

DESARROLLO DE DOS ENZIMOINMUNOENSAYOS COMPETITIVOS PARA LA DETECCIÓN DE TRAZAS DE SOJA Y DE HUEVO EN PASTAS SECAS

Cellerino K. (1), Rodríguez V.G. (1), Docena G. (2), Polenta G. (3), López L.B. (1)

(1) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica

(2) IIFP, Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

(3) Laboratorio de Compuestos Proteicos, Instituto de Tecnología de Alimentos, INTA.

kcellerino@ffyb.uba.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar dos enzimoimmunoensayos competitivos, uno para detectar presencia de trazas de soja y otro para detectar trazas de huevo en pastas secas. Se trabajó con dos antisueros policlonales de conejo específicos de proteínas de soja (PS) y de proteínas de huevo (PH) como anticuerpos primarios. Para cada enzimoimmunoensayo se determinó la concentración óptima de antígeno a inmovilizar en la placa y la concentración de anticuerpo primario para ser utilizada en la competencia. Se ajustó la curva de calibración utilizando concentraciones crecientes de un extracto de producto de soja o de huevo entero en polvo extraído con buffer Tris-HCL 0,0625M con 3% de SDS y 2% de mercaptoetanol. El rango de trabajo utilizado en el enzimoimmunoensayo para detectar soja fue 15-420ppm PS y para huevo fue 20-630ppm PH con una adecuada linealidad (R_2 : 0,9880 para soja y 0,9564 para huevo). Todos los parámetros de validación estudiados resultaron adecuados. Se analizaron muestras comerciales de pastas secas con estos enzimoimmunoensayos y con kits comerciales de ELISA. Si bien se observaron diferencias importantes en los resultados cuantitativos obtenidos con ambas metodologías, los enzimoimmunoensayos desarrollados se podrían utilizar como métodos de screening.

Palabras clave: enzimoimmunoensayo competitivo, soja, huevo, pastas secas.

ABSTRACT

The aim of this work was to develop two competitive enzyme immunoassays, one to detect the presence of traces of soy and another to detect traces of egg in dry pasta. Two specific rabbit polyclonal antisera raised against soy protein (SP) and egg proteins (EP) were used as primary antibodies. The optimal antigen concentration to be immobilized on the plate and the concentration of primary antibody to be used in competition was determined, for each enzyme immunoassay. The calibration curve was fitted using increasing concentrations of an extract of soy product or whole egg powder. The soy product and the whole egg powder were extracted with Tris-HCl buffer 0,0625M with 3% SDS and 2% mercaptoethanol. The working range used in the enzyme immunoassay to detect soybean was 15-420ppm SP and to detect egg was 20-630ppm EP with adequate linearity (R_2 : 0.9880 and 0.9564 for soy and egg). All validation parameters studied were appropriate. Commercial samples of dry pasta were analyzed with these enzyme immunoassays and with commercial ELISA kits. Significant differences were observed in the quantitative results obtained with both methods; nevertheless, the developed enzyme immunoassays could be used as screening methods.

Keywords: competitive enzyme immunoassays, soy, egg, dry pasta

INTRODUCCIÓN

Se estima que a nivel internacional el 4-8% de los niños y el 2-4% de los adultos sufren de alergias alimentarias. (Ward R, 2015). Existen 8 grupos de alimentos que son responsables del 90% de este tipo de alergias. Estos alimentos son: leche, huevos, soja, trigo, maní, frutos secos, pescados y crustáceos (Poms R et al, 2004).

La declaración obligatoria de alérgenos en los rótulos de los alimentos en Argentina se encuentra en trámite administrativo. En los próximos meses será publicada en el Boletín oficial y la industria dispondrá de un año



para implementarlo (Acta 111, CONAL, 2016).

Ante la necesidad de contar, en nuestro país, con metodología accesible para el control de alérgenos en alimentos, el presente trabajo plantea el desarrollo de dos enzimoimmunoensayos competitivos, uno para detectar presencia de trazas de soja y otro para detectar presencia de trazas de huevo, ambos en pastas secas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras analizadas

Materias primas proteicas

Se trabajó con un producto de soja que supuestamente correspondía a un concentrado de soja, sin embargo el porcentaje de proteínas obtenido por Kjeldahl fue menor al 70% (63% proteína). Por este motivo se hace referencia a producto de soja y no al concentrado de soja (Código Alimentario Argentino, Capítulo XIX, 2016). También se utilizó huevo entero en polvo (44% proteínas) de origen industrial.

Sistemas modelo de pastas secas con agregado de huevo y con agregado de producto de soja

Se analizaron dos sistemas modelo de pastas secas con 300 y 150ppm de proteína de producto de soja o de huevo entero en polvo. Para obtener el sistema modelo con 300 ppm de proteína de soja se le agregó a una pasta seca elaborada con 0,1% de producto de soja pastas secas sin agregado de alérgenos, hasta obtener una concentración de 300 ppm de proteína de soja. El mismo procedimiento se realizó para obtener el sistema modelo de 150 ppm de proteína de soja.

Para obtener los sistemas modelo con 300 ppm y 150 ppm de proteína de huevo entero en polvo se procedió de la misma manera pero se utilizó una pasta seca elaborada con 0,1% de huevo entero en polvo.

Muestras comerciales

Se analizaron ocho muestras comerciales de fideos secos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,8) para el análisis de la presencia de soja. Ingredientes: semolín de trigo pan. Se utilizaron siete muestras de pastas secas comerciales (9, 10, 11, 12, 13, 14,15) para el análisis de la presencia de huevo, estas muestras eran Fideos de sémola de trigo candeal, fusilli. Ingredientes: Sémola de trigo candeal.

Obtención de extractos proteicos a partir de producto de soja, de huevo entero en polvo y de pastas secas

Para la extracción de proteínas se pesaron 30mg del producto de soja y 60mg de huevo entero en polvo. Para la extracción de proteínas de pastas secas se pesaron 200 mg de las mismas. Se agregaron 2mL de la solución extractiva de proteínas totales. Dicha solución contiene Tris-HCL 0,0625M con 3% de dodecilsulfato de sodio (SDS) y 2% de mercaptoetanol (ME). Luego se agitó con varilla. Se calentaron los tubos en baño de agua a 100°C durante 5 minutos. Transcurridos 2 minutos en el baño se volvió a agitar con varilla. Se trasvasó el contenido de los tubos de extracción a tubos de plástico y el producto de soja y el huevo entero en polvo se centrifugaron a 3000rpm durante 15 minutos, en el caso de productos farináceos la centrifugación se realizó a 11000rpm. Los sobrenadantes se conservaron a – 20°C hasta su análisis.

Para la cuantificación de proteínas de soja y huevo de cada extracto y cálculo de la recuperación obtenida se utilizó el método de Lowry (Lowry O et al, 1951).

Puesta a punto de los enzimoimmunoensayos competitivos

Se determinó la concentración óptima de antígeno (extracto de soja o huevo) a inmovilizar en la placa y la dilución óptima de anticuerpo primario (antisuero policlonal de conejo específico de proteínas de soja o de huevo) a utilizar en la competencia. Se empleó antisuero policlonal obtenido en conejos inmunizados con extracto de soja o huevo, obtenidos según Rozenfeld P et al., 2002.

Sensibilización de la placa

La sensibilización se refiere al pegado del antígeno (extracto de soja o huevo) en la placa. Se emplearon placas para microelisa (Maxisorp®, NUNC, Denmark). Para esto se sembraron en la placa 100µL por pocillo de dos concentraciones diferentes de antígeno 10µg de proteína de soja o huevo/100µL o 1µg de proteína de soja o huevo/100µL de buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6 (Buffer Carbonato de Sodio 0,015M, Bicarbonato de sodio 0,035M; pH: 9,6). Luego se incubó en cámara húmeda, en oscuridad a 4°C durante 24 hs. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado (0,9 %p/v NaCl y 0,0125%v/v Tween 20 en agua). Se sembraron 200µL de solución de bloqueo (1%p/v gelatina bovina y 0,1%v/v Tween 20 en TBS) en



cada pocillo. Se incubó una hora en cámara húmeda, en oscuridad a 37°C, con agitación. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. Posteriormente se sembraron 100µL de diferentes diluciones del anticuerpo primario diluido con buffer TBS con 0,1% v/v Tween 20 y 3% polietilenglicol. Se ensayaron diluciones de anticuerpo primario entre 1/156 y 1/10000 en el enzoinmunoensayo para la detección de soja y entre 1/25000 y 1/800000 para la detección de huevo. En los pocillos correspondientes al Blanco (Blanco 1 y Blanco 10) se sembró solamente el buffer utilizado para la dilución del anticuerpo primario. Se incubó una hora en cámara húmeda, en oscuridad a 37°C con agitación. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. Se sembraron 100µL de anticuerpo secundario, Anti IgG conjugado con fosfatasa alcalina de Bio-Rad (el mismo fue obtenido en cabras inmunizadas con IgG purificada de conejo) diluido 1:3000 con buffer TBS con 0,1% v/v Tween 20 y 3% polietilenglicol. Se incubó una hora en cámara húmeda, en oscuridad a 37°C con agitación. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. Se sembraron 100µL de solución de revelado (paranitrofenil fosfato 1mg/mL en un buffer que contenía 10%v/v de Dietanolamina y 0,01% de Cloruro de Magnesio, pH: 9,8). Se incubó 20 minutos en cámara húmeda, en oscuridad a 37°C con agitación. Se midió la absorbancia en un lector de placas de ELISA a 405nm. Los valores de absorbancia fueron corregidos con la absorbancia promedio correspondiente al blanco. Se graficaron las curvas de Absorbancia corregida versus ln 1/dilución del anticuerpo primario utilizando una hoja de cálculo de Microsoft Excel 2010.

Validación del enzoinmunoensayo competitivo para la detección/ cuantificación de soja/huevo en pastas secas

Linealidad

Para la determinación de la linealidad del método se utilizaron concentraciones crecientes de un extracto de producto de soja o de huevo extraído con buffer Tris-HCL 0,0625M con 3% de SDS y 2% de 2-ME. Se trabajó con cinco puntos 0; 0,01; 0,03; 0,1 y 0,3µg proteína de soja o de huevo/mL buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6. Para cada punto de la curva se realizó una dilución del extracto original pero se mantuvo constante la concentración de SDS y de ME. De esta manera los componentes de la solución extractiva fueron diluidos 1:175 en el caso del enzoinmunoensayo para detección de soja y 1:260 para el enzoinmunoensayo para detección de huevo, en todos los puntos de la curva. Las diluciones se realizaron en buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6.

Una vez preparadas las diluciones de la curva se prepararon los preincubados en tubos eppendorf conteniendo 75µL de la dilución del anticuerpo primario seleccionada en la puesta a punto del ensayo, y 75µL de cada una de las diluciones de los puntos de la curva previamente preparadas. Además se preparó un control Inespecífico (I) que contenía 200µL del buffer utilizado para diluir el anticuerpo primario y un control de “unión máxima” (M) que contenía 100µL del buffer utilizado para diluir el anticuerpo primario y 100µL de la dilución del Anticuerpo primario seleccionada en la puesta a punto del ensayo. Se incubaron los preincubados a 4°C en cámara húmeda y oscuridad durante 24 hs. Paralelamente se sensibilizó una placa de ELISA sembrando en la misma la concentración de antígeno (proteína de soja o de huevo) previamente seleccionada en la puesta a punto del ensayo. Luego se incubó en cámara húmeda, en oscuridad a 4°C durante 24 hs. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. Se sembraron 200µL de solución de bloqueo en cada pocillo. Se incubó una hora en cámara húmeda, en oscuridad a 37°C con agitación. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. Posteriormente se sembraron 100µL de los preincubados en los pocillos. Se incubó una hora en cámara húmeda, en oscuridad a 37°C con agitación. Se lavó la placa 5 veces con solución de lavado. Se continuó con el protocolo como se describió previamente en el ítem sensibilización de la placa. Los valores de absorbancia fueron corregidos con la absorbancia promedio correspondiente al control inespecífico I.

A continuación se construyó una curva de calibración Absorbancia corregida versus ln concentración de soja o huevo (µg proteína de soja o huevo/ mL).

Los test utilizados para el análisis estadístico de los resultados fueron: método de Barlett, para homogeneidad de varianzas y análisis de regresión lineal (Box G et al., 1999).

Límite de detección y Límite de cuantificación

Para determinar los límites de detección y de cuantificación del método se utilizó una muestra de pasta seca sin analito (soja/huevo). La misma se extrajo por quintuplicado como se describió anteriormente. Cada



extracto se analizó por duplicado, como se describió anteriormente, realizando previo a la preparación de los preincubados las diluciones 1:175 (soja) y 1:260 (huevo) con buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6 de cada uno de los extractos. La concentración de analito en cada muestra analizada se determinó según cálculo (1). Se calculó el valor medio del analito para la muestra de pastas secas sin analito y el desvío estándar correspondiente. El límite de detección se calculó como el valor medio más tres veces el desvío estándar. El límite de cuantificación se calculó como el valor medio más diez veces el desvío estándar.

(1) Cálculo de la concentración de proteína de soja/huevo en pastas secas:

Por interpolación en la curva de calibración se obtienen los μg de proteína de soja o huevo/mL. Esto corresponde al contenido de soja/huevo en el extracto diluido analizado.

La cantidad de proteína de soja o huevo en $\mu\text{g}/1000\text{mg}$ de pastas secas se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de proteína de soja/huevo en pastas secas } -\mu\text{g}/1000 \text{ mg} = \frac{\text{cantidad de prot. de soja o huevo (curva)}-\mu\text{g}_{(1)} \times \text{V-mL}_{(2)}}{5,7 \text{ ó } 3,8-\mu\text{L}_{(4)} \times \text{P-mg}_{(5)}} \times 1000\text{-mg}_{(3)}$$

(1)

(1) μg de proteína de soja o huevo interpolados en la curva de calibración.

(2) Volumen de sobrenadante al realizar la extracción de pastas secas con solución extractiva de proteínas totales: 1600 μL

(3) 1000mg: para expresar el contenido en 1000mg de pastas secas.

(4) Volumen de extracto que se toma de los 1600 μL de sobrenadante y se diluyen 1:175 (soja) y 1:260 (huevo). 5,7 μL (soja), y 3,8 μL (huevo), se llevan a 1000 μL con Buffer Carbonato/Bicarbonato; pH: 9,6.

(5) Peso de pastas secas que se extrae con solución extractiva de proteínas totales: 200mg.

De esta manera se calculan los μg de proteína de soja / huevo en 1000mg de pastas secas: ppm de proteína de soja/huevo.

Precisión intradía e interdías

Para evaluar la precisión intradía del método se analizaron tres muestras de pastas secas que contenían igual cantidad de analito (para soja 150ppm de proteína de soja y para huevo 300ppm de proteína de huevo). Cada muestra se extrajo por simplificado como se describió anteriormente (n=3). Cada extracto se analizó con el enzimoimmunoensayo por duplicado como se describió anteriormente, realizando previo a la preparación de los preincubados las diluciones 1:175 (soja) y 1:260 (huevo). 5,7 μL (soja) y 3,8 μL (huevo), se llevan a 1000 μL con Buffer Carbonato/Bicarbonato; pH: 9,6.

La concentración de analito en cada muestra analizada se determinó según cálculo (1).

Para el procesamiento estadístico se promediaron los valores de analito de las tres muestras, se calculó el desvío estándar y el coeficiente de variación (CV). El CV corresponde a la precisión del método en el día. Para evaluar la precisión interdías se realizó el mismo procedimiento que se describió previamente en el ensayo intradía en tres días diferentes (n=9). Para el procesamiento estadístico se calculó el promedio, el desvío estándar y el coeficiente de variación (CV) de los nueve valores obtenidos. El CV corresponde a la precisión del método entre días.

Se adoptó como criterio de aceptación que el CV de la precisión intradía y el CV de la precisión interdías no superara el 15%. (Huber L, 2010).

Recuperación

Para evaluar la recuperación del método se analizaron dos sistemas modelo de mezclas de pastas secas con 300 y 150ppm de proteína de soja o huevo. Los mismos se extrajeron por triplicado como se describió anteriormente. Se analizaron por duplicado como se describió, realizando las diluciones 1:175 (soja) y 1:260 (huevo) de cada una de las muestras antes de la preparación de los preincubados. La concentración de analito en cada muestra analizada se determinó según cálculo (1). Se calculó el valor del analito de cada extracto. Se promediaron los tres valores de analito para cada sistema modelo.

El porcentaje de recuperación se calculó mediante la fórmula que se describe a continuación.

$$\% \text{ de recuperación} = \text{valor obtenido} \times 100 / \text{valor teórico}$$



-Valor obtenido: concentración de proteína de soja o huevo obtenida al aplicar el enzimoimmunoensayo para los SM de 300 y 150ppm de proteína de soja o huevo, respectivamente.

-Valor teórico: 300 o 150ppm de proteína de soja o huevo, respectivamente.

Luego se promediaron las recuperaciones de los dos sistemas modelo. Se consideran valores adecuados de recuperación entre 70-130% (Gatti M y Ferretti C, 2010)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Enzimoimmunoensayo competitivo para la detección de trazas de soja en pastas secas

Cuantificación de proteínas de soja en el extracto

La concentración de proteína de soja obtenida en el extracto fue 8,9mg de proteína de soja/mL de solución extractiva. La concentración teórica en dicho extracto era 9,4mg de proteína de soja/mL de solución extractiva. De manera que el porcentaje de recuperación fue 95%, es decir el 95% de las proteínas de soja resultaron solubles en la solución extractiva de proteínas totales.

Puesta a punto del enzimoimmunoensayo competitivo

En la **Figura 1** se observan las dos curvas obtenidas en la puesta a punto del enzimoimmunoensayo competitivo, para la determinación de la concentración óptima de antígeno soja y la dilución de anticuerpo primario a utilizar en el ensayo final.

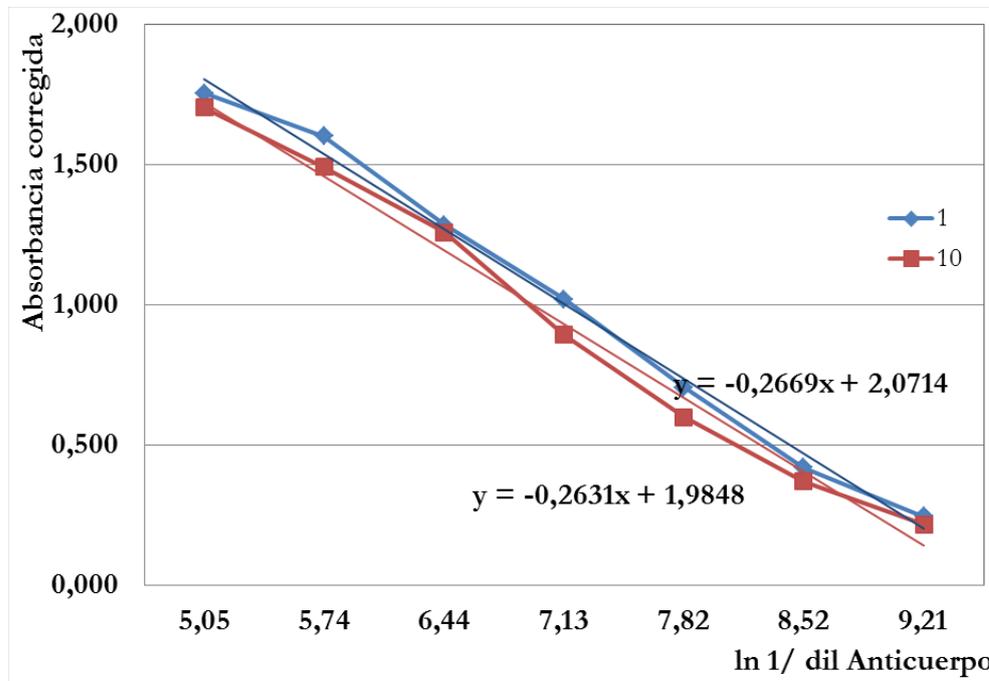


Figura 1: Curvas obtenidas para la determinación de la concentración óptima de antígeno soja y la dilución de anticuerpo primario a utilizar en el enzimoimmunoensayo competitivo final.

En la **Figura 1** se observan las curvas correspondientes a 1µg de proteína de soja /100µL de buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6 y a 10µg de proteína de soja /100µL de buffer Carbonato/ Bicarbonato, pH: 9,6; que se obtuvieron en la puesta a punto del ensayo.

Para la selección de la concentración óptima de antígeno a utilizar en el ensayo se eligió la curva con mayor pendiente. La concentración de antígeno seleccionada fue 1µg de proteína de soja /100µL de buffer Carbonato/ Bicarbonato, pH: 9,6.

Para la selección de la dilución óptima de anticuerpo primario a utilizar en la competencia, se seleccionó en la curva previamente elegida (la correspondiente a 1µg de proteína de soja /100µL de buffer) la zona más



sensible a cambios, obteniendo de esta manera un método con adecuada sensibilidad. La dilución de anticuerpo primario seleccionada para utilizar en la competencia fue de 1/1250. (ln 1/dilución Anticuerpo Primario: 7,13).

Validación

Linealidad

El ME y el SDS son efectivos para la extracción de proteínas. El ME cliva puentes disulfuro formados entre los residuos de cisteína de las proteínas y el SDS facilita la solubilización de las proteínas alterando las uniones no covalentes de las mismas (Watanabe Y et al, 2005). Dado que en este ensayo se utiliza un buffer de extracción que contiene agentes reductores y desnaturalizantes (ME y SDS) que interfieren en la reacción antígeno-anticuerpo se evaluó la dilución de la solución extractiva que no afectara la unión antígeno-anticuerpo. Algunos investigadores han observado que generalmente las concentraciones de este buffer suficientemente diluidas, no influyen en la performance del ensayo (Diaz Amigo C y Popping B, 2010; García E et al, 2005).

Se ensayaron tres diluciones de solución extractiva en buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6 (1:50, 1:100, 1:175) realizando el ensayo inmunoensayo competitivo como se describió previamente. Se observó que los valores de Absorbancia con la dilución 1:175 eran similares a los obtenidos en los pocillos de “unión máxima” (M). En cambio con las diluciones de 1:50 y 1:100 los valores de Absorbancia eran inferiores a los valores correspondientes a M. Esto implica cuantificación de analito en una solución que no la contiene (ensayo competitivo). Los valores menores de Absorbancia se deben a una interferencia de los componentes de la solución extractiva en la unión antígeno – anticuerpo y no a la presencia de analito. De acuerdo con estos resultados para cada punto de la curva se realizó una dilución del extracto original de soja pero se mantuvo constante la concentración de SDS y de ME. Esas concentraciones son las que corresponden a una dilución de la solución extractiva 1:175.

Para establecer linealidad se trabajó con cinco puntos de la curva 0; 0,01; 0,03; 0,1 y 0,3µg proteína de soja/mL (Figura 2). A los valores de Absorbancias corregidas obtenidos para cada nivel de concentración se aplicó un Test de Homogeneidad de Varianzas y no se encontró diferencia significativa entre la varianzas de los distintos niveles analizados.

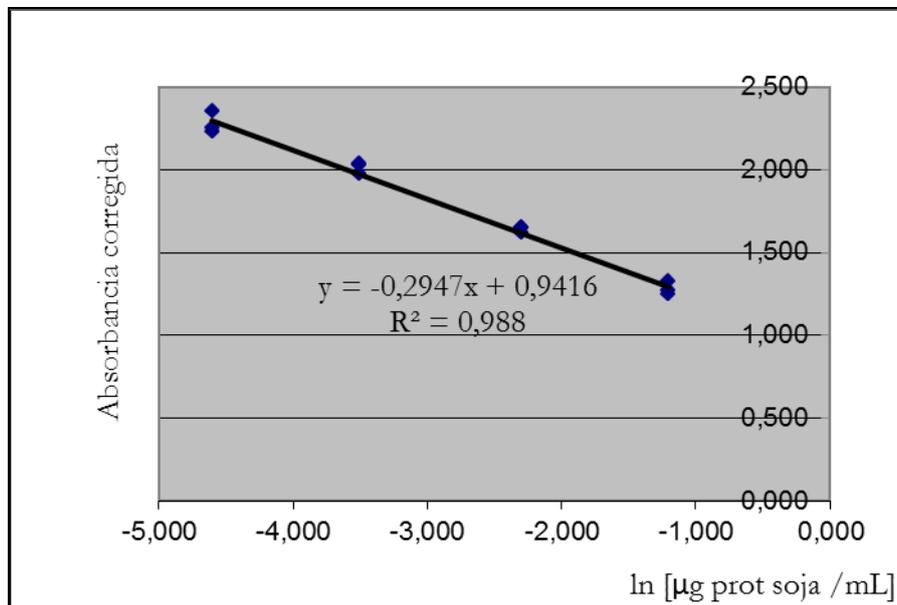


Figura 2: Curva de calibración: Absorbancia corregida en función del ln de la concentración de soja.

Se realizó el test de linealidad sobre los valores de Absorbancia corregida en función del ln de la concentración de soja (µg proteína de soja/mL) utilizando el programa Infostat profesional versión 2004d.1



desarrollado por la Universidad Nacional de Córdoba. Se obtuvo un valor de $F=1,84$ (CM desvío de la linealidad/ CM error puro) y $p=0,2195$ con lo cual se concluyó que el rango 0,01; 0,03; 0,1 y 0,3 μg proteína de soja/mL se comportó en forma lineal. La recta obtenida presentó una pendiente de -0,29 con un límite inferior 95% (LI) de -0,32 y un límite superior 95% (LS) de -0,27, ordenada al origen 0,94 con LI: 0,87 y LS: 1,01 y un coeficiente de correlación de 0,988.

A los valores límites de la curva de calibración (0,01 μg proteína de soja/mL y 0,3 μg proteína de soja/mL) se les aplicó el cálculo (1) presentado anteriormente para calcular el rango de trabajo correspondiente a proteína de soja en pastas secas. El rango de trabajo obtenido fue 15-420ppm de proteína de soja en pastas secas.

Límite de detección y Límite de cuantificación

Los valores de los límites de detección y de cuantificación fueron 47,0 y 76,0 ppm de proteínas de soja, respectivamente.

Precisión intradía e interdías

Las precisiones del método en el día y entre días, expresada como coeficiente de variación (CV) fueron 12,7 (n=3) y 15,0 (n=9), respectivamente. Dichos valores resultaron adecuados.

Recuperación

Se analizaron dos sistemas modelo de pastas secas con 300 y 150ppm de proteína de producto de soja. Los resultados obtenidos para los sistemas modelo fueron 330 y 154, respectivamente. Se calculó la recuperación del método, siendo la misma 106,3%. Esta recuperación resultó apropiada.



Análisis de muestras comerciales

Se analizaron ocho muestras comerciales de pastas secas con el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado y con un kit comercial RIDASCREEN®FAST Soya de R-Biopharm (R-Biopharm RIDASCREEN®FAST Soya, 2011).

En la Tabla N°1 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja en pastas secas, utilizando el kit de R-Biopharm y el enzimoimmunoensayo desarrollado.

Tabla 1: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de soja en pastas secas, utilizando el kit de R-Biopharm y el enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado.

Muestras	R-Biopharm ppm proteína de soja	Enzimoimmunoensayo desarrollado ppm proteína de soja
1	>20,0	<76
2	>20,0	>420
3	>20,0	367±55
4	>20,0	>420
5	14,3±1,1	<76
6	9,7±1,4	<76
7	<2,5	<76
8	<2,5	<76

En las muestras 7 y 8 no se detectó soja con ninguno de los dos métodos. En las muestras 2 y 4 los valores obtenidos son mayores al límite superior de la curva de calibración de cada método. En la muestra 3 con el enzimoimmunoensayo desarrollado se detectaron y cuantificaron proteínas de soja mientras que utilizando el kit de R-Biopharm se obtuvo un valor mayor al límite superior de la curva de calibración (>20ppm de proteína de soja). En las muestras 1, 5 y 6 no se detectó soja con el enzimoimmunoensayo desarrollado y sí se detectó soja con el kit de R-Biopharm. Esto se debe a que la sensibilidad del enzimoimmunoensayo desarrollado es menor que la del kit comercial.

Enzimoimmunoensayo competitivo para la detección de trazas de huevo en pastas secas

Cuantificación de proteínas de huevo en el extracto

La concentración de proteína de huevo obtenida en el extracto de solución extractiva de proteínas totales fue 12,4mg de proteína de huevo/mL de solución extractiva. La concentración teórica en dicho extracto era 12,0mg de proteína de huevo/mL de solución extractiva. De manera que el porcentaje de recuperación fue 103%.

Puesta a punto del enzimoimmunoensayo competitivo

En la **Figura 3** se observan las curvas correspondientes a 1µg de proteína de huevo /100µL de buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6 y a 10µg de proteína de huevo /100µL de buffer Carbonato/ Bicarbonato, pH: 9,6; que se obtuvieron en la puesta a punto del ensayo.



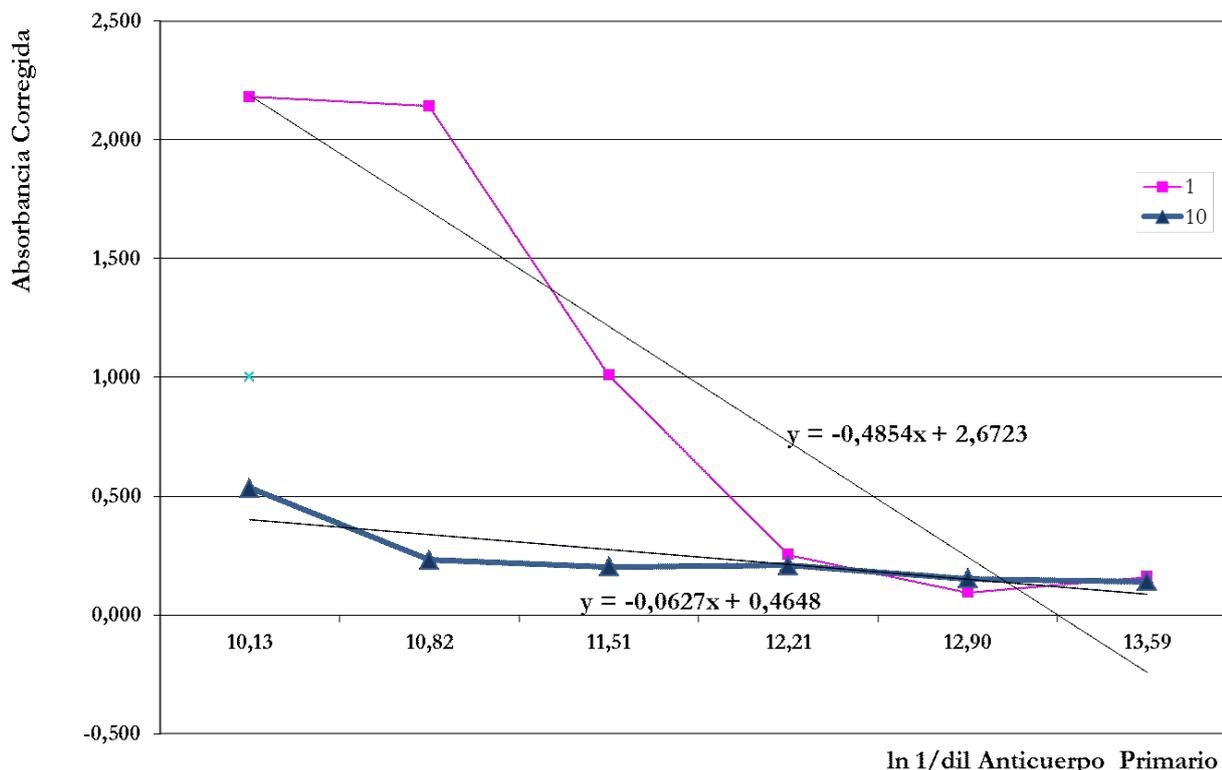


Figura 3: Curvas obtenidas para la determinación de la concentración óptima de antígeno huevo y la dilución de anticuerpo primario a utilizar en el enzoinmunoensayo competitivo final.

La concentración de antígeno seleccionada fue $1\mu\text{g}$ de proteína de huevo / $100\mu\text{L}$ de buffer Carbonato/Bicarbonato, pH: 9,6. La dilución de anticuerpo primario seleccionado para utilizar en la competencia fue de $1/60000$ ($\ln 1/\text{dilución anticuerpo primario} = 11,0$).

Validación

Linealidad

La dilución utilizada para trabajar en este enzoinmunoensayo fue 1:260. En el caso del extracto de huevo se utiliza una dilución diferente a la dilución utilizada para el extracto de soja (1:175) ya que ambos contienen diferentes cantidades de proteínas. El extracto original de soja contiene $8,9\text{mg}$ proteína/mL y el extracto original de huevo $12,4\text{mg}$ de proteína/mL.

Para establecer linealidad se trabajó con cinco puntos de la curva 0; 0,01; 0,03; 0,1 y $0,3\mu\text{g}$ proteína de huevo/mL. A los valores de Absorbancias corregidas obtenidas para cada nivel de concentración se aplicó un Test de Homogeneidad de Varianzas. No se encontró diferencia significativa entre la varianzas de los distintos niveles analizados. Se realizó el test de linealidad sobre los valores de Absorbancia corregida en función del \ln de la concentración de huevo (μg proteína de huevo/mL) utilizando el programa Infostat. Se obtuvo un valor de $F=0,29$ (CM desvío de la linealidad/ CM error puro) y $p=0,7538$ con lo cual se concluyó que el rango 0,01; 0,03; 0,1 y $0,3\mu\text{g}$ proteína de huevo/mL se comportó en forma lineal. La recta obtenida presentó una pendiente de $-0,31$ con un límite inferior 95% (LI) de $-0,35$ y un límite superior 95% (LS) de $-0,26$; ordenada al origen 1,20 con LI: 1,05 y LS: 1,35 y un coeficiente de correlación de 0,9564.



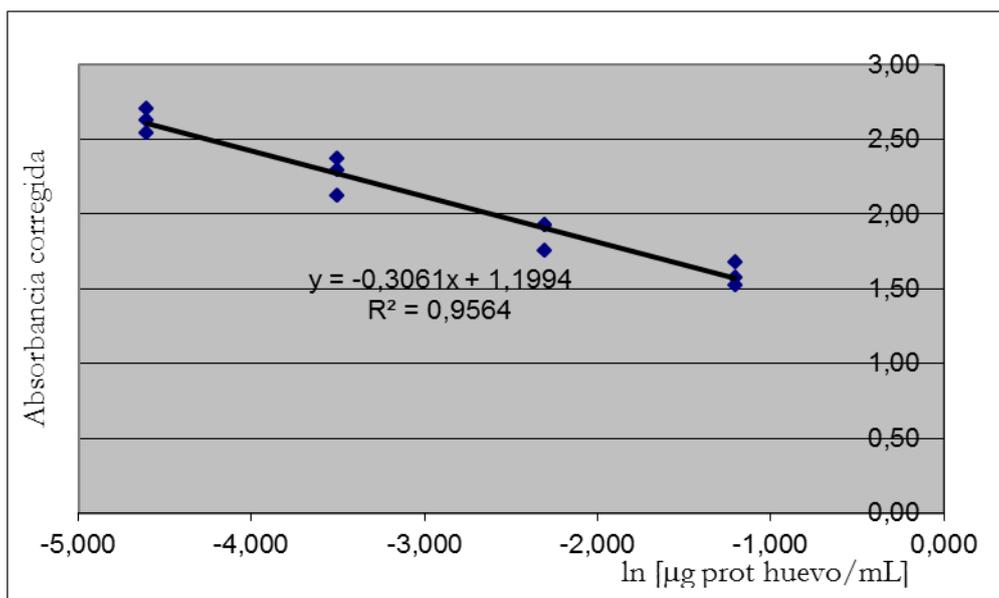


Figura 4: Curva de calibración. Absorbancia corregida en función del ln de la concentración de huevo (μg proteína de huevo/mL). El rango de trabajo fue 20-630ppm de proteína de huevo en pastas secas.

Límite de detección y Límite de cuantificación

Los valores de los límites de detección y de cuantificación fueron 23,0 y 42,0 ppm de proteínas de huevo, respectivamente.

Precisión intradía e interdías

Las precisiones del método en el día y entre días, expresada como coeficiente de variación (CV) fueron 2,7 (n=3) y 6,8 (n=9), respectivamente. Dichos valores resultaron adecuados.

Recuperación

Se analizaron dos sistemas modelo de pastas secas con 300 y 150ppm de proteína de huevo entero en polvo. Los resultados obtenidos para los sistemas modelo fueron 314 y 157 respectivamente. Se calculó la recuperación del método, siendo la misma 104,7%. Esta recuperación resultó apropiada.

Análisis de muestras comerciales

Se analizaron siete muestras comerciales de pastas secas con el enzoinmunoensayo competitivo desarrollado y con un kit comercial de R-Biopharm.

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de proteínas de huevo en pastas secas comerciales, utilizando el enzoinmunoensayo competitivo desarrollado y el kit RIDASCREEN® Ei/Egg Protein de R-Biopharm (R-Biopharm RIDASCREEN® Ei/Egg Protein, 2012).

Tabla 2: Resultados obtenidos en la determinación de proteínas de huevo en pastas secas comerciales, utilizando el enzoinmunoensayo competitivo desarrollado y el kit de R-Biopharm.

Muestras	R-Biopharm ppm huevo entero en polvo	Enzoinmunoensayo desarrollado ppm proteína de huevo
9	<0,5	<45,0
10	>13,5	98,0±9,6
11	>13,5	<45,0
12	>13,5	<45,0
13	>13,5	281,0±14,0
14	>13,5	178,0± 13,0
15	>13,5	<45,0



En la muestra 9 ambos métodos presentaron valores inferiores a los límites de cuantificación respectivos.

En tres muestras (10, 13, 14) fue posible detectar la presencia de trazas de huevo. El enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado presentó valores en el rango de trabajo del ensayo mientras que con el kit de R-Biopharm se superó el valor más alto de la curva de calibración. Sin embargo se deben tener en cuenta los resultados obtenidos en las muestras 11, 12 y 15. El enzimoimmunoensayo competitivo desarrollado no permitió la cuantificación del alérgeno huevo y el kit de R-Biopharm superó el valor más alto de la curva de calibración. Esto se debe a la diferencia que hay en los límites de cuantificación de ambos métodos.

CONCLUSIONES

Este trabajo permite concluir que se podrían utilizar los enzimoimmunoensayos competitivos desarrollados como método de screening. Si una muestra presenta un resultado positivo con estos enzimoimmunoensayos se puede confirmar la presencia de soja o de huevo en dicha muestra. Sin embargo si el resultado obtenido resulta negativo (menor al límite de cuantificación de estos métodos) es necesario confirmar el resultado con el análisis con un kit comercial de soja o de huevo de adecuada sensibilidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Acta N° 111 CONAL. 2016. Disponible en: http://www.conal.gov.ar/actas/Acta_102_AnexoI.pdf. Acceso: Septiembre/2016.
- Box G, Hunter W, Stuart Hunter J. 1999. Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos. Editorial Reverté S.A., México D.F.
- Código Alimentario Argentino, [Capítulo XIX](#). 2016. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XIX.pdf. Acceso: Octubre/2016.
- Diaz Amigo C and Popping B. 2010. Analytical Testing as a Tool for the Enforcement of future Regulatory Thresholds for Food Allergens. *Journal of AOAC International*. 93(2): 434-441.
- Garcia E, Llorente M, Hernando A, Kieffer R, Wieser H, Mendez E. 2005. Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 17(5):529–539.
- Gatti M and Ferretti C. 2010. Chapter 17: Soy Allergen Detection, en Popping B, Diaz Amigo C, Hoenicke K, *Molecular Biological and immunological techniques and applications for food chemists*. John Wiley & Sons, Inc., Canada. pag 335-348.
- Huber L. 2010. Validation of Analytical Methods. Agilent Technologies, Germany. pag 1-65
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem*. 193: 265–275.
- Poms R, Klein C, Anklam E. 2004. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit Contam*. 21(1): 1-31.
- R-Biopharm RIDASCREEN® Ei/Egg Protein. 2012. Disponible en: <http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/4487/R6402-FAST-Ei-Egg-12-04-24.pdf>. Acceso: Septiembre/2016.
- R-Biopharm RIDASCREEN® FAST Soya. 2011. Disponible en: <http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/16632/R7102-FAST-Soya-15-09-09.pdf>. Acceso: Septiembre/2016.
- Rozenfeld P, Docena G, Añón M, Fossati C. 2002. Detection and identification of a soy protein component that cross reacts with caseins from cow milk. *Clin Exp Immunol*. 130(1): 49-58.
- Ward R. 2015. Chapter 1: Introduction to food allergy, en Flanagan S, *Handbook of Food Allergen Detection and Control*. Woodhead Publishing, Cambridge, UK. Pag 1-15
- Watanabe Y, Aburatani K, Mizumurz T, Sakai M, Muraoka S, Mamegosi S, Honjoh T. 2005. Novel ELISA for the detection of raw and processed egg using extraction buffer containing a surfactant and reducing agent. *J Immunol Methods*. 300: 115-123.



AGRADECIMIENTOS

UBACyT 20020120100175BA.

