.023>
- López-Calleja, I. M., de la Cruz, S., González, I., García, T., y Martín, R. (2015b). Market analysis of food

- products for detection of allergenic walnut (*Juglans regia*) and pecan (*Carya illinoensis*) by real-time PCR. *Food chemistry*, 177, 111-119. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.017>
- López-Calleja, I. M., de la Cruz, S., Martín, R., González, I., y García, T. (2015). Duplex real-time PCR method for the detection of sesame (*Sesamum indicum*) and flaxseed (*Linum usitatissimum*) DNA in processed food products. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 32(11), 1772-1785. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1079650>
- López-Calleja, I. M., García, A., Madrid, R., García, T., Martín, R., y González, I. (2017). Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for simultaneous detection of DNA from sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy allergenic ingredients in commercial food products. *Food Control*, 71, 301-310. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.014>
- López, M. C. (2018). Food allergen labeling: A Latin American approach. *Journal of AOAC International*, 101(1), 14-16. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0382>
- López, M. S. P., Cabanillas, G. F., Castañón, M. J. L., y López-Ruiz, B. (2014). Development of a genosensor for peanut allergen ARA h 2 detection and its optimization by surface response methodology. *Biosensors and Bioelectronics*, 62, 350-356. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2014.06.065>
- Lorenz, H. M. (2002). Technology evaluation: Adalimumab, Abbott laboratories. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 4(2), 185-190. <https://europepmc.org/article/med/12044041>
- Lyons, S. A., Datema, M. R., Le, T. M., Asero, R., Barreales, L., Belohlavkova, S., de Blay, F., Clausen, M., Dubakiene, R., Fernández-Perez, C., Fritsche, P., Gislason, D., Hoffmann-Sommergruber, K., Jedrzejczak-Czechowicz, M., Jongejan, L., Kowalski, M. L., Kralimarkova, T. Z., Lidholm, J., Papadopoulos, N. G., ... Van Ree, R. (2021). Walnut allergy across europe: distribution of allergen sensitization patterns and prediction of severity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 9(1), 225-235.e10. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.08.051>
- Ma, H., y O'Kennedy, R. (2015). The purification of natural and recombinant peptide antibodies by affinity chromatographic strategies. En G. Houen (Ed.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1348, pp. 153-165). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2999-3_15
- Ma, H., y O'Kennedy, R. (2017). Recombinant antibody fragment production. *Methods*, 116, 23-33. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.11.008>
- Ma, J. K., Drake, P. M. W., y Christou, P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*, 4(10), 794-805. <https://doi.org/10.1038/nrg1177>
- Madrid, R., de la Cruz, S., García-García, A., Alcocer, M. J. C., González, I., García, T., y Martín, R. (2018). Multimeric recombinant antibody (scFv) for ELISA detection of allergenic walnut. An alternative to animal antibodies. *Journal of Food Composition and Analysis*, 67, 201-210. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.01.017>
- Madrid, R., García-García, A., González, I., Martín, R., y García, T. (2020). Phage displayed domain antibodies (dAb) for detection of allergenic pistachio proteins in foods. *Foods*, 9(9), 1230. <https://doi.org/10.3390/foods9091230>
- MAGYP. (2019). *Tendencias del Mercado Internacional, Mercado Nacional y Producción Primaria, Argentina*.
- Malabadi, R. B., Meti, N. T., Mulgund, G. S., Nataraja, K., y Vijaya Kumar, S. (2012). Recent advances in plant derived vaccine antigens against human infectious diseases. *Research in Pharmacy*, 2(2), 8-19. www.researchinpharmacy.com
- Maleki, S. J., Chung, S. Y., Champagne, E. T., y Raufman, J. P. (2000). The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(4), 763-768. <https://doi.org/10.1067/MAI.2000.109620>
- Mandrup, O. A., Friis, N. A., Lykkemark, S., Just, J., y Kristensen, P. (2013). A novel heavy domain antibody library with functionally optimized complementarity determining regions. *PLoS ONE*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076834>
- Manoutcharian, K., Perez-Garmendia, R., y Gevorkian, G. (2016). Recombinant antibody fragments for

- neurodegenerative diseases. *Current Neuropharmacology*, 15(5).
<https://doi.org/10.2174/1570159x01666160930121647>
- Mao, R., Xie, K., Zhao, M., Li, M., Lu, L., Liu, Y., Wu, Q., Chen, Y., Zhang, T., y Diao, E. (2020). Development and evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay for rapid detection of pistachio (*Pistacia vera*) in food samples. *Food Analytical Methods*, 13(3), 658-666. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01684-4>
- Mao, X., y Hua, Y. (2012). Composition, structure and functional properties of protein concentrates and isolates produced from walnut (*Juglans regia* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), 1561-1581.
<https://doi.org/10.3390/ijms13021561>
- MAPA. (2019). *Informe del consumo de alimentación en España 2019*.
<https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/panel-de-consumo-alimentario/ultimos-datos/default.aspx>
- MAPA. (2021). *Informe del consumo de alimentación en España 2020* (Vol. 7, Número 2).
- Marcus, W. D., Lindsay, S. M., y Sierks, M. R. (2006). Identification and repair of positive binding antibodies containing randomly generated amber codons from synthetic phage display libraries. *Biotechnology Progress*, 22(3), 919-922.
<https://doi.org/10.1021/bp050420y>
- McMahon, M. J., y O'Kennedy, R. (2000). Polyreactivity as an acquired artefact, rather than a physiologic property, of antibodies: Evidence that monoreactive antibodies may gain the ability to bind to multiple antigens after exposure to low pH. *Journal of Immunological Methods*, 241(1-2), 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00196-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00196-4)
- McWilliam, V., Koplin, J., Lodge, C., Tang, M., Dharmage, S., y Allen, K. (2015). The prevalence of tree nut allergy: a systematic review. *Current Allergy and Asthma Reports*, 15(9), 1-13.
<https://doi.org/10.1007/s11882-015-0555-8>
- McWilliam, V., Perrett, K. P., Dang, T., y Peters, R. L. (2020). Prevalence and natural history of tree nut allergy. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 124(5), 466-472.
<https://doi.org/10.1016/j.anai.2020.01.024>
- McWilliam, V., Peters, R., Tang, M. L. K., Dharmage, S., Ponsonby, A. L., Gurrin, L., Perrett, K., Koplin, J., Allen, K. J., Dwyer, T., Lowe, A., Wake, M., y Robertson, C. (2019). Patterns of tree nut sensitization and allergy in the first 6 years of life in a population-based cohort. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143(2), 644-650.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.07.038>
- Meima, M. Y., Remington, B. C., Blom, W. M., Baumert, J. L., Taylor, S. L., Jeffery, B., Robert, M. C., Houben, G. F., y Lucas Luijckx, N. B. (2021). Methods to determine the risk of unintended allergen presence related to the dispersion of allergenic food particles in food production areas. *Food Control*, 124(107850).
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107850>
- Menendez, A., y Scott, J. K. (2005). The nature of target-unrelated peptides recovered in the screening of phage-displayed random peptide libraries with antibodies. *Analytical Biochemistry*, 336(2), 145-157.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.09.048>
- Miersch, S., y Sidhu, S. S. (2012). Synthetic antibodies: Concepts, potential and practical considerations. *Methods*, 57(4), 486-498.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.06.012>
- Mills, E. N. C., Jenkins, J., Marigheto, N., Belton, P. S., Gunning, A. P., y Morris, V. J. (2002). Allergens of the cupin superfamily. *Biochemical Society Transactions*, 30(6), 925-929.
<https://doi.org/10.1042/bst0300925>
- Mills, E. N. C., Potts, A., Plumb, G. W., Lambert, N., y Morgan, M. R. A. (1997). Development of a rapid dipstick immunoassay for the detection of peanut contamination of food. *Food and Agricultural Immunology*, 9(1), 37-50.
<https://doi.org/10.1080/09540109709354932>
- Ministerio de la Presidencia. (2013). Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *Boletín Oficial del Estado*, 34(1), 11370-11421.
- Ministerio de la Presidencia. (2015). Real Decreto 126/2015 referente a la información alimentaria de los alimentos que se presenten sin envasar para la venta al consumidor final y a las

- colectividades, de los envasados en los lugares de venta a petición del comprador, y de los envasados por lo. *Boletín Oficial del Estado*, 54, 20059-20066.
- Misachi, J. (2018). *Top pistachio consuming countries*. World Facts.
<https://www.worldatlas.com/articles/top-pistachio-consuming-countries.html>
- Miyazaki, A., Watanabe, S., Ogata, K., Nagatomi, Y., Kokutani, R., Minegishi, Y., Tamehiro, N., Sakai, S., Adachi, R., y Hirao, T. (2019). Real-time PCR detection methods for food allergens (wheat, buckwheat, and peanuts) using reference plasmids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(19), 5680-5686.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01234>
- Monaci, L., Pilloli, R., De Angelis, E., Crespo, J. F., Novak, N., y Cabanillas, B. (2020). Food allergens: Classification, molecular properties, characterization, and detection in food sources. En *Advances in Food and Nutrition Research* (1.^a ed., Vol. 93, pp. 113-146). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2020.03.001>
- Monaci, L., y Visconti, A. (2009). Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 28(5), 581-591.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.02.013>
- Montiel, V. R. V., Torrente-Rodríguez, R. M., Rivera, G. G. de, Reviejo, A. J., Cuadrado, C., Linacero, R., Gallego, F. J., Campuzano, S., y Pingarrón, J. M. (2017). Amperometric determination of hazelnut traces by means of Express PCR coupled to magnetic beads assembled on disposable DNA sensing scaffolds. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 245, 895-902.
<https://doi.org/10.1016/J.SNB.2017.02.041>
- Moo-Huchin, V. M., Canto-Pinto, J. C., Cuevas-Glory, L. F., Sauri-Duch, E., Pérez-Pacheco, E., y Betancur-Ancona, D. (2019). Effect of extraction solvent on the phenolic compounds content and antioxidant activity of Ramon nut (*Brosimum alicastrum*). *Chemical Papers*, 73(7), 1647-1657.
<https://doi.org/10.1007/s11696-019-00716-x>
- Muraro, A., Werfel, T., Hoffmann-Sommergruber, K., Roberts, G., Beyer, K., Bindslev-Jensen, C., Cardona, V., Dubois, A., Dutoit, G., Eigenmann, P., Fernández-Rivas, M., Halcken, S., Hickstein, L., Høst, A., Knol, E., Lack, G., Marchisotto, M. J., Niggemann, B., Nwaru, B. I., ... Akdis, C. A. (2014). EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines: Diagnosis and management of food allergy. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 69(8), 1008-1025.
<https://doi.org/10.1111/all.12429>
- Mustorp, S. L., Drømtorp, S. M., y Holck, A. L. (2011). Multiplex, quantitative, ligation-dependent probe amplification for determination of allergens in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5231-5239.
<https://doi.org/10.1021/jf200545j>
- Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: Natural single-domain antibodies. *Annual Review of Biochemistry*, 82, 775-797.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>
- N**
- Narsaiah, K., Jha, S. N., Bhardwaj, R., Sharma, R., y Kumar, R. (2012). Optical biosensors for food quality and safety assurance-A review. *Journal of Food Science and Technology*, 49(4), 383-406.
<https://doi.org/10.1007/s13197-011-0437-6>
- Nelson, A. L. (2010). Antibody fragments. *mAbs*, 2(1), 77-83. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.1.10786>
- Neophytou, M., y Alcocer, M. (2017). Recombinant allergens production in yeast. En J. Lin & M. Alcocer (Eds.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1592, pp. 47-56). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6925-8_4
- New, L. S., Schreiber, A., Stahl-Zeng, J., y Liu, H. F. (2018). Simultaneous analysis of multiple allergens in food products by LC-MS/MS. *Journal of AOAC International*, 101(1), 132-145.
<https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0403>
- Niccheri, F., Real-Fernández, F., Ramazzotti, M., Lolli, F., Rossi, G., Rovero, P., y Degl'Innocenti, D. (2014). Human recombinant domain antibodies against multiple sclerosis antigenic peptide CSF114(Glc). *Journal of Molecular Recognition*, 27(10), 618-626. <https://doi.org/10.1002/jmr.2386>
- Niemann, L., Taylor, S. L., y Hefle, S. L. (2009). Detection of walnut residues in foods using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of food science*, 74(6), 51-57.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01214.x>

- Noorbakhsh, R., Mortazavi, S. A., Sankian, M., Shahidi, F., Tehrani, M., Azad, F. J., Behmanesh, F., y Varasteh, A. R. (2011). Pistachio allergy-prevalence and *in vitro* cross-reactivity with other nuts. *Allergology International*, *60*(4), 425-432. <https://doi.org/10.2332/allergolint.10-OA-0222>
- O**
- O'Callaghan, R., Bradley, R., y Paranchych, W. (1973). The effect of M13 phage infection upon the F pili of *E. coli*. *Virology*, *54*(1), 220-229. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(73\)90131-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(73)90131-1)
- Ossysek, K., Uchański, T., Kulesza, M., Bzowska, M., Klaus, T., Woś, K., Madej, M., y Bereta, J. (2015). A new expression vector facilitating production and functional analysis of scFv antibody fragments selected from Tomlinson I+J phagemid libraries. *Immunology Letters*, *167*(2), 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.07.005>
- Ozdal, T., Capanoglu, E., y Altay, F. (2013). A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, *51*(2), 954-970. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009>
- P**
- Padiolleau-Lefèvre, S., Débat, H., Phichith, D., Thomas, D., Friboulet, A., y Avalue, B. (2006). Expression of a functional scFv fragment of an anti-idiotypic antibody with a β -lactam hydrolytic activity. *Immunology Letters*, *103*(1), 39-44. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2005.10.010>
- Pande, J., Szewczyk, M. M., y Grover, A. K. (2010). Phage display: Concept, innovations, applications and future. *Biotechnology Advances*, *28*(6), 849-858. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.004>
- Parlamento Europeo. (2010). Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. *D.O.U.E., L 276*(20 de octubre de 2010), 33-79.
- Parmley, S. F., y Smith, G. P. (1988). Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*, *73*(2), 305-318. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90495-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90495-7)
- Pastorello, E. A., Farioli, L., Pravettoni, V., Robino, A. M., Scibilia, J., Fortunato, D., Conti, A., Borgonovo, L., Bengtsson, A., y Ortolani, C. (2004). Lipid transfer protein and vicilin are important walnut allergens in patients not allergic to pollen. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *114*(4), 908-914. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2004.06.020>
- Peng, H., Nerreter, T., Chang, J., Qi, J., Li, X., Karunadharm, P., Martinez, G. J., Fallahi, M., Soden, J., Freeth, J., Beerli, R. R., Grawunder, U., Hudecek, M., y Rader, C. (2017). Mining naïve rabbit antibody repertoires by phage display for monoclonal antibodies of therapeutic utility. *Journal of Molecular Biology*, *429*(19), 2954-2973. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.08.003>
- Pereira-Barros, M. A., Barroso, M. F., Martín-Pedraza, L., Vargas, E., Benedé, S., Villalba, M., Rocha, J. M., Campuzano, S., y Pingarrón, J. M. (2019). Direct PCR-free electrochemical biosensing of plant-food derived nucleic acids in genomic DNA extracts. Application to the determination of the key allergen Sola I 7 in tomato seeds. *Biosensors and Bioelectronics*, *137*(March), 171-177. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.05.011>
- Perner, S. P., Heupel, L., Zimmermann, L., Peters, Y., Vongehr, K. U., El-Bedewy, H., Siebeneicher, S., WEIB, T., Hektor, T., Lindemann, B., Loos-Theisen, S., y Schneider, K. (2019). Investigation of reduced ELISA recovery of almond and hazelnut traces from roasted nut samples by SDS-PAGE and mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, *102*(5), 1271-1279. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0055>
- Perry, T. T., Matsui, E. C., Conover-Walker, M. K., y Wood, R. A. (2004). Risk of oral food challenges. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *114*(5), 1164-1168. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.07.063>
- Pitti, T., Chen, C. T., Lin, H. N., Choong, W. K., Hsu, W. L., y Sung, T. Y. (2019). N-GlyDE: a two-stage N-linked glycosylation site prediction incorporating gapped dipeptides and pattern-based encoding. *Scientific Reports*, *9*(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52341-z>
- Poms, R. E., Klein, C. L., y Anklam, E. (2004). Methods for allergen analysis in food: A review. En *Food Additives and Contaminants* (Vol. 21, Número 1). <https://doi.org/10.1080/02652030310001620423>
- Popping, B., Diaz-Amigo, C., y Hoenicke, K. (2010). Molecular biological and immunological

- techniques and applications for food chemists. En *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists*. John Wiley & Sons, Inc.
<https://doi.org/10.1002/9780470637685>
- Prado, M., Ortea, I., Vial, S., Rivas, J., Calo-Mata, P., y Barros-Velázquez, J. (2016). Advanced DNA- and protein-based methods for the detection and investigation of food allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*(15), 2511-2542.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2013.873767>
- Q**
- Qi, H., Lu, H., Qiu, H.-J., Petrenko, V., y Liu, A. (2012). Phagemid vectors for phage display: Properties, characteristics and construction. *Journal of Molecular Biology*, *417*(3), 129-143.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.038>
- R**
- Rajput, R., Khanna, M., y Pradhan, H. K. (2014). Phage-display technology for the production of recombinant monoclonal antibodies. *Materials and Methods*, *4*.
<https://doi.org/10.13070/mm.en.4.873>
- Rakonjac, J., Feng, J. nong, y Model, P. (1999). Filamentous phage are released from the bacterial membrane by a two-step mechanism involving a short C-terminal fragment of pIII. *Journal of Molecular Biology*, *289*(5), 1253-1265.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2851>
- Rangsithienchai, P., Zhuang, Y., Hansen, K., y Dreskin, S. C. (2013). Determining the most potent allergens of walnut. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *131*(2), AB18.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.12.744>
- Rasched, I., y Oberer, E. (1986). Ff coliphages: structural and functional relationships. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *50*(4).
- Remington, B. C., Westerhout, J., Meima, M. Y., Blom, W. M., Kruizinga, A. G., Wheeler, M. W., Taylor, S. L., Houben, G. F., y Baumert, J. L. (2020). Updated population minimal eliciting dose distributions for use in risk assessment of 14 priority food allergens. *Food and Chemical Toxicology*, *139*, 111259.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111259>
- Ren, W., Sun, H., Gao, G. F., Chen, J., Sun, S., Zhao, R., Gao, G., Hu, Y., Zhao, G., Chen, Y., Jin, X., Fang, F., Chen, J., Wang, Q., Gong, S., Gao, W., Sun, Y., Su, J., He, A., ... Sun, L. (2020). Recombinant SARS-CoV-2 spike S1-Fc fusion protein induced high levels of neutralizing responses in nonhuman primates. *Vaccine*, *38*(35), 5653-5658.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.06.066>
- Renz, H., Allen, K. J., Sicherer, S. H., Sampson, H. A., Lack, G., Beyer, K., y Oettgen, H. C. (2018). Food allergy. *Nature Reviews Disease Primers*, *4*.
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.98>
- Rippmann, J. F., Klein, M., Hoischen, C., Brocks, B., Rettig, W. J., Gumpert, J., Pfizenmaier, K., Mattes, R., y Moosmayer, D. (1998). Prokaryotic expression of single-chain variable-fragment (scFv) antibodies: Secretion in L-form cells of *Proteus mirabilis* leads to active product and overcomes the limitations of periplasmic expression in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(12), 4862-4869.
<https://doi.org/10.1128/aem.64.12.4862-4869.1998>
- Robotham, J. M., Hoffman, G. G., Teuber, S. S., Beyer, K., Sampson, H. A., Sathe, S. K., y Roux, K. H. (2009). Linear IgE-epitope mapping and comparative structural homology modeling of hazelnut and English walnut 11S globulins. *Molecular Immunology*, *46*(15), 2975-2984.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.06.020>
- Robotham, J. M., Wang, F., Seamon, V., Teuber, S. S., Sathe, S. K., Sampson, H. A., Beyer, K., Seavy, M., y Roux, K. H. (2005). Ana o 3, an important cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) allergen of the 2S albumin family. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *115*(6), 1284-1290.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.02.028>
- Rock, C. L., Flatt, S. W., Barkai, H.-S., Pakiz, B., y Heath, D. D. (2017). Walnut consumption in a weight reduction intervention: effects on body weight, biological measures, blood pressure and satiety. *Nutrition Journal*, *16*(1), 76.
<https://doi.org/10.1186/s12937-017-0304-z>
- Rona, R. J., Keil, T., Summers, C., Gislason, D., Zuidmeer, L., Sodergren, E., Sigurdardottir, S. T., Lindner, T., Goldhahn, K., Dahlstrom, J., McBride, D., y Madsen, C. (2007). The prevalence of food allergy: A meta-analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *120*(3), 638-646.
<https://doi.org/10.1016/J.JACI.2007.05.026>

- Ros, E. (2010). Health benefits of nut consumption. *Nutrients*, 2(7), 652-682. <https://doi.org/10.3390/nu2070652>
- Rouet, R., Jackson, K. J. L., Langley, D. B., y Christ, D. (2018). Next-generation sequencing of antibody display repertoires. *Frontiers in Immunology*, 9(FEB), 118. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00118>
- Roux, K. H., Teuber, S. S., y Sathe, S. K. (2003). Tree nut allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*, 131(4), 234-244. <https://doi.org/10.1159/000072135>
- Ruiz-Valdepeñas Montiel, V., Pellicanò, A., Campuzano, S., Torrente-Rodríguez, R. M., Reviejo, Á. J., Cosío, M. S., y Pingarrón, J. M. (2016). Electrochemical detection of peanuts at trace levels in foods using a magnetoimmunosensor for the allergenic protein Ara h 2. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 236, 825-833. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.123>
- Russell, W. M. S., y Burch, R. L. (1960). The Principles of Humane Experimental Technique. En *Medical Journal of Australia* (Vol. 1, Número 13). Methuen. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x>
- S**
- Salvo-Romero, E., Alonso-Cotoner, C., Pardo-Camacho, C., Casado-Bedmar, M., y Vicario, M. (2015). The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 107(11), 686-696. <https://doi.org/10.17235/reed.2015.3846/2015>
- Sampson, H. A., Aceves, S., Bock, S. A., James, J., Jones, S., Lang, D., Nadeau, K., Nowak-Wegrzyn, A., Oppenheimer, J., Perry, T. T., Randolph, C., Sicherer, S. H., Simon, R. A., Vickery, B. P., Wood, R., Bernstein, D., Blessing-Moore, J., Khan, D., Nicklas, R., ... Wallace, D. (2014). Food allergy: A practice parameter update - 2014. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(5), 1016-1025.e43. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.05.013>
- Sanchiz, Á., Ballesteros, I., Marqués, E., Dieguez, M. C., Rueda, J., Cuadrado, C., y Linacero, R. (2018). Evaluation of locked nucleic acid and TaqMan probes for specific detection of cashew nut in processed food by real time PCR. *Food Control*, 89, 227-234. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2018.02.021>
- Sanchiz, Á., Ballesteros, I., Martín, A., Rueda, J., Pedrosa, M. M., Dieguez, M. del C., Rovira, M., Cuadrado, C., y Linacero, R. (2017). Detection of pistachio allergen coding sequences in food products: A comparison of two real time PCR approaches. *Food Control*, 75, 262-270. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.015>
- Sanchiz, Á., Cuadrado, C., Dieguez, M. C., Ballesteros, I., Rodríguez, J., Crespo, J. F., Cuevas, N. de las, Rueda, J., Linacero, R., Cabanillas, B., y Novak, N. (2018). Thermal processing effects on the IgE-reactivity of cashew and pistachio. *Food Chemistry*, 245, 595-602. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.132>
- Sanchiz, Á., Sánchez-Enciso, P., Cuadrado, C., y Linacero, R. (2021). Detection of peanut allergen by real-time PCR: Looking for a suitable detection marker as affected by processing. *Foods*, 10(6), 1-15. <https://doi.org/10.3390/foods10061421>
- Schmitt, D. A., Nesbit, J. B., Hurlburt, B. K., Cheng, H., y Maleki, S. J. (2010). Processing can alter the properties of peanut extract preparations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 1138-1143. https://doi.org/10.1021/JF902694J/ASSET/IMAGE_S/LARGE/JF-2009-02694J_0004.JPEG
- Schofield, D. J., Pope, A. R., Clementel, V., Buckell, J., Chapple, S. D. J., Clarke, K. F., Conquer, J. S., Crofts, A. M., Crowther, S. R. E., Dyson, M. R., Flack, G., Griffin, G. J., Hooks, Y., Howat, W. J., Kolb-Kokocinski, A., Kunze, S., Martin, C. D., Maslen, G. L., Mitchell, J. N., ... McCafferty, J. (2007). Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization. *Genome biology*, 8(11). <https://doi.org/10.1186/GB-2007-8-11-R254>
- Schöringhumer, K., Redl, G., y Cichna-Markl, M. (2009). Development and validation of a duplex real-time PCR method to simultaneously detect potentially allergenic sesame and hazelnut in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2126-2134. <https://doi.org/10.1021/jf8033336>
- Schouten, J. P., McElgunn, C. J., Waaijjer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., y Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe

- amplification. *Nucleic acids research*, 30(12), e57.
<https://doi.org/10.1093/nar/gnf056>
- Schubert-Ullrich, P., Rudolf, J., Ansari, P., Galler, B., Führer, M., Molinelli, A., y Baumgartner, S. (2009). Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: An overview. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(1), 69-81.
<https://doi.org/10.1007/s00216-009-2715-y>
- Sedykh, S., Prinz, V., Buneva, V., y Nevinsky, G. (2018). Bispecific antibodies: design, therapy, perspectives. *Drug Design, Development and Therapy, Volume 12*, 195-208.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S151282>
- SEI. (2020). *Anticuerpos monoclonales sin el empleo de modelos animales*. 31/05/2020.
<https://www.inmunologia.org/index.php/noticias/224-31-05-2020-documento-sei-anticuerpos-monoclonales-sin-el-empleo-de-modelos-animales>
- Sellge, G., Schnupf, P., y Sansonetti, P. J. (2010). Anatomy of the gut barrier and establishment of intestinal homeostasis. En Sansonetti PJ (Ed.), *Bacterial Virulence: Basic Principles, Models and Global Approaches*. Wiley Online Library (Wiley-BLac). <https://scihub.st/https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9783527629664#page=225>
- Sena-Torralba, A., Pallás-Tamarit, Y., Morais, S., y Maquieira, Á. (2020). Recent advances and challenges in food-borne allergen detection. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 132.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116050>
- Sharma, G. M., Khuda, S. E., Parker, C. H., Eischeid, A. C., y Pereira, M. (2016). Detection of allergen markers in food: Analytical methods. *Food Safety: Innovative Analytical Tools for Safety Assessment*, 65-121.
<https://doi.org/10.1002/9781119160588.ch4>
- Shewry, P. R., Jenkins, J. A., Beaudoin, F., y Mills, E. N. C. (2003). The classification, functions and evolutionary relationships of plant proteins in relation to food allergies. *Plant Food Allergens*, 24-41.
<https://doi.org/10.1002/9780470995174.ch2>
- Shi, X., Karkut, T., Chamankhah, M., Alting-Mees, M., Hemmingsen, S. M., y Hegedus, D. (2003). Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 28(2), 321-330.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12699697>
- Shim, H. (2017). Antibody phage display. En *Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp. 21-34).
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-72077-7>
- Sicherer, S. H., y Sampson, H. A. (2014). Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. En *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (Vol. 133, Número 2). Mosby Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.11.020>
- Sicherer, S. H., y Sampson, H. A. (2018). Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(1), 41-58.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.003>
- Sidhu, S. S. (2001). Engineering M13 for phage display. *Biomolecular Engineering*, 18(2), 57-63.
[https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(01\)00087-9](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(01)00087-9)
- Singaravelan, B., Roshini, B. R., y Hussain Munavar, M. (2010). Evidence that the supE44 mutation of *Escherichia coli* is an amber suppressor allele of glnX and that it also suppresses ochre and opal nonsense mutations. *Journal of Bacteriology*, 192(22), 6039-6044.
<https://doi.org/10.1128/JB.00474-10>
- Skerra, A., y Plückthun, A. (1988). Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science*, 240(4855), 1038-1041.
<https://doi.org/10.1126/science.3285470>
- Smith, G. P., y Petrenko, V. A. (1997). Phage display. *Chemical Reviews*, 97(2), 391-410.
<https://doi.org/10.1021/cr960065d>
- Sreekrishna, K., Brankamp, R. G., Kropp, K. E., Blankenship, D. T., Tsay, J. T., Smith, P. L., Wierschke, J. D., Subramaniam, A., y Birkenberger, L. A. (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 190(1), 55-62. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00672-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00672-5)
- Sridharan, H., SundarRaj, S., Desai, P., y Karuppuchamy, T. (2020). *Specific and neutralizing recombinant antibodies to SARS-CoV-2*. ThermoFisher. Behind The Bench Staff.
<https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/specific-and-neutralizing-recombinant->

- antibodies-to-sars-cov-2/
Ståhl, S., Kronqvist, N., Jonsson, A., y Löfblom, J. (2013). Affinity proteins and their generation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(1), 25-38. <https://doi.org/10.1002/jctb.3929>
- Stone, K. D., Prussin, C., y Metcalfe, D. D. (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S73-S80. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.11.017>
- Sue, M. J., Yeap, S. K., Omar, A. R., y Tan, S. W. (2014). Application of PCR-ELISA in molecular diagnosis. En *BioMed Research International* (Vol. 2014). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2014/653014>
- Sun, X., Guan, L., Shan, X., Zhang, Y., y Li, Z. (2012). Electrochemical detection of peanut allergen Ara h 1 using a sensitive DNA biosensor based on stem-loop probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(44), 10979-10984. <https://doi.org/10.1021/jf3027233>
- Sze-Tao, K. W. C., y Sathe, S. K. (2000). Walnuts (*Juglans regia* L): proximate composition, protein solubility, protein amino acid composition and protein *in vitro* digestibility. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(9), 1393-1401. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200007\)80:9<1393::AID-JSFA653>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200007)80:9<1393::AID-JSFA653>3.0.CO;2-F)
- T**
- Tang, Y., Zeng, X., y Liang, J. (2010). Surface plasmon resonance: An introduction to a surface spectroscopy technique. *Journal of Chemical Education*, 87(7), 742-746. <https://doi.org/10.1021/ed100186y>
- Tannenbaum, J., y Bennett, B. T. (2015). Russell and Burch's 3Rs then and now: The need for clarity in definition and purpose. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 54(2), 120-132. <https://doi.org/10.1002/lab.120>
- Tawde, P. D. (2004). Allergenic cross-reactivity between cashew and pistachio nuts. [Florida State University]. En *Florida State University Libraries*. http://purl.flvc.org/fsu/fd/FSU_migr_etd-0358
- Taylor-Black, S., y Wang, J. (2012). The prevalence and characteristics of food allergy in urban minority children. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 109(6), 431-437. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2012.09.012>
- Taylor, S. L., y Baumert, J. L. (2015). Worldwide food allergy labeling and detection of allergens in processed foods. *Chemical Immunology and Allergy*, 101, 227-234. <https://doi.org/10.1159/000373910>
- Taylor, S. L., Baumert, J. L., Kruijzinga, A. G., Remington, B. C., Crevel, R. W. R., Brooke-Taylor, S., Allen, K. J., y Houben, G. (2014). Establishment of Reference Doses for residues of allergenic foods: Report of the VITAL Expert Panel. *Food and Chemical Toxicology*, 63, 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.032>
- Taylor, S. L., y Hefle, S. L. (2006). Food allergen labeling in the USA and Europe. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 6(3), 186-190. <https://doi.org/10.1097/01.all.0000225158.75521.ad>
- Taylor, S. L., Nordlee, J. A., Niemann, L. M., y Lambrecht, D. M. (2009). Allergen immunoassays - considerations for use of naturally incurred standards. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395(1), 83-92. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2944-0>
- Teuber, S. S., Comstock, S. S., Sathe, S. K., y Roux, K. H. (2003). Tree nut allergy. *Current Allergy and Asthma Reports* 2003 3:1, 3(1), 54-61. <https://doi.org/10.1007/S11882-003-0013-X>
- Teuber, S. S., Jarvis, K. C., Dandekar, A. M., Peterson, W. R., y Ansari, A. A. (1999). Identification and cloning of a complementary DNA encoding a vicilin-like proprotein, Jug r 2, from English walnut kernel (*Juglans regia*), a major food allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104(6), 1311-1320. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(99\)70029-1](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(99)70029-1)
- Thomas, W. D., y Smith, G. P. (2010). The case for trypsin release of affinity-selected phages. *BioTechniques*, 49(3), 651-654. <https://doi.org/10.2144/000113489>
- Todorova-Balvay, D., Pitiot, O., Bourhim, M., Srikrishnan, T., y Vijayalakshmi, M. (2004). Immobilized metal-ion affinity chromatography of human antibodies and their proteolytic fragments. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 808(1), 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.05.034>

- Tolner, B., Bhavsar, G., Foster, B., Vigor, K., y Chester, K. (2013). Production of recombinant proteins from *Pichia pastoris*: Interfacing fermentation and immobilized metal ion Affinity chromatography. En *Laboratory Protocols in Fungal Biology* (pp. 407-420). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2356-0>
- Tomaino, A., Martorana, M., Arcoraci, T., Monteleone, D., Giovinazzo, C., y Saija, A. (2010). Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera L.*, variety Bronte) seeds and skins. *Biochimie*, 92, 1115-1122. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.03.027>
- Tomlinson, I. M., Walter, G., Marks, J. D., Llewelyn, M. B., y Winter, G. (1992). The repertoire of human germline vH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops. *Journal of Molecular Biology*, 227(3), 776-798. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90223-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90223-7)
- Toricelli, M., Pierboni, E., Rondini, C., Altissimi, S., y Haouet, N. (2020). Sesame, pistachio, and macadamia nut: Development and validation of new allergenic systems for fast real-time PCR application. *Foods*, 9(8), 1085. <https://doi.org/10.3390/foods9081085>
- Trashin, S., deJong, M., Breugelmans, T., Pilehvar, S., y DeWael, K. (2015). Label-free impedance aptasensor for major peanut allergen ara h 1. *Electroanalysis*, 27(1), 32-37. <https://doi.org/10.1002/elan.201400365>
- U**
- Ueberham, E., Spiegel, H., Havenith, H., Rautenberger, P., Lidzba, N., Schillberg, S., y Lehmann, J. (2019). Simplified tracking of a soy allergen in processed food using a monoclonal antibody-based sandwich ELISA targeting the soybean 2S albumin Gly m 8. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(31), 8660-8667. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02717>
- Untersmayr, E., y Jensen-Jarolim, E. (2006). The effect of gastric digestion on food allergy. En *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* (Vol. 6). Lippincott Williams & Wilkins.
- Uotila, R., Kukkonen, A. K., Pelkonen, A. S., y Mäkelä, M. J. (2016). Cross-sensitization profiles of edible nuts in a birch-endemic area. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 71(4), 514-521. <https://doi.org/10.1111/all.12826>
- Uzzaman, A., y Komarow, H. D. (2014). The immunological basis of non-IgE-mediated reactions. En *Food Allergy: Adverse Reactions to Foods and Food Additives: Fifth Edition* (pp. 31-46). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118744185.ch3>
- V**
- Vakz, L., y Benhar, I. (2014). Production of stabilized scFv antibody fragments in the *E. coli* bacterial cytoplasm. En M. Steinitz (Ed.), *Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols* (Vol. 1060, pp. 171-184). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-586-6>
- Van De Bovenkamp, F. S., Derksen, N. I. L., Ooijevaar-de Heer, P., Van Schie, K. A., Kruithof, S., Berkowska, M. A., Ellen van der Schoot, C., IJspeert, H., Van Der Burg, M., Gils, A., Hafkenscheid, L., Toes, R. E. M., Rombouts, Y., Plomp, R., Wuhrer, M., Marieke van Ham, S., Vidarsson, G., y Rispens, T. (2018). Adaptive antibody diversification through N-linked glycosylation of the immunoglobulin variable region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(8), 1901-1906. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711720115>
- Van der Valk, J. P. M., Bouche, R. el, Gerth van Wijk, R., De Groot, H., Wichers, H. J., Dubois, A. E. J., y De Jong, N. W. (2017). Low percentage of clinically relevant pistachio nut and mango co-sensitisation in cashew nut sensitised children. *Clinical and Translational Allergy*, 7(1), 1-5. <https://doi.org/10.1186/s13601-017-0145-z>
- Vary, P. S. (1994). Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology*, 140(5), 1001-1013. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-5-1001>
- Verhoeckx, K. C. M., Vissers, Y. M., Baumert, J. L., Faludi, R., Feys, M., Flanagan, S., Herouet-Guicheney, C., Holzhauser, T., Shimojo, R., van der Bolt, N., Wichers, H., y Kimber, I. (2015). Food processing and allergenicity. *Food and Chemical Toxicology*, 80, 223-240. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.03.005>
- Vicente, F., Sanchiz, A., Rodríguez-Pérez, R., Pedrosa, M., Quirce, S., Haddad, J., Besombes, C., Linacero, R., Allaf, K., y Cuadrado, C. (2020). Influence of instant controlled pressure drop

- (DIC) on allergenic potential of tree nuts. *Molecules*, 25(7).
<https://doi.org/10.3390/molecules25071742>
- Vieira, J., y Messing, J. (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in Enzymology*, 153, 3-11. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)53044-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)53044-0)
- W**
- Wallowitz, M., Peterson, W. R., Uratsu, S., Comstock, S. S., Dandekar, A. M., y Teuber, S. S. (2006). Jug r 4, a legumin group food allergen from walnut (*Juglans regia* Cv. Chandler). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 8369-8375. <https://doi.org/10.1021/jf061329s>
- Walsh, K. P., y Mills, K. H. G. (2013). Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. En *Trends in Immunology* (Vol. 34, Número 11, pp. 521-530). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.07.006>
- Wambre, E., Bajzik, V., DeLong, J. H., O'Brien, K., Nguyen, Q. A., Speake, C., Gersuk, V. H., DeBerg, H. A., Whalen, E., Ni, C., Farrington, M., Jeong, D., Robinson, D., Linsley, P. S., Vickery, B. P., y Kwok, W. W. (2017). A phenotypically and functionally distinct human TH2 cell subpopulation is associated with allergic disorders. *Science Translational Medicine*, 9(401).
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aam9171>
- Wang, F., Robotham, J. M., Teuber, S. S., Sathe, S. K., y Roux, K. H. (2003). Ana o 2, a major cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut allergen of the legumin family. *International Archives of Allergy and Immunology*, 132(1), 27-39.
<https://doi.org/10.1159/000073262>
- Wang, H., Li, G., Wu, Y., Yuan, F., y Chen, Y. (2014). Development of an indirect competitive immunoassay for walnut protein component in food. *Food chemistry*, 147, 106-110.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.013>
- Weinberger, T., y Sicherer, S. (2018). Current perspectives on tree nut allergy: A review. *Journal of Asthma and Allergy*, 11, 41-51.
<https://doi.org/10.2147/JAA.S141636>
- Weisser, N. E., y Hall, J. C. (2009). Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnology Advances*, 27(4), 502-520.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.004>
- Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., Cauerhff, A., Danquah, W., Rissiek, B., Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Boyer, O., Seman, M., Licea, A., Serreze, D. V., Goldbaum, F. A., Haag, F., y Koch-Nolte, F. (2009). Single domain antibodies: Promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medical Microbiology and Immunology*, 198(3), 157-174.
<https://doi.org/10.1007/s00430-009-0116-7>
- Whyteside, G., Nor, R. M., Alcocer, M. J. C., y Archer, D. B. (2011). Activation of the unfolded protein response in *Pichia pastoris* requires splicing of a *HAC1* mRNA intron and retention of the C-terminal tail of Hac1p. *FEBS Letters*, 585(7), 1037-1041.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.02.036>
- Willison, L. N., Tawde, P., Robotham, J. M., Penney, R. M., Teuber, S. S., Sathe, S. K., y Roux, K. H. (2008). Pistachio vicilin, Pis v 3, is immunoglobulin E-reactive and cross-reacts with the homologous cashew allergen, Ana o 1. *Clinical & Experimental Allergy*, 38(7), 1229-1238.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.02998.x>
- Wiltschi, B. (2016). Incorporation of non-canonical amino acids into proteins in yeast. *Fungal Genetics and Biology*, 89, 137-156.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.02.002>
- Winstead, C. R., Zhai, S. K., Sethupathi, P., y Knight, K. L. (1999). Antigen-induced somatic diversification of rabbit IgH genes: gene conversion and point mutation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(11), 6602-6612.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10352277>
- Wright, A., y Morrison, S. L. (1997). Effect of glycosylation on antibody function: Implications for genetic engineering. *Trends in Biotechnology*, 15(1), 26-32. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(96\)10062-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(96)10062-7)
- Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1393-1398.
<https://doi.org/10.1038/nbt1026>
- X**
- Xu, J., Ye, Y., Ji, J., Sun, J., y Sun, X. (2022). Advances on the rapid and multiplex detection methods of food allergens. *Critical Reviews in Food Science*

and *Nutrition*, 62(25), 6887-6907.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1907736>

Y

Young, T. S., Ahmad, I., Brock, A., y Schultz, P. G.

(2009). Expanding the genetic repertoire of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.

Biochemistry, 48(12), 2643-2653.

<https://doi.org/10.1021/bi802178k>

Young, T. S., y Schultz, P. G. (2010). Beyond the

canonical 20 amino acids: Expanding the genetic lexicon. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), 11039-11044.

<https://doi.org/10.1074/jbc.R109.091306>

Yuan, D., Kong, J., Fang, X., y Chen, Q. (2019). A

graphene oxide-based paper chip integrated with the hybridization chain reaction for peanut and soybean allergen gene detection. *Talanta*, 196, 64-70.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.12.036>

Z

Zuidmeer, L., Goldhahn, K., Rona, R. J., Gislason, D.,

Madsen, C., Summers, C., Sodergren, E.,

Dahlstrom, J., Lindner, T., Sigurdardottir, S. T.,

McBride, D., y Keil, T. (2008). The prevalence of plant food allergies: A systematic review. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(5), 1210-1218.e4.

<https://doi.org/10.1016/J.JACI.2008.02.019>

Anexo I

**OTRAS PUBLICACIONES
DERIVADAS DE LA
TESIS DOCTORAL**

Chapter 9

Detection of Food Allergens by Phage-Displayed Produced Antibodies

Raquel Madrid, Silvia de la Cruz, Aina García, Rosario Martín, Isabel González, and Teresa García

Abstract

Phage display is a powerful tool to produce recombinant antibodies against a given antigen without animal immunization. This technology employs libraries of recombinant bacteriophages that display billions of different functional antibody fragments on their surface. They are selected by panning in vitro against the target antigen in search for specific binders. In this chapter, we describe the selection of single chain variable fragment (scFv) antibodies to be used for detection of allergenic proteins from nuts in food products. The artificial libraries TomLinson I+J (MRC Laboratory of Molecular Biology and MRC Centre for Protein Engineering) were employed that resulted in successful phage-ELISA systems for detection of almond and walnut proteins in commercial food products.

Key words Phage display, scFv, Biopanning, Allergen, ELISA

1 Introduction

Immunoassays used to detect allergenic ingredients in foodstuffs generally depend on the availability of antibodies raised in animals. However, current trends toward the replacement of live animals in procedures aim for alternatives not entailing their use, as an attempt to enforce the Three Rs principle [1].

Phage display technology relies on the expression of billions of different peptides or antibody fragments on the surface of filamentous phages [2, 3]. Best phage binders are selected by an in vitro selection procedure called biopanning, which is followed by the recovery of target-bound phage particles [4]. Once specific clones are isolated from the library and their specificity and sensitivity are assessed, antibody-codifying nucleotide sequences can be re-engineered by adding new domains that confer specific properties to the antibody–target complex.

In this work, TomLinson I+J commercial phage libraries were screened in search for phage-antibodies that would specifically recognize proteins from almond [5] and walnut. These synthetic libraries contain over 100 million different scFv fragments (V_H and V_K domains connected to one another by a flexible Glycine-Serine linker) cloned in an ampicillin-resistant phagemid vector pIT2 (HIS, MYC tag), and transformed into TG1 *E. coli* cells [6]. The antibody fragment (scFv) is displayed as a fusion with the terminal phage III protein [7]. TomLinson I+J repertoires are based on a single human V_H framework (V3-23/D47 and J_{H4b}) paired with a single V_K (O12/O2/DPK9 and J_{K1}), with diversity introduced in the antigen-binding site [8]. The CDR3 of the heavy chains was designed to be as short as possible yet still able to form an antigen binding surface. It is recommended to use both repertoires in parallel in order to obtain the maximum number of binders.

Specific phage-antibodies that bind to different target molecules can be isolated from the phagemid repertoires following an affinity procedure called “panning”. After each round of panning, the non-binders are washed away and the phagemids bound to the target molecules are eluted and amplified by infection into fresh TG1 cells. The process should be repeated twice or up to four times to ensure that more than half scFv selected bind specifically to the target antigen. The selected phage-scFvs can be screened for binding using a simple ELISA based protocol [5, 9, 10]. Finally, the proteins A and L can be used for detection, purification, or immobilization of the target-specific scFv selected from the TomLinson I+J repertoires [11]. The protocol described in this chapter is based on the work of Lee et al. 2007 [8], but includes some modifications to improve the selection of phage-antibodies specific for the target allergenic food, avoiding cross-reactions with non-target allergens.

2 Materials

Prepare all solutions with ultrapure water and reagents. Prepare and store all reagents at room temperature (RT) unless indicated otherwise.

2.1 Material

1. DynaBeads[®] M-280 Tosylactivated. Store at 6 °C.
2. Magnet (DynaMag[™]).
3. Mixer allowing tilting and rotation of tubes (e.g. Hulamixer[®] sample mixer).
4. Nunc[™] MaxiSorb 96-well plates.
5. Nunc[™] Immuno Stick.
6. Nunc[™] Biobanking and Cell Culture Cryogenic Tubes.

7. 0.45 and 0.2 μ M syringe filters.
8. UV-Vis spectrophotometer.
9. Sterile filter pipette tips.
10. Petri dishes of 90 mm and 140 mm diameter.
11. Incubators at 37 °C and 30 °C with shaker (250 rpm).
12. Centrifuge for conical tube and plate.
13. Water bath.

2.2 Reagents for the Library

1. Protein extraction buffer: 0.035 M Na_2HPO_4 , 1 M NaCl, pH 7.5. Dissolve 12.54 g Na_2HPO_4 in 800 mL of deionized water. Adjust pH to 7.5, then add 58.4 g NaCl and water up to 1 L.
2. Pierce™ BCA Protein Assay Kit.
3. TomLinson I and J scFv libraries (distributed by MR Technology, Cambridge, UK). Check all libraries and stocks are frozen. Keep at -80 °C until needed. Freeze your own stocks at -80 °C.
4. Phagemid antibody libraries I and J.
5. Helper phage KM13.
6. Optimized antibody expression strain HB2151 and controls (anti-bovine serum albumin scFv in *E. coli* TG1TR).
7. Glycerol stocks of *E. coli* TG1 TR strain.
8. Glycerol stock of positive control clones (beta-galactosidase-specific dAb and anti-bovine serum albumin scFv in *E. coli* TG1 TR strain).
9. Glycerol stocks of negative control clone (phagemid).

2.3 General Reagents

1. TYE ampicillin agar plates: Dissolve 15 g Agar, 8 g NaCl, 10 g bacto-tryptone, and 5 g yeast extract for 1 L of double deionized water (ddH_2O). Autoclave. Cool down to 50 °C and add 1 mL of ampicillin solution (*see Note 1*). Pour plates. Plates can be stored at 4 °C for up to 4 weeks.
2. M9 minimal medium plates: Dissolve 15 g agar in 800 mL of ddH_2O . Autoclave. Cool down to 50 °C and add 200 mL 5xM9 salts, 10 mL 20% glucose, 1 mL of 1 M MgSO_4 , 100 μ L of 1 M CaCl_2 , and 1 mL of 1 mg/mL VitB1. Pour plates. Plates can be stored at 4 °C for several months (*see Note 2*).
3. M9 salts (5x solution): Add 64 g Na_2HPO_4 , 15 g KH_2PO_4 , 5 g NH_4Cl , and 2.5 g of NaCl to 1 L of ddH_2O and autoclave.
4. 2xTY medium: Dissolve 16 g bacto-tryptone, 10 g yeast extract, and 5 g NaCl in 1 L of ddH_2O . Autoclave. Cool to RT (25 °C) and add antibiotic solutions and glucose solution as required. Can be stored at 4 °C for up to 4 weeks.

5. H-TOP Agar: Dissolve 10 g Tryptone, 8 g NaCl, 7 g Agar, 5 mM MgCl₂ (1 g of MgCl₂ · 6 H₂O) in 1 L ddH₂O. Autoclave (*see Note 3*).
6. Ampicillin solution: Dissolve ampicillin powder at 100 mg/mL in ddH₂O. Filter through 0.2 μM filter. Aliquot in 1 mL portions. Can be stored at -20 °C indefinitely. Thawed aliquots should be freshly diluted 1000-fold into medium or agar.
7. Kanamycin solution: Dissolve kanamycin powder at 50 mg/mL in ddH₂O. Filter through 0.2 μM filter. Aliquot in 1 mL portions. Can be stored at -20 °C indefinitely. Thawed aliquots should be freshly diluted 1000-fold into medium or agar.
8. PBS buffer: 1× phosphate buffer, pH 7.4. Dissolve 1.44 g Na₂HPO₄, 0.2 g KCl, 0.24 g KH₂PO₄, and 8 g NaCl in 1 L of ddH₂O. Adjust to pH 7.4 and autoclave. Can be stored at 4 °C for several months.
9. PBS buffer 10×: 2 g KCl, 2.4 g KH₂PO₄, 80 g NaCl, 14.4 g Na₂HPO₄. Dissolve in approximately 800 mL of ddH₂O, adjust pH to 7.4, then fill up to 1 L. Autoclave and store at RT. Dilute tenfold to be used for ELISA immunoassay.
10. MPBS: PBS buffer supplemented with 2% skimmed milk powder (w/v). Filter through 0.45 μM filter. Use directly and discard remaining buffer. Do not store.
11. Trypsin solution: Dissolve trypsin powder at 10 mg/mL in PBS (trypsin stock). Freeze in 20 μL aliquots at -80 °C. Can be stored in 100 μL at -20 °C for several months. For the experiment, dissolve 50 μL of trypsin stock in 450 μL of PBS.
12. Glucose solution 20%: Dissolve 100 g of glucose (dextrose) in 0.5 L of ddH₂O. Autoclave. Can be stored at 4 °C for several months (*see Note 4*).
13. PEG solution 20% PEG- 2.5 M NaCl: Dissolve 100 g of PEG 6000 and 73 g of NaCl in 500 mL of ddH₂O. Filter through 0.2 μM filter or autoclave. Can be stored at RT for up to a year.
14. BSA-PBS: PBS buffer supplemented with 3% (w/v) or 1% (w/v) bovine serum albumin depending on ELISA step. Use directly and discard remaining buffer. Do not store.
15. OVA-PBS: PBS buffer supplemented with 1% (w/v) ovalbumin. Use directly and discard remaining buffer.
16. Glycerol 70%: Add 70 mL glycerol and 30 mL of ddH₂O. Autoclave (*see Note 5*).
17. Buffer A: 0.1 M borate buffer, pH 9.5. Dissolve 6.18 g H₃BO₃ (MW 61.83) in 800 mL ddH₂O. Adjust pH to 9.5 using 5 M NaOH and adjust volume to 1 L with ddH₂O. Autoclave (*see Note 6*).

18. Buffer B: 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 7.4. Dissolve 2.62 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and 14.42 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. Adjust volume to 1 L with ddH₂O. Autoclave (*see Note 6*).
19. Buffer C: 3 M ammonium sulfate in Buffer A or B. Dissolve 39.64 g $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ in Buffer A or B. Adjust pH with NaOH or HCl. Adjust up to 100 mL with Buffer A or B. Autoclave (*see Note 6*).
20. Buffer D or Blocking Buffer: PBS pH 7.4 with 0.5% (w/v) BSA. Add 0.88 g NaCl and 0.5 g BSA to 80 mL 0.01 M sodium-phosphate pH 7.4. Mix thoroughly and adjust volume to 100 mL with 0.01 M sodium-phosphate pH 7.4. Filter through 0.2 μM (*see Note 7*).
21. Buffer E or Washing and storage Buffer: PBS pH 7.4 with 0.1% (w/v) BSA. Add 0.88 g NaCl and 0.1 g BSA to 80 mL 0.01 M sodium phosphate pH 7.4. Mix thoroughly and adjust volume to 100 mL with 0.01 M sodium-phosphate pH 7.4. Filter through 0.2 μM (*see Note 7*).
22. Anti-M13 antibody horseradish-peroxidase (HRP) conjugate. Recognizes phage-antibodies through the M13 major coat protein (pVIII).
23. TMB solution (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine; Sigma cat. No. T0440-1L).
24. Stop solution for ELISA: Add 5.5 mL sulfuric acid (96%) to 200 mL of water.
25. My Taq™ Mix (Bioline cat n° 25042).

3 Methods

3.1 Protein Extraction

The same protocol is used to prepare extracts from reference allergenic nuts, and from unknown samples. To avoid cross-contamination, do not handle different allergenic nuts at the same time or in the same working surface. Clean bench thoroughly and change gloves between samples.

1. Grind the sample into small pieces (0.5 mm wide approximately) to facilitate the extraction, using a pestle.
2. Weigh 200 mg of ground sample to extract in a 2 mL tube.
3. Add 1800 μL of protein extraction buffer. Homogenize the mix with a disposable conical pestle (*see Note 8*).
4. Mix thoroughly for 10 min using Hula-Mixer, with vertical rotation, tilting, and vibration.
5. Centrifuge at $15,000 \times g$ for 30 min.
6. Carefully take aqueous phase only (*see Note 9*).

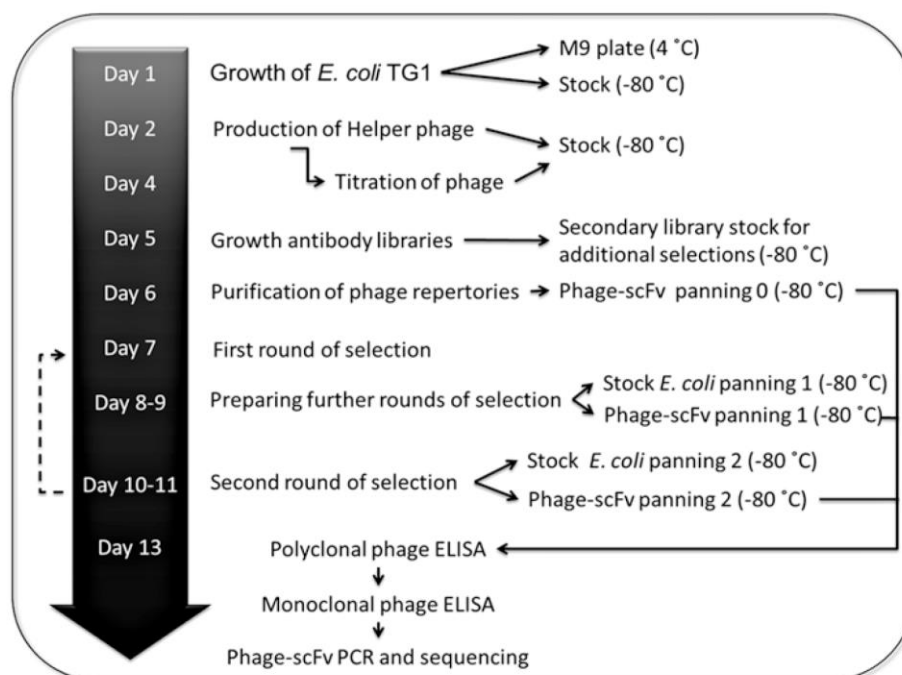


Fig. 1 Overall procedure

7. Filter the aqueous phase through 0.45 μm syringe filter.
8. Measure protein concentration employing Bicinchoninic acid assay (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific™).
9. Store in 100 μL aliquots at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2 Isolation of Allergen-Specific Phage-scFv from the Libraries

3.3 Growth of *E. coli* TG1 and Production of Large Quantities of Helper Phage

The overall procedure can be completed in 2 weeks (Fig. 1).

DAY 1:

1. Streak *E. coli* TG1 from the glycerol stock on a M9 minimal medium and incubate overnight at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Only grow *E. coli* 1 day to avoid cilia losing).
2. Pick a single colony from M9 minimal medium plate in a flask with 10 mL 2xTY medium (no antibiotics or glucose) and grow shaking at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 h, until $\text{OD} = 1$. (Use 2xTY medium as blank).
3. Plate 50 μL of the 2xTY culture in a plate of TYE with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicillin and 50 μL in a plate with TYE with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin. Incubate at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ during 2–3 days to check for the absence of growth.

4. Streak the culture also in M9 minimal medium to have a stock plate with isolated colonies, incubate overnight at 37 °C only for 1 day, and then keep in the fridge.
5. Prepare stock vials of TG1 TR with the remaining 10 mL 2xTY culture, by adding 1.2 mL to a cryotube with 600 µL of glycerol 70%, and freeze at -80 °C.

DAY 2:

6. Pick a single colony from M9 minimal medium plate into 5 mL 2xTY medium, incubate at 37 °C, 250 rpm until OD600 = 0.4.
7. Prepare 14 tenfold serial dilutions of KM13 helper phage in PBS.
8. Add 10 µL of diluted KM13 helper phage to 200 µL TG1 culture each. Incubate in water bath at 37 °C for 30 min without shaking.
9. Take only the last nine phage dilutions in order to get well separated plaques and add 210 µL of each dilution into each vial with 3 mL pre-warmed H-top agar. Mix gently with culture and spread quickly over surface of pre-warmed TYE agar plates with 1% glucose (no antibiotics). H-top agar should be completely melted in microwave distributed in glass vials with 3 mL and cooled to 42 °C in a water bath before use. This step should be performed carefully, one vial at a time, to avoid H-top agar solidification.
10. Incubate overnight at 37 °C.

DAY 3:

11. Pick a single colony of *E. coli* TG1 from M9 minimal medium into 5 mL 2xTY and grow at 37 °C, until OD600 = 0.4.
12. Pick a small plaque with a sterile tip from TYE plates with H-top and place into 5 mL TG1 culture at OD600 = 0.4. Grow for 2 h at 37 °C, 250 rpm.
13. Dilute 100-fold into 500 mL of 2xTY medium. Shake in 2 L flask for 1 h at 250 rpm at 37 °C. Then, add kanamycin to a concentration of 50 µg/mL and grow overnight at 250 rpm at 30 °C.

DAY 4:

14. Spin the culture at 10,800 × *g* for 15 min at 4 °C in ten 50 mL conical centrifuge tubes.
15. To purify phage by PEG precipitation, add 400 mL supernatant to 100 mL of PEG solution, previously cooled. Incubate on ice for 1 h. In this step a kind of fog can be observed inside the tube corresponding to helper phage.
16. Spin at 10,800 × *g* for 30 min at 4 °C. Pour away supernatant with PEG. Resuspend the pellets in a total 8 mL PBS and add 2 mL PEG solution. Mix well and leave for 20 min on ice.

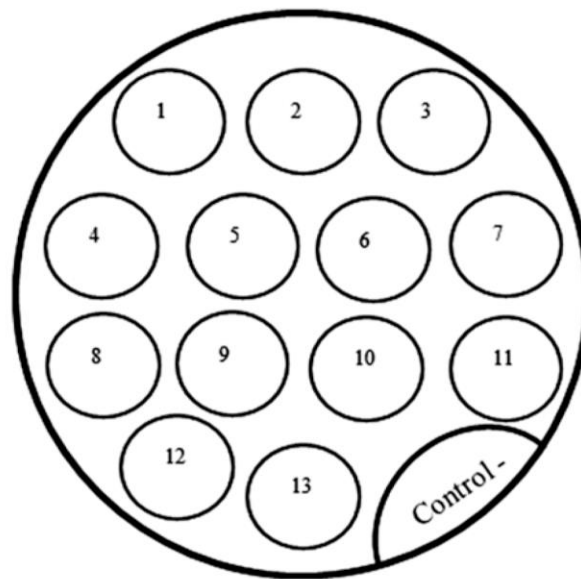


Fig. 2 Representative layout of a phage titration plate

17. Spin at $3300 \times g$ for 30 min. Respin briefly and aspirate any remaining drops of PEG/NaCl. Resuspend pellet in 5 mL PBS, distribute in microcentrifuge tubes and spin at $11,600 \times g$ for 10 min in a microcentrifuge to remove any remaining bacterial debris. Be careful to take only the supernatant and transfer to a new tube.
18. Store the helper phage at 4°C for short-term storage or in PBS with 15% glycerol for long-term storage at -80°C .

3.4 Titration of the Helper Phage

1. Test trypsin cleavage: Add $5\ \mu\text{L}$ of trypsin solution to $45\ \mu\text{L}$ phage, and incubate for 30 min at 37°C in a water bath.
2. Dilute $10\ \mu\text{L}$ of trypsin-treated phage to $90\ \mu\text{L}$ of PBS and make 100-fold serial dilutions of this in 1 mL aliquots of PBS. Perform the same dilution series using $10\ \mu\text{L}$ of non-trypsin-treated phage.
3. Take $10\ \mu\text{L}$ of each dilution series and infect $200\ \mu\text{L}$ each of TG1 bacteria with $\text{OD}_{600} = 0.4$ (prepared as Subheading 3.3, step 6). Incubate in a water bath for 30 min at 37°C .
4. Spot $10\ \mu\text{L}$ from each phage dilution, treated and not treated with trypsin, on TYE plates supplemented with kanamycin $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ and incubate at 37°C overnight (Fig. 2). As negative control, plate $10\ \mu\text{L}$ of not infected TG1. The number of colonies obtained from trypsin-treated phage should be at least 10^6 -fold lower than that non-treated phage. If not, discard helper phage preparation and start from a different plaque.

5. To calculate the concentration of Helper phage:

$$\frac{PFU}{mL} = \frac{Colonies\ number \times Dilution\ factor}{Plated\ volume\ (mL)}$$

6. Phage can be frozen in liquid nitrogen (add 20% glycerol) and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for many years.

DAY 5:

3.5 Growth of Phage-Antibody Libraries (See Note 10)

1. Add the frozen antibody library stock into 200 mL 2xTY medium supplemented with 1% glucose and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicillin. The presence of 1% glucose allows the effective suppression of antibody expression during bacterial growth. Measure OD600 in a UV-Vis spectrophotometer. It should be approximately 0.1.
2. Grow culture at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 250 rpm in a 2 L glass flask until OD600 = 0.4 (approximately 1–2 h).
3. Take 100 mL of this culture and add 2×10^{11} [11] KM13 helper phages. Use the rest of the culture to make secondary bacterial stock of the library following Subheading 3.6.
4. Incubate in a water bath at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min.
5. Spin the culture at $3200 \times g$ for 10 min. Resuspend in 200 mL of 2xTY medium with 0.1% glucose, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicillin, and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin.
6. Incubate at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ with shaking overnight in a 2 L glass flask.

3.6 Make Secondary Stock of Libraries.

1. Grow the remaining 100 mL (from Subheading 3.5, step 3) for a further 2 h shaking at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
2. Spin down the cells at $10,800 \times g$ for 10 min. Resuspend in 10 mL of 2xTY containing 15% glycerol.
3. Store this secondary stock in $20 \times 500\ \mu\text{L}$ aliquots at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Use one aliquot for each phage preparation if you wish to perform additional selections.

DAY 6:

3.7 Purification of Phage Repertoire by PEG Precipitation

1. Spin the overnight culture from Subheading 3.5, step 6 at $3200 \times g$ for 30 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
2. Add 20 mL PEG solution to 80 mL supernatant. Mix well and leave for 1 h on ice.
3. Spin $3200 \times g$ for 30 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pour away supernatant with PEG/NaCl. Respin briefly and aspirate any remaining dregs of PEG/NaCl.
4. Resuspend the pellet in 1 mL PBS and spin at $12,000 \times g$ for 10 min in a microcentrifuge to remove any remaining bacterial debris.

5. Store the phage at 4 °C for short-term storage or in PBS with 15% glycerol for long-term storage at –80 °C.
6. **To titer the phage stock** dilute 10 µL phage in 90 µL PBS, and repeat serial dilutions, until there are 13 dilutions in total. Add 200 µL of TG1 at an OD 600 of 0.4 to each tube and incubate at 37 °C in a water bath for 30 min. Spot 10 µL of each dilution on a TYE plate containing 100 µg/mL ampicillin and 1% glucose and grow overnight at 37 °C. Phage stock should be 10¹²–10¹³/mL, enough for at least ten selections. Store a part of this eluted phage (around 200 µL) to be used as “Panning 0” in ELISA, and use the remaining for panning 1.

**3.8 First
Round of Selection
on Immuno Stick
Paddles (See Note 11)**

1. Coat Nunc™ Immuno Stick paddles overnight at 4 °C with 100 µg/mL of the required antigen in 1.5 mL PBS. The efficiency of coating can depend on the antigen concentration, the buffer, and the temperature. Usually, 10–100 µg/mL antigen in PBS is used (*see Note 12*).

DAY 7:

2. Wash paddles in the tube three times with PBS (fill the tube with PBS, screw and unscrew the paddle several times, and pour PBS out. Repeat three times).
3. Fill tubes with 3% BSA in PBS to block paddles. Incubate standing on the bench for 1 h at 37 °C.
4. Wash paddles in the tubes three times with PBS.
5. Add 1 mL phage (10¹² phages) from Subheading 3.7, step 5 (or from step 6 stock) in 500 µL of 6% BSA in PBS. Add this mix to the tube containing the paddle coated with the non-target allergen. Incubate for 60 min at 25 °C rotating in the Hula-Mixer. Discard the paddle coated with non-target allergen and change it by the paddle coated with the target allergen. Incubate for 60 min at 25 °C rotating in the Hula-Mixer and for a further 60 min standing on the bench. Discard supernatant.
6. Wash paddle in the tube ten times with PBS.
7. Transfer the paddle to a new tube containing 500 µL of trypsin-PBS (50 µL of 10 mg/mL trypsin stock solution added to 450 µL PBS) and incubate rotating for 10 min at RT using Hula-mixer to elute the phage bound to the paddle.
8. Add 250 µL of the eluted phage to 1.75 mL of TG1 at an OD 600 of 0.4 (Prepared as in Subheading 3.3, step 6). The remaining eluted phage should be stored at 4 °C in case it is necessary to repeat infection. Incubate for 30 min at 37 °C in a water bath without shaking.
9. Take 10 µL of TG1 infected with eluted phage and dilute in 990 µL of PBS to obtain 10² dilution, and make two 100-fold serial dilutions of this to obtain 10⁴ and 10⁶ dilutions.

Pour 50 μ L of each dilution on TYE plates containing 100 μ g/mL ampicillin and 1% glucose and grow overnight at 37 °C to titer the phage. Incubate at 37 °C overnight (*see Note 13*).

- Spin the remaining TG1-infected culture at $11,600 \times g$ in a microcentrifuge for 5 min. Resuspend the pelleted bacteria in 1 mL of 2xTY and plate 500 μ L on two large Petri dishes (140 mm) containing TYE, 100 μ g/mL ampicillin, and 1% glucose. Grow plates at 37 °C overnight.

DAY 8:

3.9 Preparing Further Rounds of Selection

- After growing overnight culture in two large plates, add 1 mL of 2xTY medium to each one. Scrape cells from the agar using a glass spreader, and mix them thoroughly in a microcentrifuge tube.
- Prepare 50 mL of 2xTY medium with 100 μ g/mL ampicillin and 1% glucose and inoculate with 50 μ L of the scraped TG1 culture. Grow shaking at 37 °C until OD600 = 0.4. Store the remaining bacteria at -80 °C making aliquots of 500 μ L in 15% glycerol (stock *E. coli* panning 1).
- Take 10 mL of this culture and add 5×10^{10} [10] helper phage. Incubate without shaking in a 37 °C water bath for 30 min.
- Centrifuge at $3200 \times g$ for 10 min. Resuspend the pellet in 100 mL of 2xTY with 100 μ g/mL ampicillin, 50 μ g/mL kanamycin, and 0.1% glucose. Incubate overnight at 30 °C with shaking.

DAY 9:

- Centrifuge the overnight culture at $3200 \times g$ for 15 min.
- Purify phage by PEG purification as described in Subheading 3.7 (Purification of phage repertoire by PEG precipitation).
- Once resuspended in 1 mL PBS (Subheading 3.7, step 4), the precipitated phage can be stored at 4 °C for up to 1 week or used immediately for the second round of selection. Keep an aliquot (150 μ L) of this precipitated phage, at -80 °C with 15% glycerol, labeled as “phage-scFv panning1”, to be used in pools ELISA.

3.10 Preparation of Paramagnetic Beads for the Second Round of Selection

This protocol is based on use of 5 mg (165 μ L) Dynabeads® M-280 Tosylactivated. It is not recommended to couple <5 mg beads at a time.

- Wash of paramagnetic beads by resuspending the beads in a vial. Vortex for >30 s.
- Transfer 165 μ L of beads (5 mg) to a 2 mL screw cap tube.
- Add the same volume of Buffer A or B and resuspend.
- Place the tube in a magnet for 1 min and discard the supernatant.

5. Remove the tube from the magnet and resuspend the washed beads in the same volume of Buffer A or B as the initial volume of beads (**step 3**)
6. Transfer 165 μL of washed beads to a new screw cap tube. Place the tube in a magnet for 1 min and discard the supernatant.
7. Resuspend the beads in 100 μg of ligand for each 5 mg of beads (*see Note 14*). Add buffer A or B to a total volume of 150 μL . Mix thoroughly by vortex or pipetting. Add 100 μL Buffer C and mix by vortexing or pipetting.
8. Incubate in Hula-Mixer at 37 °C for 12–18 h (total volume = 250 μL).

DAY 10:

9. After incubation with the protein extract, place the tube on a magnet for 2 min and remove the supernatant.
10. Remove the tube from the magnet and add 1 mL Buffer D (blocking buffer), vortex 30 s and incubate at 37 °C for 2 h in Hula-mixer.
11. First spin the tube and then place it on a magnet for 2 min and remove the supernatant.
12. Remove the tube from the magnet and add 1 mL Buffer E (washing buffer), vortex for 5–10 s. Place the tube on a magnet for 2 min and remove the supernatant.
13. Repeat **step 12** once more.
14. Resuspend and dilute the beads in 1 mL of Buffer E. Vortex and split in two tubes (500 μL each). For the Panning it is enough to use 2.5 mg of beads. Store the remaining 2.5 mg of beads at 4 °C.

3.11 Second Round of Selection on Paramagnetic Beads

1. Take 500 μL (2.5 mg) of the beads coated with non-target allergen, place the tube on the magnet 2 min and remove the supernatant.
2. To perform the negative panning add 1 mL of eluted phage-antibodies from Subheading 3.9, **step 7** (10^{12} pfu) together with 500 μL BSA 6% to the tube. Incubate rotating in Hula-mixer for 1 h at 25 °C.
3. Place the tube on the magnet 5 min and collect the supernatant (from beads coated with non-target allergen or negative panning). The phage-antibodies not bound to these beads are used for positive panning in the tube containing beads coated with target allergen.
4. Place the tube containing 500 μL (2.5 mg) of beads coated with the target allergen on the magnet for 2 min, and remove the supernatant. Add the supernatant collected from

the previous step (negative panning) to the beads. Incubate in Hula-mixer for 1 h at 25 °C, and without shaking for a further hour at 25 °C.

5. Place the tube on the magnet 5 min and discard the supernatant.
6. Continue to wash with Buffer E. Repeat 20 times: Add 1 mL Buffer E, vortex the tube, place the tube on the magnet 1 min, discard supernatant.
7. Transfer the beads into a new tube to avoid eluting phage-antibodies stuck on the tube wall.
8. Add 500 µL of trypsin solution with PBS (50 µL of Trypsin with 450 µL of PBS). Incubate for 10 min in Hula-mixer at 25 °C.
9. Place the tube on the magnet 5 min and gather the supernatant with the target-specific phage-antibodies.
10. Repeat the same process with trypsin-eluted phages as described above for round 1 (from Subheading 3.10, steps 8–10).

DAY 11–12:

11. Obtain large quantities of phage-antibodies from round 2 using protocol described in Subheading 3.9, to continue with the third panning. Store infected bacteria (from Subheading 3.9, step 2) as “stock *E. coli* panning 2”, and precipitated phage (from Subheading 3.9, step 7) as “phage-scFv panning 2”.

3.12 Third Round of Selection on Immune Stick Paddles (Optional)

Exactly proceed again with the same protocol as is described in Subheading 3.8. After each round of selection, check the specificity of eluted phage-antibodies by ELISA.

DAY 13:

3.13 Screening Phage Particles by ELISA

Population of phage produced at each round of selection can be screened by ELISA for binding to the target and non-target allergen in order to identify “polyclonal” phage-antibodies with increased affinity to the target. Also, phages from single colonies can be screened by ELISA in order to identify “monoclonal” target-specific phage-antibodies. In general, we have found that 1% powder milk in PBS is best for blocking during monoclonal phage ELISA whereas 1% Ovalbumin in PBS is best for blocking in polyclonal phage ELISA.

3.13.1 Polyclonal Phage ELISA

1. Coat a Nunc™ MaxiSorb 96-well plate overnight with 100 µL per well of 1/200 protein extract in PBS (*see Note 15*). Incubate for 1 h at 37 °C.
2. Wash wells five times with PBS. You should check that all wells fill with wash solution (if they do not you may create false positives during further washes). Discard liquid by flipping plate

over and then shaking it. Add 200 μL per well of 1% MPBS (1% skimmed milk powder in PBS) or 1% OVA (1% ovalbumin in PBS) to block, and incubate for 2 h at RT, or 1 h at 37 °C, or overnight at 4 °C.

3. Wash wells five times with PBS. Add 1 μL PEG precipitated phage from the end of each round of selection in 100 μL 1% MPBS (or 1% OVA-PBS) to each well.
4. Incubate for 1 h at RT. Discard phage solution and wash ten times with PBS (*see Note 16*).
5. Add 1 in 5000 dilution of HRP-anti-M13 in 1% MPBS (or 1% OVA-PBS). Incubate for 1 h at RT. Wash 5 times with PBS.
6. Add 100 μL of TMB solution to each well and leave at RT for 2–15 min. A blue color should develop in positive wells.
7. Stop the reaction by adding 50 μL 1 M sulfuric acid. The blue color should turn yellow.
8. Read the absorbance at 450 nm.

Figure 3 shows representative polyclonal ELISA results for selection of almond-specific and walnut-specific phage-scFv.

3.13.2 Monoclonal Phage ELISA

1. Inoculate individual colonies from the titration plates from each round of selection (Subheading 3.8, step 9) into 200 μL 2xTY containing 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicillin and 1% glucose in 96 cell-well plates. Grow shaking (250 rpm) two or more hours at 37 °C.
2. Transfer a small inoculum (about 2 μL) from this plate to a second 96 cell-well plate containing 200 μL of 2xTY with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicillin and 1% glucose per well. Grow shaking (250 rpm) at 37 °C for 2 h. (Make glycerol stocks of the original 96-well plate, by adding glycerol to a final concentration of 15%, and then storing the plates at –80 °C).
3. After 2 h incubation (of the second plate) add 25 μL 2xTY containing 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicillin, 1% glucose and 10^9 helper phage.
4. Shake (250 rpm) at 37 °C for 1 h. Spin $1800 \times g$ for 10 min, then aspirate off the supernatant.
5. Resuspend pellet in 200 μL 2xTY containing 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicillin and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin. Grow shaking (250 rpm) overnight at 30 °C.
6. Spin at $1800 \times g$ for 10 min and use 50 μL of the supernatant (instead of the PEG precipitated polyclonal phage) in phage ELISA as detailed above.

Figure 4 shows the phage-ELISA results of individual clones after Planning 2 in the selection of walnut-specific phage-antibodies.

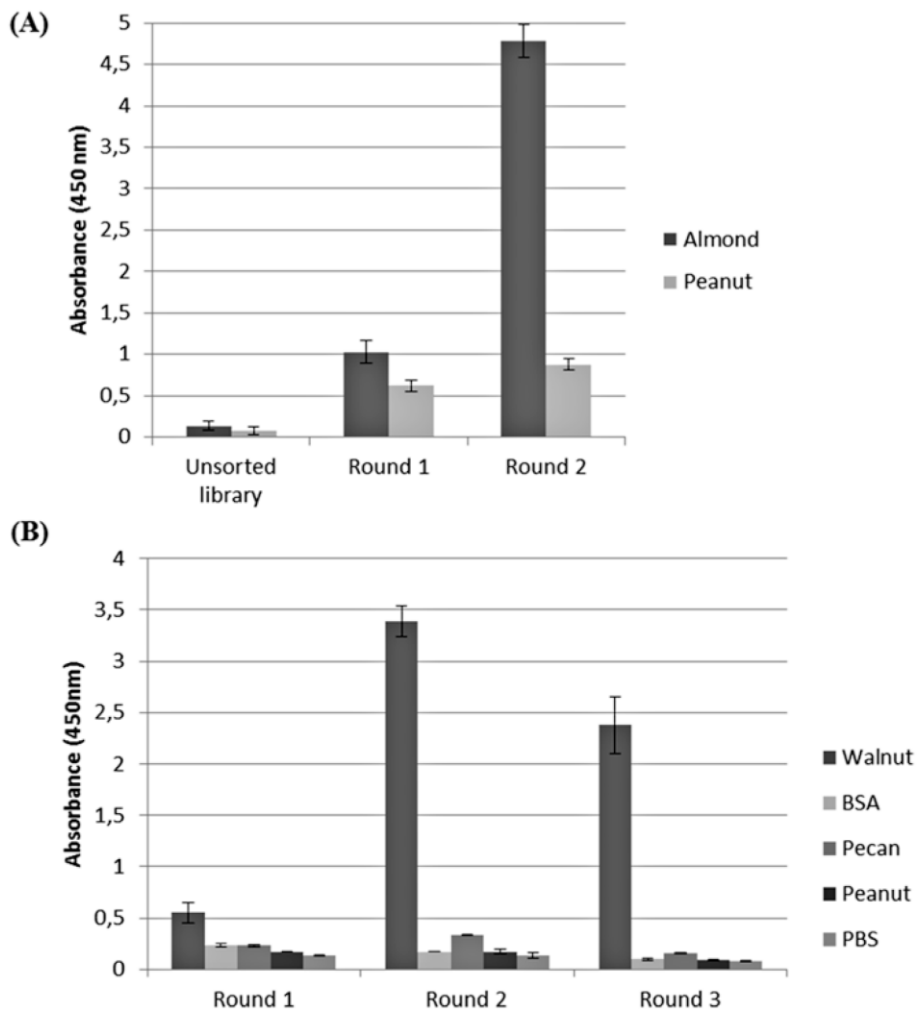


Fig. 3 Indirect phage-ELISA results obtained with polyclonal phages rescued at each round of selection against almond (a) and walnut (b) extract. Precipitated phages from each round of selection were analyzed by ELISA. Absorbance values are the mean of three independent determinations. Error bars show the standard deviation for each set of data

3.14 PCR Screening Selected Clones

Individual clones selected by ELISA can be further characterized through a PCR screening to check the presence of full length V_H and V_K insert. Primers used and expected sizes depending on the fragments to be amplified are shown in Table 1.

To perform PCR analysis we used My Taq™ Mix (ready-to-use 2x mix for fast and highly-specific PCR) for a total volume of 25 μ L per reaction (Table 2). All reactions must be set-up on ice and then subjected to temperature cycles for amplifications of the target sequences (Table 3).

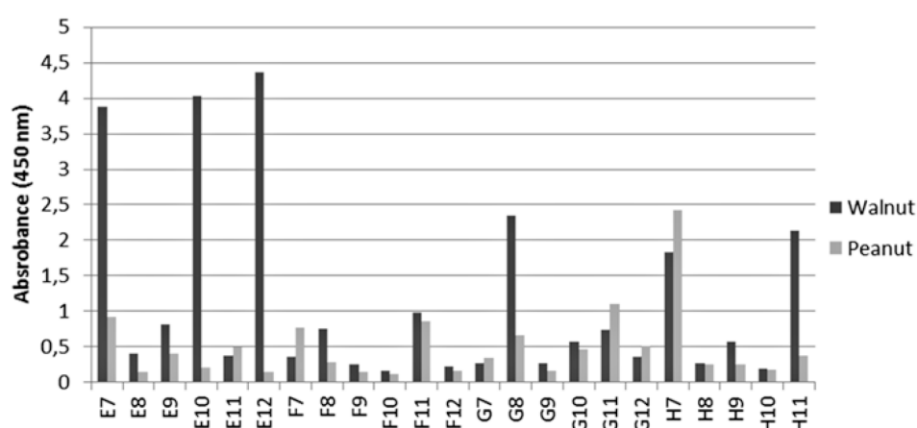


Fig. 4 Indirect phage-ELISA results obtained with monoclonal phages (phages obtained from individual colonies) against walnut extract after the second panning. Clone E12, later renamed as JR35, was selected after ELISA and sequencing characterization

Table 1
Primers used for PCR screening of individual clones

Fragment	Primers (5'-3')	Expected size
Whole insert VH + V κ	Fw- LMB3: CAG GAA ACA GCT ATG AC Rev.- pHEN seq: CTA TGC GGC CCC ATT CA	With whole insert: 935 bp Without insert: 329 bp With only V $_H$: 625 bp With only V $_k$: 635 bp
VH only	Fw- LMB3: CAG GAA ACA GCT ATG AC Rev.- link seq new: CGA CCC GCC ACC GCC GCT G	With insert: 527 bp Without insert: 227 bp
V κ only	Fw-DPK9 FR1: CAT CTG TAG GAG ACA GAG TC Rev.- pHEN seq: CTA TGC GGC CCC ATT CA	With insert: 368 bp Without insert: no band

Table 2
Preparation of PCR reactions for screening of individual clones

Component	Concentration	Volume per sample (μ L)
Template	Culture from Subheading 3.13.2, step 2 or pick a colony from Subheading 3.8, step 9	2
Primers (Fw and Rev)	20 nmol/mL each	0.5
My Taq TM Mix		12.5
Water (ddH ₂ O)		Up to 25
Final volume PCR mix		25

Table 3
PCR cycling conditions for screening of individual clones

Step	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	95 °C	1 min	1
Denaturation	95 °C	15 s	30
Annealing	User determined (usually 2–5 °C below the lower T _m of the primer pair)	15 s	
Extension	72 °C	10 s	

3.15 Sequencing-Selected Clones

For sequencing of selected clones, the following primers are recommended.

For VH use link seq new 5'-CGA CCC GCC ACC GCC GCT G-3'.

For Vk use pHEN seq 5'-CTA TGC GGC CCC ATT CA-3'.

The nucleotide sequences obtained for the almond- and walnut-specific scFv (Fig. 5) are shown as an example, and also comparison of their deduced amino acid sequences (Fig. 6).

4 Notes

1. TYE plates are used in this protocol without, with 1%, and with 0.1% of glucose. For 1 L you must add 50 mL or 5 mL of glucose solution 20%, respectively. Add the glucose together with the antibiotic. Depending on required final volume, you must add the quantity of water necessary to maintain the glucose concentration. Plates should be dried in flow-bench before use.
2. MgSO₄, CaCl₂, and Vitamin B1 (Thiamine Hydrochloride) must be filtered through 0.2 µM filter in a laminar flow cabinet and used fresh that day.
3. Pour H-Top agar plates and store the excess for weeks at 4 °C. This medium solidifies very easily. It is important to warm up in a water bath (55 °C) before use.
4. It is advisable to separate the solution into smaller bottles before sterilization to avoid contamination.
5. To handle glycerol it is advisable to use a micropipette for viscous liquids.
6. Buffers A, B, and C are used for prewashing and coupling of Dynabeads® M-280 Tosylactivated. Buffer A is the recommended buffer for coupling. For pH labile ligands, use Buffer B. Do not add any protein (apart from your specific protein ligand), sugar, etc., to these buffers.

126 Raquel Madrid et al.

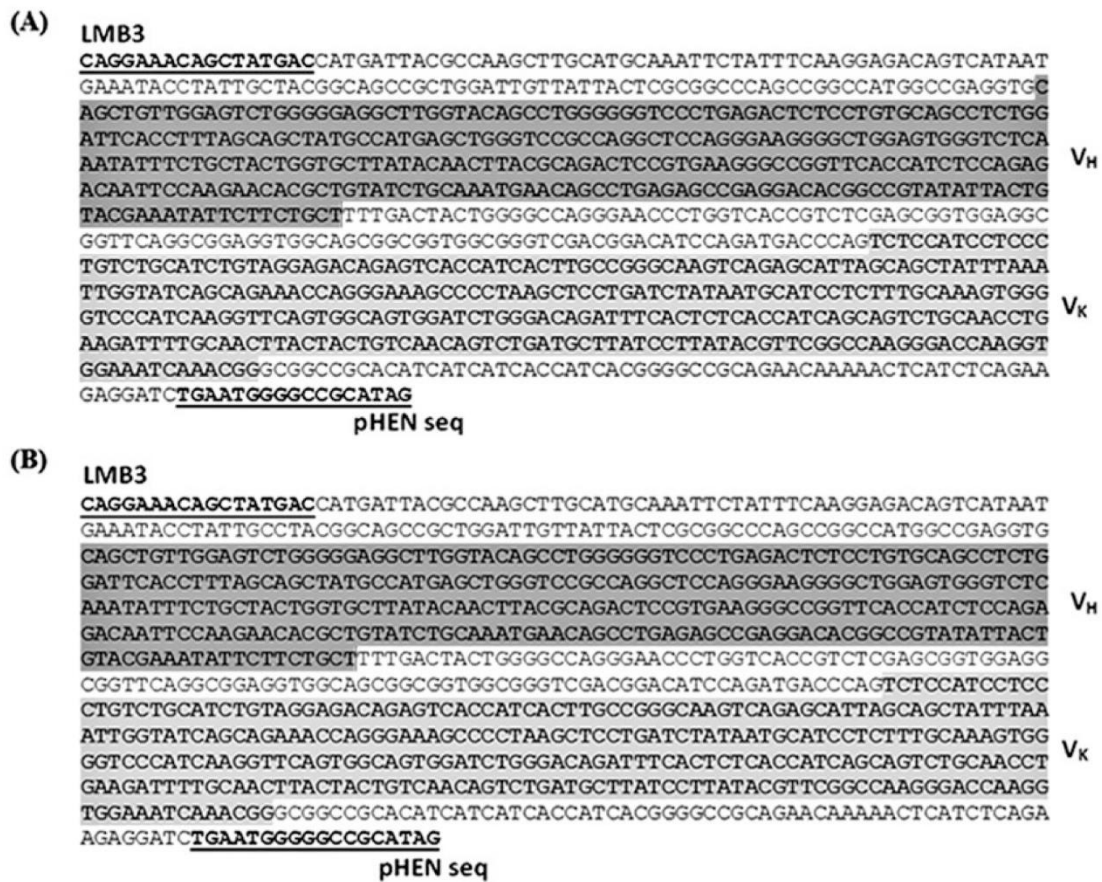


Fig. 5 Sequencing of pI22 vector with primers LMB3 and pHEN. Sequence of V_H and V_K region specific to almond (a) and walnut (b). In yellow primers LMB3 and pHEN. In pink the sequence of V_H region and in grey V_K region

7. Buffers D and E are used for washing of all ligand-coupled beads. Buffer E can also be used for storage of ligand-coupled beads. Do not use these buffers or any buffer containing protein or aminogroups (e.g. glycine, Tris) for pre-washing or coupling to these beads. Protein blocking is recommended as it reduces aggregation and non-specific binding. If a preservative is needed for the coupled beads, a final concentration of <0.1% (w/v) sodium azide may be added to Buffer E.
8. The disposable pestle can be fabricated in the lab by sealing a glass Pasteur pipette or a micropipette tip with a flame.
9. Three layers are usually observed after centrifugation: a sediment, intermediate aqueous phase with proteins and DNA, and some floating particles.
10. It is advisable to run through the protocols using the control clones before you use the library: Streak the controls on TYE plates containing 100 µg/mL ampicillin and 1% glucose.

tgarcia@ucm.es

	H-CDR1	H-CDR2
Almond	QPGGSLRLSCAAS GFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIT SYGSDTY YADSVKGRFTISR	
Walnut	QPGGSLRLSCAAS GFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSNIS ATGAYTTY ADSVKGRFTISR	
	H-CDR3	Linker
Almond	DNSKNTLYLQMNSLRAEDTGVVYCAK SAYDFD YWGGTLVTVSSGGGGSGGGGGSGGGG ST	
Walnut	DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCT KYSSAFD YWGGTLVTVSSGGGGSGGGGGSGGGG ST	
	L-CDR1	L-CDR2
Almond	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVIT CRASQ SISSYLNWYQQKPKGKAPKLLI YSASALQ SGVPS	
Walnut	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVIT CRASQ SISSYLNWYQQKPKGKAPKLLI YNASSLQ SGVPS	
	L-CDR3	Hys-Tag
Almond	RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQGASDPT TFGQGTKVEIKRAAA HHHHHHH GAA	
Walnut	RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQSDA YPYTFGQGTKVEIKRAAA HHHHHHH GAA	
Almond	EQKLISEEDLNGAA	
Walnut	EQKLISEEDLNGAA	

Fig. 6 Amino acid sequences of the almond [5] and walnut scFvs deduced from the nucleotide sequences by Expasy Website. Positions of the respective complementary determining regions for the variable domains of heavy (H-CDR 1-3) and light (L-CDR 1-3) chains are indicated

After overnight growth at 37 °C in an incubator pick a single colony from each and grow these overnight (shaking at 37 °C) in 5 mL 2xTY containing 100 µg/mL ampicillin and 1% glucose. Make phage for the positive and negative controls separately (use 500 µL of overnight in Subheading 3.9). Use a 1:100 mixture of phage produced from the positive and the negative controls and perform one round of selection (Subheading 3.8) using 100 µg/mL of BSA in PBS for coating. Check for enrichment of BSA binders (should be over 50% after one round of selection) by monoclonal phage ELISA (Subheading 3.12.2).

11. The first round of selection (enrichment of antigen-specific phage by binding to immobilized antigen) is the most important one. Any errors or loss of diversity made at this point will be amplified in subsequent rounds of selection.
12. To increase specificity of the phage selection for the target allergen, we first perform a negative panning with a non-target allergen. Thus, it is necessary to coat one immune stick with the target allergen and a second one with a non-target allergen (e.g., for selection of phage-antibodies against almond, one immune stick is coated with 100 µg/mL of almond extract and the other with 100 µg/mL of peanut extract).
13. This method of phage titration allows recovery of isolated colonies to be analyzed by the monoclonal phage ELISA, after the second round of selection. After each round you should obtain at least 100 infective phages. If not, you must repeat the process, using the remaining 250 µL of eluted phage from

- Subheading **3.8, step 8**. If you obtain less than 100 phages again, repeat the selection starting at Subheading **3.8, step 1**.
14. The concentration of protein extract must be calculated for each specific quantity of beads, for example, using 5 mg of beads, calculate the necessary volume of sample/protein extract to have a final concentration of 100 µg in a total volume of 150 µL with buffer A. To increase specificity of the phage selection for the target allergen, we perform a negative panning on paramagnetic beads in a similar way as explained in panning 1 with immuno sticks. Thus, it is necessary to prepare two different batches of coated beads, 5 mg of beads are coated with the target allergen in a screw cap tube (almond or walnut extract in our case) and 5 mg with the non-target allergen in a second tube (peanut extract).
 15. To check specificity, include appropriate controls: wells coated with the target allergen, with non-target allergen(s), and without allergen (just PBS).
 16. We do not recommend to include Tween 20 in phage ELISA, as we have observed a higher background.

References

1. Curzer HJ, Perry G, Wallace MC, Perry D (2016) The three rs of animal research: what they mean for the institutional animal care and use committee and why. *Sci Eng Ethics* 22:549–565. doi:10.1007/s11948-015-9659-8
2. Qi H, Lu H, Qiu H-J et al (2012) Phagemid vectors for phage display: properties, characteristics and construction. *J Mol Biol* 417:129–143. doi:10.1016/j.jmb.2012.01.038
3. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348:552–554. doi:10.1038/348552a0
4. Georgieva Y, Konthur Z (2011) Design and screening of M13 phage display cDNA libraries. *Molecules* 16:1667–1681. doi:10.3390/molecules16021667
5. de la Cruz S, Cubillos-Zapata C, López-Calleja IM et al (2015) Isolation of recombinant antibody fragments (scFv) by phage display technology for detection of almond allergens in food products. *Food Control* 54:322–330. doi:10.1016/j.foodcont.2015.02.011
6. Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW et al (1988) Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242:423–426
7. Kristensen P, Winter G (1998) Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. *Fold Des* 3:321–328. doi:10.1016/S1359-0278(98)00044-3
8. Lee CMY, Iorno N, Siervo F, Christ D (2007) Selection of human antibody fragments by phage display. *Nat Protoc* 2:3001–3008. doi:10.1038/nprot.2007.448
9. Weber M, Bujak E, Putelli A et al (2014) A highly functional synthetic phage display library containing over 40 billion human antibody clones. *PLoS One* 9:e100000. doi:10.1371/journal.pone.0100000
10. de la Cruz S, López-Calleja IM, Alcocer M et al (2013) Selection of recombinant antibodies by phage display technology and application for detection of allergenic Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) in processed foods. *J Agric Food Chem* 61:10310–10319. doi:10.1021/jf403347t
11. Rouet R, Lowe D, Dudgeon K et al (2012) Expression of high-affinity human antibody fragments in bacteria. *Nat Protoc* 7:364–373. doi:10.1038/nprot.2011.448

