

Desarrollo de un ELISA para la cuantificación de dextrana en muestras de jugo de caña

Meinardo Lafargue-Gómez^{1*}, Reinaldo Fraga-Vidal¹, Miriam Burón-Rodríguez², Lisandra Martínez-Valdés¹, Amanda Montes-Álvarez¹, Arianne Rubio-Sánchez¹

1. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).

Vía Blanca, No. 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón. La Habana, Cuba.

2. Centro Nacional Para La Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

Calle 3ra, No 40759, entre 6ta y Carretera de Tirabeque, Boyeros. La Habana. Cuba.

* meinardo.lafargue@icidca.azcuba.cu

RESUMEN

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) es una herramienta potencial para la determinación de múltiples moléculas, incluyendo los carbohidratos. Este trabajo describe el desarrollo de un ELISA competitivo para la cuantificación de dextrana. Primeramente, se obtuvieron anticuerpos policlonales con el empleo del modelo animal de conejos de Nueva Zelanda y la molécula de dextrana T 200 (200 000 Dalton), conjugada con ASB como antígeno. Se empleó peryodato de sodio como agente oxidante de la molécula de dextrana. La calidad del conjugado ASB-Dextrana se evaluó con electroforesis de proteínas y se detectaron, tanto la proteína (tinción de Coomassie) como el polímero de dextrana, con el empleo de la tinción TPS. Se analizaron 4 variables: pH, tiempo de incubación, temperatura y concentración del agente bloqueador, para predecir la mejor condición de recubrimiento del antígeno en las placas ELISA. El recubrimiento de polímero (RP) se describió mediante una función no lineal, $RP = 5.142 + 0.504 \cdot \text{Incub Hor} + 0.085 \cdot \text{Temperat}^2 - 0.053 \cdot \text{Temperat} \cdot \text{Concentr}$, después de evaluar un diseño factorial 3^4 ($R^2 = 0.967$). La dextrana se cuantificó en una amplia gama de concentraciones y se estableció un límite de detección de 0.25 ppm. El inmuno-ensayo pudo detectar la presencia de polímero en jugo de caña de azúcar. Se obtuvo una buena concordancia entre las muestras evaluadas por la prueba desarrollada y un ELISA similar, de la firma comercial LIFESPAN ($R^2 = 0.972$).

Palabras clave: dextrana-sacarasa, ELISA, anticuerpos IgG, conjugación con peryodato.

ABSTRACT

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is a potential tool for determination of many polymers. This work describes the development of a competitive ELISA for dextran quantification. Hence, polyclonal antibodies (New Zealand rabbits animal bio-model) were firstly obtained, employing T 200 dextran (200 000 Da) conjugated to BSA as antigen, using sodium per-iodate as dextran oxidizing-agent. Quality of BSA-Dextran conjugate was evaluated using SDS-PAGE, detecting both, moiety protein (Coomassie staining) and dextran polymer (PAS staining). Four variables, pH, Incubation time, temperature and blocking agent concentration were analyzed to predict the better coating condition of antigen to ELISA plates. Polymer coating (PC) was described by nonlinear function, $PC = 5.142 + 0.504 \cdot \text{Incub Hor} + 0.085 \cdot \text{Temperat}^2 - 0.053 \cdot \text{Temperat} \cdot \text{Concentr}$, after factorial design 3^4 was evaluated ($R^2 = 0.967$). Dextran was quantified over a wide range of concentrations, and a detection limit of 0.25 ppm was established. The immunoassay was able to detect the presence of polymer in sugar cane juice. Additionally, a good agreement was obtained between samples evaluated by the test developed and similar ELISA from LIFESPAN commercial kits ($R^2 = 0.972$).

Key words: dextran, competitive ELISA, IgG antibodies, per-iodate conjugation.

INTRODUCCIÓN

Las pérdidas que se asocian al precio de la producción del azúcar, cada año, son de relevancia, de ahí que se describan numerosos problemas en los ingenios, como por ejemplo: las pérdidas de caña de azúcar durante la cosecha y el transporte desde los campos, así como la baja calidad del procesamiento de la caña y del azúcar (1). El proceso, desde el campo hasta el ingenio, generalmente implica que la caña de azúcar se recolecte, se queme y, luego, se corte. Esto es conveniente para los cortadores y recolectores de caña, pero causa un daño significativo a la calidad de la gramínea, particularmente si la caña se deja en el campo y espera a ser transportada por más de 24 h (2). El tiempo de espera para recoger en el campo y transportar a los ingenios (conocido como tiempo de corte para triturar) suele ser bastante largo en varios países (3).

Durante el período de corte para triturar, muchos microorganismos pueden crecer al utilizar la sacarosa de la caña de azúcar, después de la cosecha, para producir dextrana (1). La dextrana es un polímero indeseable, producido por *Leuconostoc mesenteroides*, capaz de utilizar una alta proporción del azúcar presente en el jugo en poco tiempo. En condiciones favorables de temperatura y humedad, la dextrana-sacarasa cataliza la hidrólisis de la sacarosa para formar dextrana, que se extrae en el ingenio junto con el jugo y contamina todo el flujo productivo, esta puede alcanzar altos niveles de concentración y superar los 1000 ppm en el jugo y pudiera llegar a 10 000 ppm, en casos muy extremos (2).

Sin duda, la solución a tales problemas es multifactorial y son de gran relevancia factores, como: el manejo de la caña durante su llegada a los ingenios, así como el tratamiento del jugo, ya sea con agentes antimicrobianos o con enzimas hidrolíticas, que tengan como sustrato al indeseado polímero (3). En este sentido, es importante la evaluación de técnicas como el ELISA, que faciliten la detección exacta y precisa de la dextrana y que permitan la cuantificación, sin sesgos, del polímero, con el consiguiente ahorro de productos caros, como las enzimas hidrolíticas; de ahí, la importancia de que se aplique la cantidad adecuada del polímero en el jugo (3).-

Este tipo de ensayo, muy difundido en la actualidad (4, 5) e, incluso, ofertado comercialmente por firmas biotecnológicas (LIFESPAN, BIOCCOMPARE) ha experimentado un aluvión en los últimos años (4, 5). En este sentido, debe señalarse que el precio en el mercado de 1 kit de 96 determinaciones para la cuantificación de dextrana, oscila entre 350 y 400 USD; por lo tanto, el desarrollo de tal ensayo dotaría de soberanía su empleo. Además, contar con tales ensayos representa una herramienta importante para discernir querellas, que pudiesen ocurrir entre cliente y demandante, en cuanto a la calidad del azúcar, en términos de baja concentración de dextrana.

Podemos mencionar, asimismo, que los crecientes esfuerzos por clonar enzimas dextrana-sacarosas en sistemas hospederos (*Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*) (6, 7) demandan del desarrollo de técnicas, cada vez más novedosas, de pesquisa o búsqueda; entre estas, sin duda, se encuentra el ELISA, como una herramienta a considerar (4). En el presente trabajo se describe el desarrollo de un ELISA competitivo para la cuantificación de dextrana, basado en la detección de fluorescencia, emitida en el ensayo desarrollado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del inmunógeno

El inmunógeno, complejo albúmina de suero bovino (ASB)-dextrana, se obtuvo según protocolo de conjugación con el empleo de peryodato de sodio como agente oxidante, descrito previamente (4). La obtención de los complejos ASB-dextrana se evidenció a través de la realización de electroforesis y, posteriormente, de las tinciones, tanto con azul de Coomassie (para la detección de la

fracción proteica del complejo) como con el ácido peryódico-base de Schiff (TPS) para la detección de la fracción de carbohidrato (dextrana) del conjugado.

Obtención de las muestras a evaluar

Preparación de las muestras de jugo

El procedimiento para la preparación de las muestras utilizadas en este trabajo con empleo, como matriz de disolución jugo de caña, fue a través de la adición de diferentes cantidades (gr) de dextrana (200 000 Dalton) con el uso de balanza analítica (rango 0.1 a 2000 gr) y la expresión:

$$C \text{ (g/l)} = m \text{ (gr)} / V \text{ (l)}$$

Donde: C la concentración de dextrana a preparar, m la masa en gramos a pesar del polímero y V el volumen de jugo de caña en el cual se disolvería el polímero.

Se tomó el jugo de caña del ingenio Héctor Molina, para garantizar la no presencia de dextrana en la muestra, que fuese a interferir con la cantidad exacta adicionada del polímero de 200 000 dalton; primeramente, se solicitó un jugo de la menor concentración de esta molécula, determinada por métodos turbidimétricos, luego de precipitación alcohólica. El jugo así obtenido fue tratado con dextranasa de 400 U/ml, la cual fue aplicada al jugo a una concentración de 0.024 U/ml, durante 18 horas, a 40° C, para garantizar el mayor porcentaje de remoción de dextrana. Una vez concluido el paso de remoción, se realizó precipitación con etanol al 70 % y, posteriormente, centrifugación (10 000 rpm, 5 min, centrífuga Eppendorf 5804 R), para descartar el pellet y recuperar el sobrenadante obtenido. Este sobrenadante se ultrafiltró con el empleo de ultrafiltros AMICON (Ultra-15 10 Kilo-dalton, valor de corte: 10 000 dalton) para la eliminación de la enzima dextranasa (\approx 60 000 dalton) de la preparación. Adicionalmente, la fracción no retenida fue tratada a 95° C, por 5 minutos.

Obtención de la dextrana producida por la cepa recombinante de Bacillus megaterium

Para ello se evaluó un sobrenadante (concentrado 100 veces), obtenido en un medio de cultivo en el cual se establecieron las condiciones (pH, temperatura, agitación), para el crecimiento de una cepa de *Bacillus megaterium* genéticamente modificada. En dicho medio se empleó xilosa, como agente inductor de la expresión de la enzima. La evaluación antes referida consistió, primeramente, en determinar el nivel de actividad enzimática del sobrenadante del cultivo, por el método del ácido dinitro salicílico, en un momento específico del crecimiento del microorganismo (30 horas). La determinación de la actividad enzimática se desarrolló con la adición de 300 ul del sobrenadante concentrado a 1.2 ml de buffer de reacción. El buffer de reacción empleado presentó la composición: 765 microlitros de agua destilada, 30 ul de buffer acetato (1M, pH = 5.4), 30 ul de solución de CaCl_2 (50 mM) y 375 ul de una solución de sacarosa 400 g/l. Seguidamente, se estableció un periodo de incubación de la enzima y el sustrato en el buffer descrito durante 10 min. y la cantidad de reductores formados, se convirtieron en unidades de actividad enzimática, a través de la expresión:

$$AE = \frac{\Delta DO}{\Delta t} * \frac{1}{180} * \frac{1}{Coef Ext} 5 * 1000 * Dilución$$

Donde:

ΔDO : La variación de la densidad óptica a 550 nm, en el tiempo establecido para el test de actividad enzimática

Δt : Tiempo de ensayo

180: masa molar de la glucosa

Coef Ext: Coeficiente de extinción molar de un gráfico de DO a 550 nm versus concentración de glucosa

Posterior a la determinación del valor de actividad se procedió a sintetizar dextrana, con el empleo, para ello, del sobrenadante antes descrito, como fuente de enzima para la síntesis del polímero. Brevemente, 2 U de enzima se adicionaron por cada ml de buffer de reacción y se realizó la incubación de la enzima en el buffer, durante 18 horas, a 30° C. Una vez concluido el proceso de incubación se procedió a inactivar la enzima (95° C, durante 5 min.) y se procedió a realizar la determinación de la concentración de dextrana, con la utilización del ensayo desarrollado. Muestras de diferentes concentraciones de dextrana se prepararon, al realizar diferentes diluciones del preparado descrito que contienen dextrana sintetizada y el empleo del sobrenadante antes referido.

Desarrollo del ELISA

El primer paso en la definición de la técnica desarrollada fue la determinación de la concentración óptima de recubrimiento del polímero en el formato de las placas de poliestireno empleadas (Nunc MAXISORP de 96 pocillos). Para ello, inicialmente, varias concentraciones del polímero, dextrana 200 000 Dalton (rango 0.5 a 35 ppm) se prepararon en buffer de recubrimiento (tampón carbonato/bicarbonato, pH=9.6).

El pulido de la señal se desarrolló al establecer un diseño factorial 3⁴ (81 corridas), que permitiera estimar el máximo recubrimiento del polímero en la placa. Para ello, se analizaron 4 variables, con 3 niveles por cada condición:

1. pH del tampón empleado (pH), rango de 7 a 9.6
2. Tiempo de incubación del recubrimiento (Incub Hor), con rango de 4 a 18 horas
3. Temperatura de recubrimiento del polímero (Temperat), con rango de 25 a 40° C
4. Concentración de la molécula ASB-dextrana (Concentr) con la cual se realizará el recubrimiento de las placas de poliestireno, con rango de 2.5 a 6.5 ppm

Luego del proceso de recubrimiento descrito, se procedió a realizar el ensayo que permitiese la detección del polímero de dextrana. Primeramente, las muestras (de dextrana) se preincubaron por 2h, a 37° C, con anticuerpo policlonal antidextrana, obtenido en conejo, purificado por afinidad. Seguidamente, se aplicaron 100 microlitros por pocillo de la mezcla pre-incubada en las placas recubiertas, previamente descritas, durante 1 hora, a 37° C. Otros 100 microlitros por pocillo de anticuerpo antinmunoglobulina G (IgG) de conejo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (Sigma), diluido 1/ 3 500 en el buffer de muestra (Tris 50 mM pH 8, NaCl 0.13 M, Tween 20 0.05 % y ASB al 0.5 %) se emplearon como conjugado. Se establecieron 3 ciclos de lavado entre cada paso de reacción desarrollado, con el empleo de un lavador automático, que dispensara 250 microlitros por pocillo. La señal de fluorescencia de cada pocillo de la placa de poliestireno se detectó, con el uso de un lector de fluorescencia de la tecnología SUMA.

Los valores de fluorescencia obtenidos se transformaron en porcentaje de inhibición del ELISA competitivo, según la expresión:

$$\%Inh = 100 - 100 * \frac{\text{Fluorescencia de la muestra} - \text{Fluorescencia del control positivo}}{\text{Fluorescencia del control negativo} - \text{Fluorescencia del control positivo}}$$

Donde:

% Inh: Es el porcentaje de inhibición calculado para la muestra

Fluorescencia del control negativo: Es la señal de una muestra de 0 ppm de concentración de dextrana

Fluorescencia de la muestra: Es la fluorescencia de la muestra a la cual se determinará la concentración de dextrana

Fluorescencia del control positivo: Es la fluorescencia de la muestra de una concentración elevada de dextrana (200 ppm)

Con los valores del porcentaje de inhibición, así determinados, se procedió a cuantificar la concentración de polímero de dextrana en la muestra, al interpolar dicho valor del porcentaje de inhibición en un gráfico de dicha variable (en el eje de las ordenadas) versus concentración de dextrana en el eje de las abscisas. El gráfico se construyó al realizar el ajuste (por regresión polinómica) de diferentes valores del porcentaje de inhibición versus las concentraciones de dextrana de un estándar elaborado en el laboratorio. El rango de concentración del estándar de dextrana estuvo entre 0 y 200 ppm. La concentración de polímero en la muestra fue definida a través de la determinación de los ceros del polinomio seleccionado (grado 4), con el empleo de un software online accesible en (<https://es.symbolab.com/solver/roots-calculator>).

Evaluación de la reproducibilidad, exactitud, detectabilidad y estabilidad de la técnica

Para evaluar la reproducibilidad del método, muestras de diferentes concentraciones (baja, media y alta) se evaluaron durante 6 días (1 placa por día). La variación intraensayo se determinó a través del cálculo del coeficiente de variación (CV), con el empleo de valores para dicho análisis, de los resultados dentro de una misma placa ELISA evaluada en el día. En tanto que la variación Interensayo se definió con la totalidad de los datos obtenidos, en los 6 días de estudio. Las expresiones empleadas para una u otra determinación de variabilidad, a través del CV, son similares:

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} = \frac{(\sum_{i=1}^n (x^- - x_i)^2)^{0.5}}{\bar{x} * (n - 1)^{0.5}}$$

Donde:

CV: El coeficiente de variación estimado (estimador de la precisión del método)

SD: Es la desviación estándar de las mediciones realizadas

\bar{X} : La media de las mediciones de fluorescencia realizadas

X_i : Cada valor obtenido (de fluorescencia) durante el desarrollo de las mediciones

n : es el tamaño de la muestra (número de valores de fluorescencia empleadas en el estudio de reproducibilidad)

Para la evaluación de la exactitud del método se prepararon 8 muestras en cada condición (baja, media y alta concentración de dextrana). El rango de concentración de dextrana, en cada condición evaluada, se definió como bajo (13.81 a 21.37 ppm), medio (65.94 a 77.67 ppm) y alto (116.43 a 135.41 ppm). Las muestras así seleccionadas se cuantificaron con el empleo del ELISA desarrollado y el ELISA de referencia.

La detectabilidad o mínima concentración de la molécula que el ensayo es capaz de detectar se evaluó acorde con un método previamente descrito (8, 9). Se prepararon diluciones seriadas de una muestra de concentración de dextrana conocida y se evaluaron en el ELISA desarrollado.

$$Detectabilidad = \frac{FluorLD - Intercepto}{pendiente} \text{ y } FluorLD = FluorBLA + 3 * SDBLA$$

Donde:

- *FluorLD*: Es la fluorescencia definida para el límite de detección del ensayo
- *FluorBLA*: Es la fluorescencia promedio del blanco. De una muestra que presenta 0 ppm de dextrana de concentración SDBLA: Es la desviación estándar asociada a las 50 mediciones de fluorescencia de la muestra blanco
- *Intercepto*: Es el valor de intercepto de un gráfico de fluorescencia versus concentración de dextrana (rango de 0 a 0.5 ppm)
- *Pendiente*: Es el valor de pendiente de un gráfico de fluorescencia versus concentración de dextrana (rango de 0 a 0.5 ppm)

Para la medición de la estabilidad del ensayo desarrollado, específicamente de las placas recubiertas con el polímero, se conservaron dichas placas recubiertas, a 4 temperaturas en estudio: 298, 323, 333 y 343 °Kelvin (25, 50, 60 y 70° C, respectivamente). Con una periodicidad de 15 días, se evaluaron las placas en el ELISA desarrollado. Brevemente a los pocillos de cada placa se les adicionaron, secuencialmente, anticuerpo antidextrana (obtenido en conejo), anticuerpo antiIgG de conejo y sustrato fluorescente (4-metil-umberiferil-fosfato), con ciclos de lavados entre cada paso, con el lavador de la tecnología SUMA.

Una vez adicionado el sustrato antes referido, este se incubó durante 15 min. a temperatura ambiente y, seguidamente, de cada pocillo de la placa ELISA se transfirieron 20 microlitros de sustrato hidrolizado fluorescente a placas UMELISA de la tecnología SUMA, que permiten la detección de la señal fluorescente, con el empleo de un fluorímetro (355 nm excitación - 450 nm emisión). Con los datos así obtenidos se realizó su procesamiento con la ecuación de Arrhenius.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico del trabajo se empleó la herramienta estadística STATGRAPHIC Centurion (Versión XVII.II), que permitió realizar comparaciones de medias con el estadígrafo t de student, demostración de normalidad de los datos para definir la detectabilidad del método con el empleo de la distribución de frecuencias de valores de fluorescencia del blanco, así como el establecimiento de un modelo matemático obtenido con un diseño factorial 3^4 , así como el óptimo de dicha función.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención del inmunógeno

El inmunógeno, complejo ASB-dextrana se realizó según protocolo de conjugación con peryodato de sodio como agente oxidante, descrito previamente (4), la secuencia de pasos de este proceder, el producto final y los intermediarios del proceso se ilustran en la figura 1. La obtención de los complejos ASB-dextrana, se evidenciaron a través de la realización de electroforesis y la posterior tinción, tanto de Coomassie como con la TPS. La presencia de ambas tinciones en la fracción conjugada y solo la observación correspondiente a la tinción con el azul de Coomassie, en la muestra sin conjugar, son una clara evidencia de la realización exitosa del proceso de conjugación, figura 2.

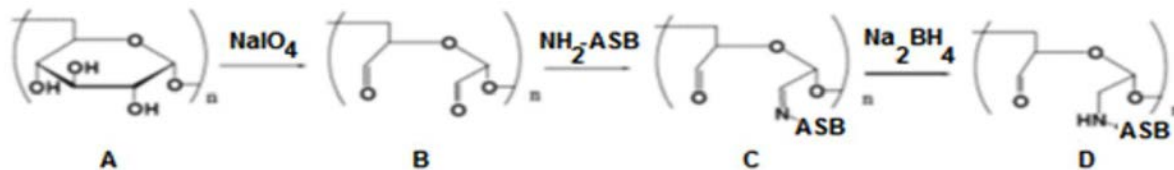


Figura 1. Resumen del diagrama de conjugación con peryodato de sodio, empleado en este trabajo. Residuo de glucosa de la molécula de dextrana(A), glucosa oxidada luego de la reacción con peryodato de sodio (B), producto de la unión de la glucosa oxidada con grupo amino de aminoácido de la molécula de ASB(C), por la reducción del grupo amino de la molécula de ASB fusionada a la glucosa (D).

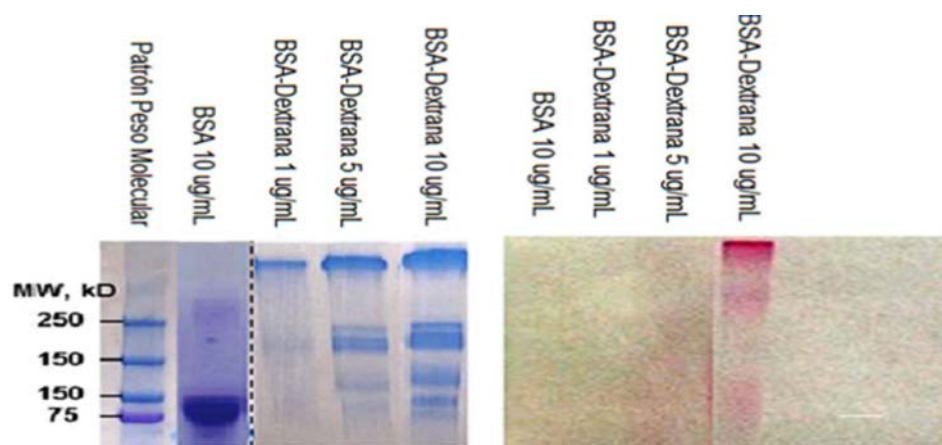


Figura 2: Geles resultantes de la electroforesis, tinción con azul de Coomassie (a la izquierda) y con TPS (a la derecha) de los complejos ASB-dextrana obtenidos.

El inmunógeno obtenido se empleó para inmunizar conejos y desarrollar en ellos una respuesta inmune a la dextrana, caracterizada por un elevado título de anticuerpos IgG, que reconocen el polímero. Estos anticuerpos, obtenidos en el suero de los conejos, se purificaron por afinidad en el laboratorio de toxicología del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) (se tuvo un título de dicha molécula purificada de 1.03 mg/ml) y se emplearon en el ELISA competitivo que se desarrolló en este trabajo.

Desarrollo del ELISA

Evaluación del proceso de obtención de mejor recubrimiento de las placas con el polímero ASB-dextrana

Con relación al proceso inicial de recubrimiento de las placas con el antígeno, debe señalarse que valores bajos de concentración (< 0.2 ppm), para desarrollar el proceso de recubrimiento, fueron en detrimento de la señal obtenida. Este resultado se asoció a cantidades insuficientes del polímero empleado para recubrirse de manera efectiva en las placas. Debe señalarse, además, que valores altos de concentración del antígeno (>20 ppm) también produjeron una disminución de la señal de fluorescencia detectada.

Este resultado de baja señal de fluorescencia para altos valores de concentración del antígeno, en el recubrimiento de las placas, se asocia a la denominada zona de efecto gancho de los ELISA, ampliamente descrita por Zhang (6) y Porstmann (10) y que tiene como base el hecho de que a altas concentraciones del proceso de recubrimiento, en este tipo de inmunoensayo, se dan interacciones no específicas entre las moléculas, que limitan la efectividad del recubrimiento de estas en el pocillo de reacción. La presencia del polímero en el recubrimiento se detectó al adicionar, secuencialmente, anticuerpo policlonal antidextrana, conjugado antiIgG de conejo-fosfatasa alcalina y el sustrato 4-metil-umberiferil-fosfato. En este sustrato empleado, la eliminación del grupo fosfato por la enzima fosfatasa alcalina rindió un producto fluorescente cuya presencia pudo detectarse con el lector de fluorescencia empleado.

El diseño empleado (34, 81 corridas) para la definición de las condiciones óptimas de recubrimiento de las placas, a través de la variable de respuesta, recubrimiento del polímero (RP), se seleccionó al tomar como base aquellas variables que mostraron significación estadística al 95 % de confianza ($p < 0.05$). De las 4 variables analizadas (pH, tiempo de incubación, temperatura y concentración de recubrimiento), solo una se incluyó en el modelo, el tiempo de incubación en el proceso de recubrimiento (Incub Hor), aunque otras dos variables, la temperatura y la concentración del antígeno (también con significación estadística), se incluyeron en el modelo, pero en forma de interacciones, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable de respuesta recubrimiento del polímero (RP)

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Radio-F	Valor de P
A:pH	0.691335	1	0.691335	1.13	0.2904
B: Incub Hor^a	853.631	1	853.631	1399.94	0.0000
C:Temperat ^a	2.30169	1	2.30169	3.77	0.0558
D:Concentr ^a	0.642057	1	0.642057	1.05	0.3082
CC^a	527.944	1	527.944	865.82	0.0000
CD^a	27.9841	1	27.9841	45.89	0.0000
Total error	45.1223	74	0.609761		
Total (corr.)	96833.7	80			

a : En rojo se muestran las variables que tuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$)

La función que describe la relación de las tres variables antes señaladas con la variable respuesta:

$$RP = 5.142 + 0.504^* \text{Incub Hor} + 0.085^* \text{Temperat}^2 - 0.053^* \text{Temperat} * \text{Concentr}$$

Este modelo fue de utilidad para describir la data experimental obtenida, en función de las combinaciones de las variables e interacciones que presentaron significación estadística ($R^2 = 0.926$), así como para la definición de la mejor condición de recubrimiento (máximo de la función). El óptimo fue obtenido con el empleo de la función optimización del programa STATGRAPHIC, para el modelo cuadrático obtenido. Esta condición de óptimo, se obtuvo para la combinación de tiempo de incubación de 18 horas, temperatura de 40° C y concentración de recubrimiento de 2.5 ppm.

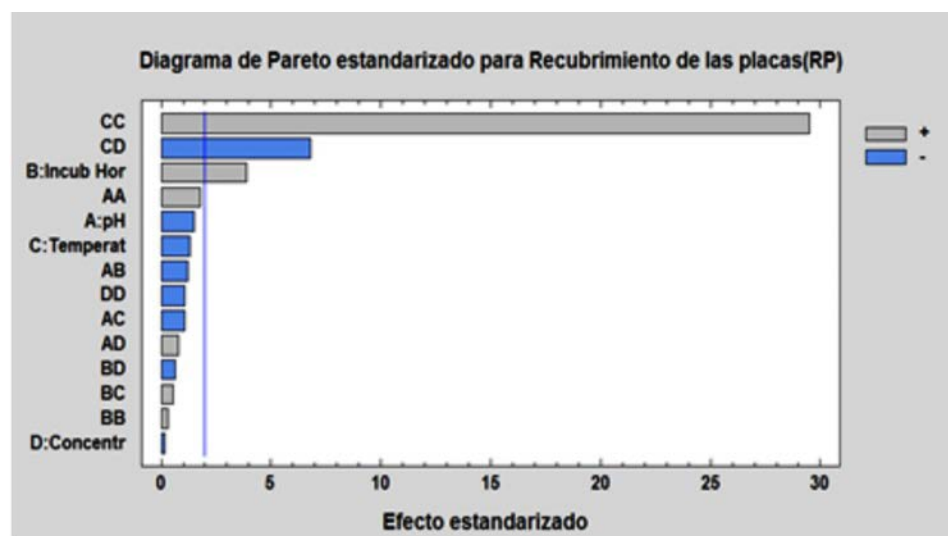


Figura 3. Gráfico de Pareto, análisis de la significación estadística de las 4 variables empleadas. Se aprecia que el tiempo de incubación (Incub Hor, en el gráfico), y las interacciones C² (temperatura x temperatura) y CD (concentración x temperatura), fueron las variables con significación ($p < 0.05$, línea vertical azul en el gráfico).

La aplicación de tales variables para alcanzar el óptimo de la variable respuesta, recubrimiento del polímero (RP), se evaluó en 5 corridas experimentales de este proceso y se alcanzaron valores en el entorno de lo esperado, por lo predicho por el modelo ($RP = 148$ unidades de fluorescencia). Lo anterior evidencia el ajuste a la predicción alcanzada. No se obtuvieron, en este sentido, diferencias significativas en los valores reales obtenidos de estas 5 corridas con el valor esperado por el modelo ($p < 0.05$, para comparación de medias por t de student).

Evaluación de la reproducibilidad, exactitud, detectabilidad y estabilidad de la técnica

En la evaluación de la reproducibilidad del método, la distinción entre intra e interensayo, con el empleo del CV está asociada a que, en primer caso, la SD se define para los valores de muestra que corresponden a una misma placa; en tanto que para el CV interensayo la SD, hace referencia a todos los valores empleados durante los 6 días de ensayos (7). Si se toman como referencia re-

portes previos en este tipo de técnicas (7), se obtuvieron resultados similares a los encontrados, en cuanto a coeficientes de variación intra e interensayo y que se definen como válidos para este tipo de ensayos. El valor de CV intraensayo obtenido fue de 6.74 %, en tanto que el valor para el interensayo fue de 11.26 %.

La exactitud del método se evaluó a través de la comparación de las concentraciones obtenidas, con el empleo del ensayo desarrollado versus el ensayo comercial de LIFESPAN, como referencia. Dos fueron los tipos de muestras analizadas en dicha comparación. El primer tipo de muestra consistió en preparar diferentes concentraciones de dextrana, a partir de la adición de dextrana de 200 000 dalton de peso molecular a un jugo de 0 concentración de dextrana (este valor de 0, fue determinado a través del uso del ELISA comercial).

El segundo grupo de muestras para la evaluación consistió en muestras de diferentes concentraciones de dextrana, obtenidas al hacer reaccionar un sobrenadante, 100 veces concentrado de una cepa recombinante de *Bacillus megaterium*, que expresa la enzima dextrana-sacarasa con una solución de sacarosa a 100 g/l en el buffer de trabajo de esta enzima. La mezcla de reacción descrita (enzima-sustrato-buffer) se incubó durante 18 horas, a 30° C, y la dextrana así sintetizada se ajustó a diferentes niveles de concentración, y se realizaron diferentes diluciones al preparado obtenido.

Como se ilustra en la tabla 2, no existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el título obtenido por ambos ELISA (comercial y desarrollado) para cada una de las muestras evaluadas, lo que evidencia la exactitud del método. En adición a esta prueba, los valores de concentración obtenidos, ya sea por el ensayo desarrollado o por el ensayo comercial, se graficaron en los ejes de las abscisas y ordenadas, respectivamente. Con el gráfico así obtenido, se procedió a realizar una recta de regresión, cuya pendiente se comparó con una pendiente teórica de 1. No se encontraron diferencias significativas entre el valor teórico de 1 y el real obtenido ($p < 0.05$), al establecer como criterio comparativo, entre ambas datas experimentales (desarrollado versus comercial), el criterio estadístico de comparación de rectas de regresión, con el empleo del programa estadístico STATGRAPHIC, que avaló, además, la exactitud del método desarrollado.

La evaluación de la detectabilidad del método se estableció al medir la mínima concentración que este es capaz de detectar (9) y se obtuvo un valor de 0.25 ppm para este parámetro.

Este valor fue establecido a partir de definir el valor de fluorescencia estadísticamente diferente del blanco del ensayo (muestra sin dextrana). En este sentido la adición de 3 SD de las mediciones de fluorescencia correspondientes a 50 mediciones de la muestra blanco a la media de dicha muestra, propició un valor de fluorescencia que, al diferenciarse en 3 SD del blanco, es estadísticamente diferente de este último. Así, la interpolación de esta señal de fluorescencia propició un valor de concentración de 0.25 ppm, que fue diferente al valor del blanco del ensayo, 0 ppm (9, 10).

La estimación de la energía de activación, en función de la pendiente de dichos gráficos, $m = E_a/R$; en la que R , la constante del gas ideal, permitió estimar la estabilidad de las placas recubiertas en función de la temperatura. Tales tiempos se establecieron como 9.47 meses, 5.39 meses y 2.85 meses para las temperaturas de 25, 35 y 45° C, respectivamente.

La estabilidad de las placas recubiertas con el polímero en el ELISA desarrollado, se evaluó con el uso, primeramente, del procesamiento de los datos obtenidos de fluorescencia versus el tiempo en estudio, en semanas, a las diferentes temperaturas evaluadas, figura 4A.

Tal tipo de gráfico permitió establecer el nivel de deterioro de la propiedad analizada (fluorescencia), en función del tiempo, a diferentes temperaturas, dicha afectación está asociada con la pendiente de los gráficos obtenidos ($m = K$). los valores de K , para cada temperatura evaluada, se transformaron, hallaron sus logaritmos neperianos y se graficaron estas transformaciones versus el inverso de las temperaturas en Kelvin, figura 4B.

Tabla 2: Comparación de la concentración de diferentes muestras de dextrana producidas *in vitro* empleando el ELISA desarrollado *versus* el ELISA comercial

No.	Código ^a	ELISA desarrollado			ELISA comercial		Valor de p ^e
		F ^b (450 nm)	I ^c (%)	pp ^m d	DO (405 nm)	ppm ^d	
1	Baja M1 DEX 200	135.41	4.50	18.88	1.91	17.23	0.023
2	Baja M2 DEX 200	133.12	6.22	20.49	1.94	16.14	0.022
3	Baja M3 DEX 200	128.14	9.97	24.20	1.81	22.13	0.015
4	Baja M4 DEX 200	127.14	10.72	24.97	1.83	21.18	0.006
5	Baja M1 SOBREN	123.22	13.66	28.08	1.74	25.14	0.019
6	Baja M2 SOBREN	120.64	15.60	30.19	1.57	33.15	0.021
7	Baja M3 SOBREN	117.22	18.17	33.05	1.7	27.14	0.023
8	Baja M4 SOBREN	116.43	18.77	33.72	1.62	30.64	0.014
9	Media M1 DEX 200	77.67	47.90	66.62	1.02	60.14	0.036
10	Media M2 DEX 200	75.84	49.27	68.03	0.95	64.17	0.044
11	Media M3 DEX 200	75.12	49.81	68.58	0.99	62.14	0.035
12	Media M4 DEX 200	73.14	51.30	70.08	0.82	71.26	0.017
13	Media M1 SOBREN	70.16	53.54	72.27	0.91	66.37	0.032
14	Media M2 SOBREN	67.18	55.78	74.39	0.82	71.21	0.026
15	Media M3 SOBREN	66.26	56.47	75.03	0.79	73.12	0.044
16	Media M4 SOBREN	65.94	56.71	75.25	0.84	69.86	0.031
17	Alta M1 DEX 200	21.37	90.21	96.12	0.47	92.14	0.007
18	Alta M2 DEX 200	18.33	92.49	96.80	0.5	90.18	0.043
19	Alta M3 DEX 200	17.12	93.40	97.05	0.43	95.13	0.033
20	Alta M4 DEX 200	15.18	94.86	97.41	0.46	93.22	0.002
21	Alta M1 SOBREN	14.64	95.27	97.51	0.32	102.15	0.013
22	Alta M2 SOBREN	14.21	95.59	97.58	0.25	106.21	0.037
23	Alta M3 SOBREN	13.92	95.81	97.63	0.46	93.14	0.041
24	Alta M4 SOBREN	13.81	95.89	97.65	0.32	102.15	0.022

a: DEX y SOBREN describen el origen de las muestras evaluadas para definir la exactitud del ensayo, siendo las codificadas con DEX, las que se obtuvieron al adicionar dextrana T200 a un jugo de cero concentración de dextrana, en tanto que SOBREN, hace referencia a las muestras obtenidas al sintetizar dextrana empleando un sobrenadante de un cultivo de *Bacillus megaterium* concentrado 100 veces.

b: F, hace referencia a la fluorescencia de la muestra.

c: I, hace referencia al % de inhibición calculado para la muestra.

d: Hace referencia a los valores de ppm (partes por millón) o ug/ml calculadas para las muestras analizadas por ambos métodos (desarrollado y de referencia).

e: El valor de p hace referencia al valor obtenido de probabilidad, al comparar los valores de concentración obtenidos por ambos métodos, empleando el estadígrafo t de student.

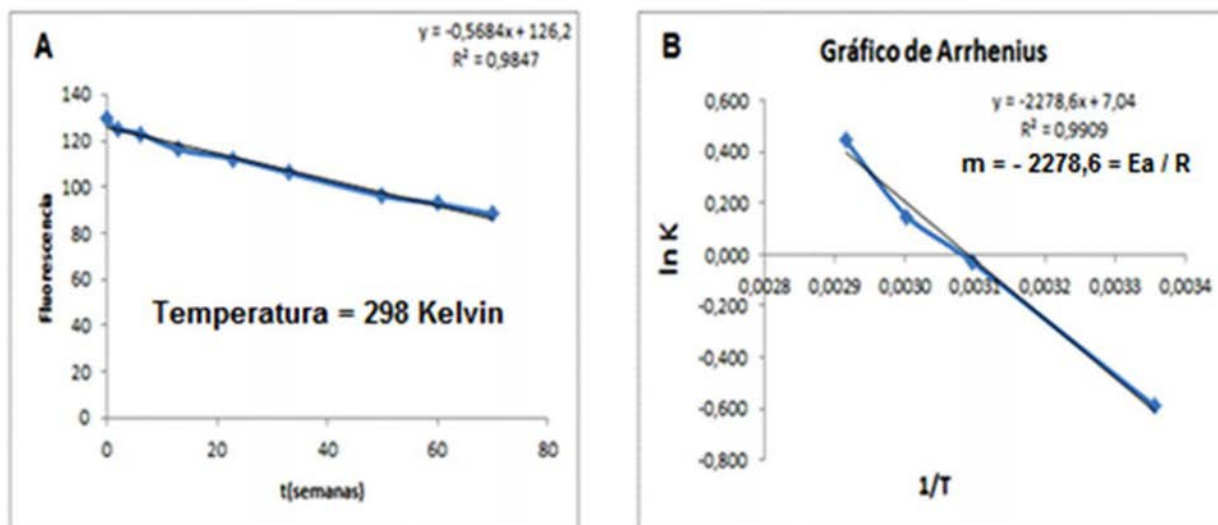


Figura 4. Determinación de la estabilidad de las placas recubiertas por Arrhenius, 4A gráfico de fluorescencia *versus* el tiempo analizado para la medición de la estabilidad para la condición de 25° C, 4B Gráfico de Arrhenius, $\ln K$ (o \ln de las pendientes para las degradación en el tiempo de la fluorescencia estimada para las diferentes temperaturas) *versus* $1/T$, en la que la pendiente de este es el cociente de E_a/R .

Fue de relevancia, en la estimación de la estabilidad por el método de Arrhenius, el hecho de que no se encontraran diferencias significativas (t de student estadígrafo), entre el valor predicho por dicho método, para la fluorescencia a un tiempo y una temperatura dadas y el real obtenido, lo que coloca las placas recubiertas en ese rango de temperatura-tiempo.

CONCLUSIONES

1. Se logró establecer un protocolo de conjugación de ASB a dextrana, con el empleo de peryodato de sodio como agente oxidante, que permitió la obtención de ASB conjugada a dextrana, materia prima fundamental para la obtención de anticuerpos antidextrana en conejos.
2. Se logró desarrollar un ensayo ELISA competitivo, que permite la cuantificación de dextrana, en un amplio rango de concentraciones. En adición se determinaron variables, tales como: la exactitud, la detectabilidad y la reproducibilidad del método, los valores definidos para estas están dentro de los definidos como óptimos para estos tipos de ensayos.
3. Se logró establecer la estabilidad de uno de los componentes del ELISA, con el uso de la ecuación de Arrhenius, que define así tiempos de vida útiles de dicho componente para diferentes temperaturas, estable por 9.47 meses para el caso específico de la temperatura ambiente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Higgings A. Scheduling of road vehicles in sugarcane transport: a case study at an australian sugar mill. *European Journal of Operational Research*. 2006. 987-1000.
2. Aliano A, Melo T, Vaz Pato M. A bi-objective mathematical model for integrated planning of sugarcane harvesting and transport operations. *Computers & Operations Research*. 2021. 216-224.
3. Cuddihy, J, Porro A J, Rauh J S. The presence of total polysaccharides in sugar production and methods for reducing their negative effects. *Journal American Society of Sugar Cane Technologists*. 2001. 73-91.
4. Zhen-Ming X, Li-Sha F, Da-Feng L, Yu Lin Y. Preparation and Characteristic of Dextran-BSA Antibody and Establishment of its Elisa immunoassay, *Chemical Engineering & Process Techniques*. 2014. 186-195.
5. Sheng-Wang Y, Li Z, Jiang Wang X, Yang Y, Zeng LQ, Luo FH, Yan JH, Liang DF. Development of Monoclonal Antibody-Based Sandwich ELISA for Detection of Dextran. *Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy*. 2014. 326-334.
6. Zhang H, Hu Y, Zhu C, Zhu B, Wang Y. Cloning, sequencing and expression of a dextranucrase gene (dex YG) from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biotechnol Lett*. 2008. 1441-1446.
7. Malten M, Hollmann R, Deckwer W D, Jahn, D. Production and secretion of recombinant *Leuconostoc mesenteroides* dextranucrase DsrS in *Bacillus megaterium*. *Biotechnol Bioeng*. 2005. 206-218.
8. Liang D F, Yan J H, Zeng L Q, Wang S Y, Li Y H, Ni E R, and Lin Y. Generation of anti-dextran monoclonal antibody and development of immunonephelometry for quantitative detection of dextran, *Int Sugar J*. 2011. 654-659.
9. Aybay C, Karakup R, Gşkhan A. Development of a Diagnostic and Screening Elisa System for Measuring Tetanus Antitoxoid Levels. *Turk J Med Sci*. 2003. 289-294.
10. Porstmann T, Kiessig ST. Enzyme immunoassay techniques: An overview, *Journal of Immunological Methods* 1992.5-21.