

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 260**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 16/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2011 PCT/US2011/036518**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2011 WO11143613**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2011 E 11781379 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2569632**

54 Título: **Componentes de pared celular de levadura y detección de los mismos**

30 Prioridad:

14.05.2010 US 334995 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.11.2018

73 Titular/es:

**ALLTECH, INC. (100.0%)
3031 Catnip Hill Pike
Nicholasville, KY 40345, US**

72 Inventor/es:

**MORAN, COLM;
KWIATKOWSKI, STEFAN;
YIANNIKOURIS, ALEXANDROS y
THIELEN, URSULA ANNE**

74 Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

ES 2 691 260 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Componentes de pared celular de levadura y detección de los mismos

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 61/334.995, presentada el 14 de mayo de 2010.

5 Campo de la invención

La invención se refiere a métodos para la detección inmunológica de componentes celulares de levadura.

Antecedentes de la invención

En el campo de la nutrición para animales, se ha empleado una amplia variedad de aditivos y suplementos para mejorar el rendimiento del ganado. En algunos casos, los componentes de pared celular de levadura encuentran uso como aditivos de comida para animales. Un ejemplo es el aditivo de comida MYCOSORB (fabricado por ALLTECH, Inc.). MYCOSORB se une a contaminantes de micotoxinas en alimentos y comida, secuestrando así las micotoxinas en un estado indigerible. Tales contaminantes de micotoxinas se producen habitualmente debido al crecimiento fúngico tanto en el campo como tras la cosecha en cereales, subproductos de cereales y ensilado de maíz usados como componentes de alimentación. Aunque los componentes de comida sin procesar y acabada vendidos comercialmente se someten a la monitorización requerida para detectar micotoxinas, ningún sistema de monitorización es eficaz al 100%. A nivel mundial, se estima que aproximadamente el 25% de todos los cultivos se ven afectados por contaminación por micotoxinas (Council for Agricultural Science and Technology (1989) "Mycotoxins: Economics and Health Risks", Task Force Report No. 116, Ames, IA), y por tanto las incidencias en las que materiales contaminados entran en la cadena de suministro de comida para ganado y para animales de compañía son casi inevitables. Las consecuencias del consumo por parte del ganado de comida contaminada por micotoxinas incluyen reducción del apetito, reducción del crecimiento, reducción de la función reproductora y producción de leche, supresión del sistema inmunitario, alteración de la digestión y, en casos graves, muerte. Por tanto, se ha demostrado que el secuestro de micotoxinas es una estrategia útil para reducir los peligros de toxinas que se producen de manera natural que afectan adversamente a la salud animal y humana.

El desarrollo de kits y métodos analíticos específicos y robustos para la detección cualitativa y cuantitativa de aditivos de comida se ve complicado por la presencia de muchos compuestos que interfieren, y por la concentración relativamente baja de aditivos de comida usados en comida lista para su consumo por animales. Kwiatkowski *et al.*, Journal of the Institute of Brewing, vol. 115, n.º 2, páginas 151-158, 2009, describen diversos, la totalidad de, glucanos de pared de *Saccharomyces cerevisiae*.

30 Sumario de la invención

El objeto de la invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se refiere a métodos para la detección inmunológica de componentes de pared celular de levadura. En algunas realizaciones, se proporciona un método de detección de un componente de pared celular de levadura y/o fragmento del mismo en una muestra (por ejemplo, muestras de comida, muestras de alimento o extractos de las mismas). Un método de este tipo encuentra uso, por ejemplo, en la determinación de la presencia de aditivos de comida y alimentos que comprenden componentes de pared celular de levadura (por ejemplo, glucano de levadura, (1→4)- α -D-glucano de levadura, (1→6)- β -D-glucano de levadura, (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano de levadura, aditivo de comida MYCOSORB, aditivo de comida BIOMOSS, aditivo de comida ACTIGEN y similares) en productos de comida (por ejemplo, comida para ganado, comida para animales de compañía o productos intermedios de fabricación de los mismos).

Por consiguiente, esta invención se refiere a un método para detectar una pared celular de levadura en una muestra, que comprende:

- proporcionar una muestra;
- exponer dicha muestra a un anticuerpo primario que puede unirse a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en (1→4)- α -D-glucano, (1→6)- β -D-glucano y (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano, formando así un complejo anticuerpo primario-antígeno; y
- detectar el grado de unión entre dicho anticuerpo primario y dicho antígeno usando un anticuerpo secundario.

En algunas divulgaciones, la presente solicitud se refiere a métodos para extraer componentes de pared celular de levadura (por ejemplo, glucano de levadura, (1→4)- α -D-glucano de levadura, (1→6)- β -D-glucano de levadura, (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano de levadura, aditivo de comida MYCOSORB y similares) a partir de productos de comida (por ejemplo, comida para ganado, comida para animales de compañía o productos intermedios de fabricación de los mismos). La solicitud da a conocer antígenos que encuentran uso en la producción de anticuerpos frente a componentes de pared celular de levadura específicos (por ejemplo, (1→4)- α -D-glucano de levadura,

(1→6)-β-D-glucano de levadura, (1→4)-α/(1→6)-β-D-glucano de levadura y/o conjugados de los mismos). En algunas divulgaciones, tales antígenos se conjugan con un portador, por ejemplo, un portador proteico (por ejemplo, albúmina sérica bovina (BSA)). En algunas realizaciones, la solicitud da a conocer métodos para la activación de hidratos de carbono (por ejemplo, hidratos de carbono que comprenden anillos de glucopiranososa, glucanos, (1→4)-α/(1→6)-β-D-glucano de levadura) en la(s) posición/posiciones C6-OH. En algunas divulgaciones, tal activación comprende una oxidación leve (por ejemplo, usando dimetilsulfóxido/anhídrido acético). En algunas realizaciones, la solicitud da a conocer anticuerpos que pueden reconocer antígenos de pared celular de levadura (por ejemplo, anticuerpos monoclonales o policlonales que pueden reconocer (1→4)-α-D-glucano de levadura, (1→6)-β-D-glucano de levadura, (1→4)-α/(1→6)-β-D-glucano de levadura o conjugados de los mismos; anticuerpos monoclonales 513A161.1 ó 513A431.1 producidos contra (1→4)-α-D-glucano/(1,6)-β-D-glucano/antígeno de BSA; anticuerpos policlonales producidos contra (1→4)-α-D-glucano/(1→6)-β-D-glucano/antígeno de BSA; o formas purificadas, diluidas, conjugadas y/o mono-específicas de los mismos). Divulgaciones adicionales son kits que comprenden reactivos para la detección de componentes de pared celular de levadura (por ejemplo, glucano de levadura, (1→4)-α-D-glucano de levadura, (1→6)-β-D-glucano de levadura, (1→4)-α/(1→6)-β-D-glucano de levadura, aditivo de comida MYCOSORB y similares) en muestras (por ejemplo, muestras de comida, muestras de alimento o extractos de las mismas).

La muestra es o se deriva de un producto de alimento o comida. Un producto de alimento o comida comprende cualquier material que se consume (por ejemplo, por un animal) que aporta energía y/o nutrientes a la dieta. Los ejemplos de piensos incluyen, pero no se limitan a, ración total mezclada (TMR), forraje(s), gránulo(s), concentrado(s), producto(s) conjunto(s) de premezcla, cereales(s), cereal(es) de destilería, melaza, fibra(s), pasto(s), hierba(s), heno, semilla(s), hojas, harina, producto(s) soluble(s) y suplemento(s). Los piensos y productos alimenticios no están limitados en cuanto a su forma física. Los piensos y productos alimenticios pueden procesarse para obtener un tamaño de partícula menor (por ejemplo, partirse, cortarse, triturarse, molerse o similares); producirse en forma líquida (por ejemplo, extraerse, someterse a ebullición, concentrarse, convertirse en jarabe u otra forma viscosa); o procesarse para obtener un tamaño mayor (por ejemplo, embalsarse, consolidarse, comprimirse o conformarse en formas compuestas, por ejemplo, gránulos, bloques, cuadrados, copos y similares).

La presente invención no está limitada en cuanto al tipo o la naturaleza del método de extracción usado para obtener muestras para análisis. En algunas realizaciones, el material original que va a analizarse (por ejemplo, un producto de alimento o comida; un pienso) se somete a una técnica de extracción para obtener una muestra para su análisis. Las técnicas de extracción incluyen, pero no se limitan a, extracción ácida, extracción alcalina, extracción con disolvente orgánico, extracción con tampón, extracción con sal, extracción con detergente, extracción física (por ejemplo, ebullición, extracción con vapor, extracción a baja temperatura, trituración y similares) o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el material que va a analizarse (por ejemplo, un producto de alimento o comida; un pienso) se extrae usando una combinación de disolvente orgánico y disolución de ácido. En algunas realizaciones, el material que va a analizarse (por ejemplo, un producto de alimento o comida; un pienso) se extrae usando una disolución de dimetilsulfóxido (DMSO) y ácido clorhídrico (HCl).

La presente invención no está limitada en cuanto a la cantidad de analito (por ejemplo, antígeno, componente de pared celular de levadura, glucano de levadura, (1→4)-α-D-glucano de levadura, (1→6)-β-D-glucano de levadura, (1→4)-α/(1→6)-β-D-glucano de levadura, aditivo de comida MYCOSORB y similares) presente en la muestra original. La cantidad de analito puede ser menor de 0,005 mg, 0,005-0,05 mg, 0,05-0,5 mg, 0,5-1 mg, 1-5 mg, 5-10 mg, 10-25 mg, 25 mg o más. La presente invención no está limitada en cuanto a la cantidad de analito (por ejemplo, antígeno, componente de pared celular de levadura, glucano de levadura, (1→4)-α-D-glucano de levadura, (1→6)-β-D-glucano de levadura, (1→4)-α/(1→6)-β-D-glucano de levadura, aditivo de comida MYCOSORB y similares) presente en el material original que va a someterse a prueba. La cantidad de analito detectada puede ser menor de 0,05 kg por tonelada, 0,05-0,5 kg por tonelada, 0,5-1 kg por tonelada, 1,0-2,0 kg por tonelada, 2,0-3,0 kg por tonelada, 3,0-4,0 kg por tonelada, 4,0-5,0 kg por tonelada, 5,0-6,0 kg por tonelada, 6,0-10,0 kg por tonelada, 10 kg por tonelada o más.

La presente invención no está limitada en cuanto a la concentración de trabajo de anticuerpos usados para detectar un analito (por ejemplo, antígeno, componente de pared celular de levadura, glucano de levadura, (1→4)-α-D-glucano de levadura, (1→6)-β-D-glucano de levadura, (1→4)-α/(1→6)-β-D-glucano de levadura, aditivo de comida MYCOSORB y similares). La dilución de trabajo de los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales o policlonales que pueden reconocer (1→4)-α-D-glucano de levadura, (1→6)-β-D-glucano de levadura, (1→4)-α/(1→6)-β-D-glucano de levadura, o conjugados de los mismos; anticuerpos monoclonales 513A161.1 ó 513A431.1 producidos contra (1→4)-α-D-glucano/(1→6)-β-D-glucano/antígeno de BSA; anticuerpos policlonales producidos contra (1→4)-α-D-glucano/(1→6)-β-D-glucano/antígeno de BSA; o formas purificadas, diluidas, conjugadas y/o mono-específicas de los mismos) puede estar más diluida que 1:100.000; de 1:50.000 a 1:100.000; de 1:20.000 a 1:50.000; de 1:10.000 a 1:20.000; de 1:5.000 a 1:10.000; de 1:1.000 a 1:5.000; de 1:500 a 1:1.000; de 1:100 a 1:500; de 1:50 a 1:100; 1:10-1:50; de 1:1 a 1:10; de 2:1 a 1:1; o más concentrada que 2:1.

Adicionalmente se da a conocer una composición inmunogénica que comprende componentes de pared celular de levadura. En algunas divulgaciones un componente de pared celular de levadura comprende glucano de levadura. En algunas divulgaciones, el glucano comprende (1→4)-α-D-glucano de levadura, (1→6)-β-D-glucano de levadura,

(1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano de levadura, o conjugados o derivados de los mismos. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona (1→6)- β -D-glucano de levadura, (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano de levadura conjugado con un portador (por ejemplo, un portador proteico). Los portadores pueden facilitar inmunogenicidad y/o estabilidad en el animal huésped. Los ejemplos de portadores incluyen, pero no se limitan a, albúmina sérica bovina (BSA), hemocianina de lapa californiana (KLH), ovoalbúmina (OVA), tiroglobulina bovina (THY) y antígeno central de la hepatitis B de pato (DHBcAg) (Gathuru *et al.* (2005) Vaccine 23:4727-4733). La divulgación no está limitada en cuanto a la posición de enlace entre el antígeno y un portador. En algunas divulgaciones, el antígeno (por ejemplo, antígeno de hidrato de carbono, glucano, hidrato de carbono que comprende anillo(s) de glucopiranososa, (1→4)- α -D-glucano de levadura, (1→6)- β -D-glucano de levadura, (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano de levadura) está conjugado a un portador en una o más posiciones O-6 con respecto al antígeno. En algunas divulgaciones, el antígeno es (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano de levadura conjugado con BSA en una posición C6.

Los anticuerpos usados en el método de la presente invención no están limitados por la especie huésped en la que se producen. La especie huésped puede ser rata, ratón, cobaya, hámster, conejo, cabra, oveja, pollo, burro, caballo, bovina, canina, felina, porcina, simio, ser humano o cualquier otra especie. Los anticuerpos usados en un método de la presente invención no están limitados en cuanto al régimen de inoculación, método de preparación de antígeno o método de administración de antígeno usados para producir los anticuerpos. El antígeno puede presentarse en presencia o ausencia de agentes inmunoestimulantes (por ejemplo, adyuvantes), tampones, sales, disolventes, compuestos potenciadores de la solubilidad o similares. La especie huésped puede inmunizarse con el antígeno una vez; dos veces; tres veces; cuatro veces; cinco veces, 5-10 veces; 10-20 veces; o más de 20 veces. Los anticuerpos usados en un método de la presente invención no están limitados en cuanto a la clonalidad (por ejemplo, monoclonal, policlonal). Los anticuerpos pueden usarse en forma bruta o purificada. Los anticuerpos pueden ser poliespecíficos o monoespecíficos. En realizaciones preferidas, los anticuerpos usados en el método de la invención pueden reconocer específicamente el antígeno usado para producirlos. En algunas realizaciones preferidas, los anticuerpos usados en un método de la presente invención pueden reconocer específicamente (1→4)- α -D-glucano/(1→6)- β -D-glucano extraído de paredes celulares de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*). En algunas realizaciones preferidas, los anticuerpos usados en un método de la presente invención comprenden anticuerpos policlonales. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales o policlonales usados en un método de la invención pueden reconocer (1→4)- α -D-glucano de levadura, (1→6)- β -D-glucano de levadura, (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano de levadura, o fragmentos, variantes o conjugados de los mismos. En algunas divulgaciones, las composiciones de anticuerpo se unen a (1→4)- α -D-glucano de pared celular de levadura, pero no a restos que contienen (1→4)- α -D-glucano presentes en sustancias distintas de polímeros que contienen (1→4)- α -D-glucano de pared celular de levadura (por ejemplo, (1→4)- α -D-glucano de pared celular de levadura, (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano de pared celular de levadura, o fragmentos, variantes o conjugados de los mismos). Adicionalmente se dan a conocer composiciones de anticuerpo que se unen a (1→6)- β -D-glucano de pared celular de levadura, pero no a restos que contienen (1→6)- β -D-glucano presentes en sustancias distintas de polímeros que contienen (1→6)- β -D-glucano de pared celular de levadura (por ejemplo, (1→6)- β -D-glucano de pared celular de levadura pared celular de levadura, (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano de pared celular de levadura, o fragmentos, variantes o conjugados de los mismos). En algunas divulgaciones, las composiciones de anticuerpo se unen a (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano de pared celular de levadura, pero no a restos que contienen (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano presentes en sustancias distintas de pared celular de levadura (por ejemplo, (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano de pared celular de levadura, o fragmentos, variantes o conjugados de los mismos).

Algunos métodos de detección de antígeno de la presente invención comprenden métodos de inmunodetección. En algunas realizaciones preferidas, los métodos de inmunodetección comprenden ELISA. En algunas realizaciones, se lleva a cabo un ELISA usando una muestra derivada de un material original que va a analizarse (por ejemplo, un producto de alimento o comida; un pienso; un extracto de los mismos) y un anticuerpo primario (por ejemplo, un anticuerpo que puede reconocer un componente de pared celular de levadura; un anticuerpo que puede reconocer un glucano de levadura; un anticuerpo que puede reconocer (1→4)- α -D-glucano de levadura, (1→6)- β -D-glucano de levadura y/o (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano de levadura). En algunas realizaciones, el anticuerpo está directamente unido a una sustancia que puede generar una señal detectable (por ejemplo, una sustancia cromogénica, una sustancia fluorogénica, un isótopo radiomarcado, etc.). En algunas realizaciones, el anticuerpo se asocia directa o indirectamente con otro agente que puede generar una señal detectable (por ejemplo, una sustancia cromogénica, una sustancia fluorogénica, un radiomarcador, un isótopo, etc.).

La solicitud da a conocer kits para la detección de un analito (por ejemplo, un antígeno, un componente de pared celular de levadura, un glucano de levadura, (1→4)- α -D-glucano de levadura, (1→6)- β -D-glucano de levadura y/o (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano de levadura) en una muestra (por ejemplo, un producto de alimento o comida, un pienso, un extracto de los mismos). Los componentes del kit puede incluir, pero no se limitan a, reactivos, tampones de extracción, disolventes, detergentes, agentes de bloqueo, tubos, anticuerpos, patrones, instrucciones y cualquier combinación de los mismos.

En algunas divulgaciones, la solicitud proporciona servicios en los que se obtiene información sobre la concentración de un analito (por ejemplo, un antígeno, un componente de pared celular de levadura, un glucano de levadura, (1→4)- α -D-glucano de levadura, (1→6)- β -D-glucano de levadura y/o (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano de levadura) para

un material original que va a analizarse (por ejemplo, un producto de alimento o comida, un pienso, un extracto de los mismos). En algunas divulgaciones, el análisis se lleva a cabo por un usuario final (por ejemplo, un granjero, un dueño de ganado, un cuidador de ganado, un criador de ganado, un dueño de animales de compañía, un adiestrador de animales de compañía, un criador de animales de compañía, un veterinario, un fabricante de productos de comida o alimentos, un distribuidor de productos de comida o alimentos, un funcionario normativo). En algunas divulgaciones, un usuario final (por ejemplo, un granjero, un dueño de ganado, un cuidador de ganado, un criador de ganado, un dueño de animales de compañía, un adiestrador de animales de compañía, un veterinario, un fabricante de productos de comida o alimentos, un distribuidor de productos de comida o alimentos, un funcionario normativo) envía la muestra o el material original a una tercera parte y la tercera parte lleva a cabo el análisis. En algunas divulgaciones, la tercera parte comunica la información referente a los resultados de análisis a un usuario final (por ejemplo, un granjero, un dueño de ganado, un cuidador de ganado, un criador de ganado, un dueño de animales de compañía, un adiestrador de animales de compañía, un veterinario, un fabricante de productos de comida o alimentos, un distribuidor de productos de comida o alimentos, un funcionario normativo). En algunas divulgaciones, la tercera parte transmite información sobre los resultados del análisis a una cuarta parte.

Realizaciones y divulgaciones adicionales resultarán evidentes para expertos en la técnica relevante basándose en las enseñanzas obtenidas en el presente documento.

Descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un diagrama esquemático de la producción de las fracciones de glucano P1, P2, P3 y S1, S2 y S3 (véase, por ejemplo, el ejemplo 1).

La figura 2 muestra la respuesta de los antisueros de conejo originales y cuatro sobrenadantes de antisueros purificados por afinidad. Se obtuvieron antisueros purificados por afinidad a partir de la separación de anticuerpos específicos para β -(1,6)-glucano (Gab1-Gab4) frente a placas de micropocillos recubiertas con BSA (véase, por ejemplo, el ejemplo 3).

La figura 3 muestra una curva de calibración construida con el uso de anticuerpos de conejo policlonales anti-(1 \rightarrow 4)- α -/(1 \rightarrow 6)- β -D-glucano-BSA purificados generados usando métodos descritos en el presente documento (véase, por ejemplo, los ejemplos 2 y 3).

La figura 4 muestra una curva patrón promedio a partir de 5 ensayos realizada con 6 niveles de inclusión de MYCOSORB en material de comida para ganado vacuno. El eje de las y secundario destaca las precisiones de repetibilidad dentro de un día (% de CV_{intra}) y entre días (% de CV_{inter}) para las curvas patrón.

La figura 5 muestra una curva patrón promedio a partir de 5 ensayos realizada con 6 niveles de inclusión de MYCOSORB en material de comida para pollos. El eje de las y secundario destaca las precisiones de repetibilidad dentro de un día (% de CV_{intra}) y entre días (% de CV_{inter}) para las curvas patrón.

La figura 6 muestra una curva patrón promedio a partir de 5 ensayos realizada con 6 niveles de inclusión de MYCOSORB en material de comida para cerdos. El eje de las y secundario destaca las precisiones de repetibilidad dentro de un día (% de CV_{intra}) y entre días (% de CV_{inter}) para las curvas patrón.

La figura 7 muestra diferencias de lectura de densidad óptica promedio (ΔDO_{450}) del producto que interfiere restado de la señal de producto de MYCOSORB obtenida en comida para pollos para una distribución de múltiples placas de microtitulación (ejemplo 7). Los productos que interfieren se añadieron al 50, 100, 200% (p/p) además del producto de MYCOSORB (100%, 1,0 kg/T).

La figura 8 muestra diferencias de lectura de densidad óptica promedio (ΔDO_{450}) del producto que interfiere restado de la señal de producto de MYCOSORB obtenida en comida para pollos para una distribución de una única placa de microtitulación (ejemplo 7). Los productos que interfieren se añadieron al 50, 100, 200% (p/p) además del producto de MYCOSORB (100%, 1,0 kg/T).

La figura 9 muestra resultados de ensayo ELISA que indican reactividad cruzada de anticuerpo monoclonal 513A161.1 a una concentración de 1:100 (parte superior) o 1:200 (parte inferior).

La figura 10 muestra resultados de ensayo ELISA que indican reactividad cruzada de anticuerpo monoclonal 513A161.1 a una concentración de 1:500 (parte superior) o 1:1000 (parte inferior).

La figura 11 muestra resultados de ensayo ELISA que indican reactividad cruzada de anticuerpo monoclonal 513A161.1 a una concentración de 1:1500 (parte superior) o 1:2000 (parte inferior).

La figura 12 muestra resultados de ensayo ELISA que indican reactividad cruzada de anticuerpo monoclonal 513A431.1 a una concentración de 1:100 (parte superior) o 1:200 (parte inferior).

La figura 13 muestra resultados de ensayo ELISA que indican reactividad cruzada de anticuerpo monoclonal

513A431.1 a una concentración de 1:500 (parte superior) o 1:1000 (parte inferior).

La figura 14 muestra resultados de ensayo ELISA que indican reactividad cruzada de anticuerpo monoclonal 513A431.1 a una concentración de 1:1500 (parte superior) o 1:2000 (parte inferior).

5 La figura 15 muestra lecturas de absorbancia de ensayo ELISA promedio y desviaciones estándar de tres patrones de extracto de pared celular de levadura sembrados en placa o bien sin diluir o bien diluidos 1:1 en PBS o PBS + leche desnatada en polvo al 3% (ejemplo 6).

La figura 16 muestra un gráfico de curvas patrón de extracto de comida para incubaciones de tiempo y temperatura de recubrimiento de microplacas de ELISA descritas en el ejemplo 6.

Definiciones

10 Para facilitar la comprensión de la presente invención, a continuación se definen varios términos y frases:

15 Tal como se usan en el presente documento, los términos “péptido”, “polipéptido” y “proteína” se refieren todos ellos a una secuencia de aminoácidos primaria que están unidos mediante “enlaces peptídicos” covalentes. En general, un péptido consiste en unos pocos aminoácidos, normalmente desde 2-50 aminoácidos, y es más corto que una proteína. El término “polipéptido” abarca péptidos y proteínas. En algunas realizaciones, el péptido, polipéptido o proteína es sintético, mientras que en otras realizaciones, el péptido, polipéptido o proteína es recombinante o se produce de manera natural. Un péptido sintético es un péptido que se produce por medios artificiales *in vitro* (es decir, no se produjo *in vivo*).

20 El término “glicoproteína(s)” o “glicopéptido(s)” se refiere a una proteína o péptido que contiene uno o más residuos de hidrato de carbono unidos de manera covalente a la cadena de polipéptido. El término “selenoproteína(s)” o “selenopéptido(s)” se refiere a una proteína o péptido que contiene uno o más átomos de selenio. Normalmente, se incorporan átomos de selenio en proteínas dentro de aminoácidos que contienen selenio incluyendo selenocisteína y selenometionina.

25 El término “selenoglicoproteína(s)”, “selenoglicopéptido(s)” o “SGP” se refiere a una glicoproteína o glicopéptidos que incorporan uno o más átomos de selenio. Normalmente, las “selenoglicoproteínas” comprenden uno o más aminoácidos que contienen selenio. Las “selenoglicoproteínas” pueden comprender varios hidratos de carbono en cualquiera de varias formas diferentes.

30 Los términos “muestra” y “especímen” se usan en su sentido más amplio y abarcan muestras o especímenes obtenidos a partir de cualquier fuente. Tal como se usa en el presente documento, el término “muestra” se usa para hacer referencia a muestras biológicas obtenidas de animales (incluyendo seres humanos), y abarca fluidos, sólidos, tejidos y gases. En algunas realizaciones de esta invención, las muestras incluyen muestras que contienen material derivado de plantas (ensilado, cereales, comida para ganado procesada, productos de comida en etapas intermedias de fabricación). Sin embargo, estos ejemplos no deben interpretarse como limitativos de los tipos de muestras que encuentran uso con la presente invención.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “levadura” y “células de levadura” se refiere a microorganismos eucariotas clasificados en el reino *Fungi*, que tienen una pared celular, membrana celular y componentes intracelulares. Las levaduras no forman un grupo taxonómico o filogenético específico. Actualmente se conocen aproximadamente 1.500 especies; se estima que tan sólo se ha descrito el 1% de todas las especies de levadura. El término “levadura” se interpreta con frecuencia como sinónimo de *S. cerevisiae*, pero la diversidad filogenética de levaduras se muestra mediante su colocación en las divisiones tanto *Ascomycota* como *Basidiomycota*. El término “levadura” abarca levadura de cerveza, levadura de destilería y levaduras de panadería. Las levaduras de gemación (“levaduras auténticas”) se clasifican en el orden *Saccharomycetales*. La mayoría de las especies de levadura se reproducen de manera asexual mediante gemación, aunque algunas se reproducen mediante fisión binaria. Las levaduras son unicelulares, aunque algunas especies se vuelven multicelulares mediante la formación de una cadena de células de gemación conectadas conocidas como pseudohifas, o falsas hifas. El tamaño de levaduras puede variar en gran medida dependiendo de la especie, midiendo normalmente 3-4 µm de diámetro, aunque algunas levaduras pueden alcanzar más de 40 µm. Tal como se usa en el presente documento, el término “pared celular de levadura” también denominado “YCW” se refiere a la pared celular de un organismo de levadura que rodea a la membrana plasmática y los componentes intracelulares de la levadura. La pared celular de levadura incluye tanto la capa exterior (principalmente manano) como la capa interior (principalmente glucano y quitina) de la pared celular de levadura. Una función de la pared celular es proporcionar estructura y proteger el interior de la levadura (su centro de actividad metabólica). En la pared celular de levadura tienen lugar rutas de señalización y reconocimiento. La composición de la pared celular de levadura varía de una cepa a otra y según las condiciones de crecimiento de levadura.

55 Tal como se usa en el presente documento, el término “extracto de pared celular de levadura” se refiere a la pared celular de levadura de levadura que se ha roto o sometido a “lisis” (por ejemplo, durante una fase de ruptura y lisis) y separado de los componentes intracelulares solubles de la célula de levadura.

Tal como se usa en el presente documento, el término p/p (peso/peso) se refiere a la cantidad de una sustancia dada en una composición basada en el peso. Por ejemplo, una comida para animales que comprende el 0,02% p/p de suplemento alimenticio de comida de la invención significa que la masa del suplemento alimenticio de comida es del 0,02% de la masa total de la comida para animales (por ejemplo, 200 gramos de composición de la invención de suplemento alimenticio de comida en 907.200 gramos de comida para animales).

Tal como se usa en el presente documento, el término “purificado” o “purificar” se refiere a la retirada de componentes a partir de una muestra. Por ejemplo, paredes celulares de levadura o extractos de pared celular de levadura se purifican mediante retirada de componentes distintos de pared celular de levadura (por ejemplo, membrana plasmática y/o componentes intracelulares de levadura); también se purifican mediante retirada de contaminantes o agentes distintos de pared celular de levadura. La retirada de componentes distintos de pared celular de levadura y/o contaminantes distintos de pared celular de levadura da como resultado un aumento del porcentaje de pared celular de levadura o componentes de la misma en una muestra. A nivel molecular, el término “purificado” se refiere a moléculas (por ejemplo, hidratos de carbono, glicoproteínas) que se retiran, aíslan o separan de su entorno natural. Por tanto, un “hidrato de carbono aislado” puede ser un hidrato de carbono purificado. Las moléculas “sustancialmente purificadas” están libres en al menos el 60%, preferiblemente libres en al menos el 75% y más preferiblemente libres en al menos el 90% de otros componentes con los que están asociadas de manera natural. Tal como se usa en el presente documento, el término “purificado” o “purificar” también se refiere a la retirada de contaminantes a partir de una muestra. La retirada de proteínas contaminantes da como resultado un aumento del porcentaje de polipéptido de interés en la muestra. Además, los polipéptidos recombinantes (por ejemplo, glicoproteínas) se expresan en, o se purifican a partir de, células huésped vegetales, bacterianas, de levadura o de mamífero y los polipéptidos se purifican mediante la retirada de proteínas de célula huésped; de ese modo se aumenta el porcentaje de polipéptidos recombinantes en la muestra. Tal como se usa en el presente documento, el término “animal” se refiere a los del reino *Animalia*. Esto incluye, pero no se limita, ganado, animales de granja, animales domésticos, animales de compañía o mascotas, animales marinos y de agua dulce, y animales salvajes.

Tal como se usa en el presente documento, el término, “ganado” también denominado “especie de ganado” y también denominado “ganado doméstico” y también denominado “animales criados con fines comerciales” se refiere a un animal domesticado criado intencionadamente en un entorno agrícola o de acuicultura para producir alimentos o fibra, o para su trabajo o compañía.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “suplemento de alimentos”, “suplemento alimenticio”, “composición de suplemento alimenticio” y similares se refieren a un producto de alimentos formulado como suplemento alimenticio o nutricional que va a usarse como parte de una dieta, por ejemplo como adición a comida para animales. En el presente documento se describen composiciones de suplemento alimenticio a modo de ejemplo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “kit” se usa haciendo referencia a una combinación de reactivos y otros materiales. Se contempla que el kit puede incluir reactivos tales como disoluciones de extracción, anticuerpos y reactivos de detección. No se pretende que el término “kit” se limite a una combinación particular de reactivos y/u otros materiales.

Tal como se usa en el presente documento, el término “tóxico” se refiere a cualquier efecto perjudicial o dañino en un sujeto, una célula o un tejido en comparación con la misma célula o tejido antes de la administración del producto tóxico.

Tal como se usa en el presente documento, el término “secado por congelación” y el término “liofilización” y el término “criodesecación” se refieren a la eliminación de un disolvente a partir de material en un estado congelado mediante sublimación. Esto se logra congelando el material que va a secarse por debajo de su punto eutéctico y después proporcionando el calor latente de sublimación. Un control preciso de la entrada de calor permite secar a partir del estado congelado sin refusión de producto. En la aplicación práctica, el procedimiento se acelera y se controla con precisión en condiciones de presión reducida.

Tal como se usa en el presente documento, el término “polvo de flujo libre seco” se refiere a un polvo seco de flujo libre, por ejemplo un polvo que puede verterse desde un envase, bolsa, recipiente, etc. sin impedimento de grumos grandes.

Tal como se usa en el presente documento, el término “trituration” se refiere a reducir el tamaño de partícula mediante impacto, cizalladura o fricción.

Tal como se usa en el presente documento, el término “lavado” se refiere a la eliminación o limpieza (por ejemplo, usando cualquier tipo de soluto (por ejemplo agua destilada, tampón o disolvente) o mezcla) de impurezas o componente no deseado soluble de una preparación (por ejemplo, un extracto de pared celular de levadura puede lavarse para eliminar componentes distintos de pared celular de levadura a partir de la muestra; un pocillo de una placa de microtitulación puede lavarse para eliminar componentes que no se unen o no se unen específicamente).

Los términos “anticuerpo” o “inmunoglobulina” se refieren a proteínas que se unen a un antígeno específico. Las

inmunoglobulinas incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos y humanizados, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, e incluyen inmunoglobulinas de las siguientes clases: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE e inmunoglobulinas secretadas (sIg). Las inmunoglobulinas comprenden generalmente dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras. Sin embargo, los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina” también abarcan anticuerpos monocatenarios y anticuerpos bicatenarios. Pueden producirse anticuerpos mediante cualquiera de las metodologías conocidas (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Immunology* (1998) John Wiley and Sons, Inc., N.Y.).

El término “antígeno” se refiere a un hidrato de carbono, proteína, glicoproteína, lipoproteína, lípido u otra sustancia que es reactiva con un anticuerpo específico para una parte de la molécula.

Tal como se usa en el presente documento, el término “analito” se refiere a un átomo, una molécula, un agrupamiento de átomos y/o moléculas, una sustancia, o un constituyente químico. Un analito, en sí mismo, no puede medirse, en vez de eso, pueden determinarse aspectos o propiedades (físicas, químicas, biológicas, etc.) del analito usando un procedimiento analítico, tal como HPLC o RMN. Por ejemplo, no puede medirse una “silla” (componente analito) en sí misma, pero pueden medirse la altura, anchura, etc. de una silla. Asimismo, no puede medirse una micotoxina pero puede medirse la señal de micotoxina (por ejemplo, señal cromogénica, señal de fluorescencia) que está relacionada con su concentración.

Los términos “inmunoprecipitación”, “inmunopurificación” y “purificación por afinidad”, y variaciones gramaticales tales como verbos y adjetivos, se refieren al uso de un anticuerpo para separar su antígeno o una parte del mismo a partir de una mezcla de otras moléculas.

El término “inmunodetección” y variaciones gramaticales se refieren al uso de un anticuerpo para identificar la presencia de un antígeno o una parte del mismo a partir de una mezcla de otras moléculas.

El término “tinción” se refiere a cualquiera de varios procedimientos conocidos por los expertos en el campo que se usan para visualizar mejor, distinguir o identificar un(os) componente(s) y/o característica(s) específico(s) de un material (por ejemplo, muestra, muestra de comida, extracción de muestra de comida, célula, células).

El término “inmunofluorescencia” se refiere a una técnica de tinción usada para identificar, marcar, etiquetar, visualizar o volver fácilmente evidente mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, en la que un ligando (habitualmente un anticuerpo) se une a un receptor (habitualmente un antígeno) y tal ligando, si es un anticuerpo, está conjugado a una molécula fluorescente, o el ligando se une entonces a un anticuerpo específico para el ligando, y dicho anticuerpo está conjugado a una molécula fluorescente, en la que dicha molécula fluorescente puede visualizarse con el instrumento apropiado (por ejemplo, un microscopio fluorescente).

El término “determinante antigénico” se refiere a la parte de un antígeno (por ejemplo, un epítipo) que entra en contacto con un anticuerpo particular. Cuando se usa una proteína o fragmento de una proteína para inmunizar a un animal huésped, numerosas regiones de la proteína pueden inducir la producción de anticuerpos que se unen específicamente a una región dada o estructura tridimensional en la proteína; estas regiones o estructuras se denominan determinantes antigénicos. Un determinante antigénico puede competir con el antígeno intacto (el “inmógeno” usado para provocar la respuesta inmunitaria) para unirse a un anticuerpo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “inmunoensayo” se refiere a una prueba cualitativa o cuantitativa destinada a permitir la detección de un antígeno en una muestra. Los inmunoensayos usan normalmente anticuerpos que reconocen antígenos. El anticuerpo que reconoce antígeno puede acoplarse directa o indirectamente a una etapa de visualización, tal como un marcador o enzima cromogénico o fluorogénico. Los ejemplos de inmunoensayos incluyen, pero no se limitan a, ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (“ELISA”), pruebas de flujo lateral, inmunotransferencias de tipo Western, ensayos basados en micropartículas (por ejemplo, ensayos Luminex®), inmunoensayos magnéticos, inmunotransferencias por puntos, inmunoensayos enzimáticos (EIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayos quimioluminiscentes (CLIA), inmunoensayos de recuento (CIA) y similares. Los inmunoensayos pueden ser de competencia o no de competencia.

Tal como se usa en el presente documento, el término “ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas” o “ELISA”, algunas veces denominado “ensayo de tipo sándwich”, se refiere a un tipo específico de inmunoensayo. Normalmente, se absorbe o inmoviliza una cantidad desconocida de antígeno sobre una superficie sólida y se expone a un anticuerpo que puede reconocerlo. Generalmente se determina la cantidad de anticuerpo unido mediante unión directa o indirecta a una enzima fluorogénica o cromogénica. Los tipos de ELISA incluyen, pero no se limitan a, ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA de tipo sándwich, ELISA de competencia y ELISA inverso. Tal como se usa en el presente documento, el término “ELISA” se refiere a ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (o EIA). En la técnica se conocen numerosos métodos y aplicaciones de ELISA, y se describen en muchas referencias (véase, por ejemplo, Crowther, “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)”, en *Molecular Biotechnology Handbook*, Rapley *et al.* (eds.), págs. 595-617, Humana Press, Inc., Totowa, N.J. (1998); Harlow y Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, capítulo 11, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1994)). Además, hay numerosos sistemas de prueba ELISA comercialmente disponibles. Tal como se usan en el presente documento, los términos “alimentos”, “productos alimenticios”, “comida”, “producto de comida”, “piensos” y similares se refieren a cualquier

- material que se consume (por ejemplo, por un animal), que aporta energía y/o nutrientes a la dieta. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, ración total mezclada (TMR), forraje(s), gránulo(s), concentrado(s), producto(s) conjunto(s) de premezcla, cereal(es), cereal(es) de destilería, melaza, fibra(s), pasto(s), hierba(s), heno, semilla(s), hojas, harina, producto(s) soluble(s) y suplemento(s). Los productos alimenticios no están limitados en cuanto a su forma física. Los productos alimenticios pueden procesarse para obtener un tamaño de partícula menor (por ejemplo, partirse, cortarse, triturarse, molerse o similares); producirse en forma líquida (por ejemplo, extraerse, someterse a ebullición, concentrarse, convertirse en jarabe u otra forma viscosa); o procesarse para obtener un tamaño mayor (por ejemplo, embalsarse, consolidarse, comprimirse o conformarse en formas compuestas, por ejemplo, gránulos, bloques, cuadrados, copos y similares).
- 5 Tal como se usa en el presente documento, cuando se usa como sustantivo, un “aditivo” o “suplemento” se refiere a una sustancia o cosa que se añade a, o se incluye de otro modo en, otra sustancia o cosa. Además, tal como se usa en el presente documento, cuando se usan como sustantivo, los términos “aditivo” o “suplemento” pueden usarse de manera intercambiable cuando se refieren a “aditivos” o “suplementos” que se mezclan en comida para animales antes de alimentarse a un animal.
- 10 Tal como se usa en el presente documento, el término “glucano” se refiere a cualquier polímero de hidrato de carbono que contiene glucosa. En algunas realizaciones, los glucanos son polímeros de D-glucosa sin limitación en cuanto al grado de polimerización, asociación covalente o no covalente con otros polímeros, o composición exacta en hidratos de carbono. A lo largo de toda la longitud de un polímero de glucano, las unidades de D-glucosa pueden participar en enlaces α , enlaces β o enlaces tanto α como β .
- 15 Tal como se usa en el presente documento, el término “hidrato de carbono” se usa para hacer referencia a un compuesto orgánico con la fórmula general $C_m(H_2O)_n$. Un hidrato de carbono consiste únicamente en átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno mediante lo cual los átomos de hidrógeno y oxígeno están en una razón atómica de 2:1.
- 20 Tal como se usa en el presente documento, el término “señal” se usa generalmente haciendo referencia a cualquier procedimiento detectable que indica que se ha producido una reacción, por ejemplo, unión de anticuerpo a antígeno. Se contempla que las señales en forma de radiactividad, productos/reactivos fluorimétricos o colorimétricos encontrarán uso con la presente invención. En diversas realizaciones de la presente invención, la señal se evalúa de manera cualitativa, mientras que en realizaciones alternativas la señal se evalúa de manera cuantitativa.
- 25 Tal como se usa en el presente documento, el término “soporte sólido” se usa haciendo referencia a cualquier material sólido o estacionario al que se unen reactivos tales como anticuerpos, antígenos y otros componentes de prueba. Por ejemplo, en un método ELISA, los pocillos de placas de microtitulación proporcionan soportes sólidos. Otros ejemplos de soportes sólidos incluyen portaobjetos de microscopios, cubreobjetos, perlas, partículas, matraces de cultivo celular, así como cualquier otro artículo adecuado.
- 30 Los términos “unión específica” y “unirse específicamente”, cuando se usan haciendo referencia a la interacción entre un anticuerpo y un antígeno, describen una interacción que depende de la presencia de una estructura particular (es decir, el determinante antigénico o epítipo) en el antígeno. Dicho de otro modo, el anticuerpo reconoce y se une a una estructura de proteína única para el antígeno, en vez de unirse a todas las proteínas en general (es decir, unión no específica).

Descripción detallada de la invención

- 40 La pared celular de levadura (YCW) comprende una estructura compleja que incluye dos componentes de polisacárido principales: (1→2)(1→3)(1→6)- α -D-manano y (1→3)(1→6)- β -D-glucano. Estos polisacáridos están conectados a las proteínas de YCW a través de uniones O y N-glicosídico, tal como se comenta en una revisión publicada recientemente (Lesage *et al.* (2006) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:317-343). A una escala industrial, normalmente YCW se separa o se extrae a partir de organismos de levadura sometidos a lisis mediante centrifugación y lavado tal como se notifica por D.A. Howes y K.E. Newman (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.045.834). En esta etapa, YCW no es soluble en agua. El tratamiento enzimático y químico posterior de la YCW primaria modifica la estructura de polisacáridos y proteínas, haciendo así que estos componentes de YCW sean al menos parcialmente solubles en agua y en dimetilsulfóxido “DMSO”. La composición de las partes solubles e insolubles del producto depende de las condiciones del procedimiento.
- 45 Los inmunoensayos comprenden técnicas analíticas sensibles que encuentran uso con tales mezclas complejas no homogéneas. En algunas realizaciones de método de la presente invención, anticuerpos de un animal que se ha inmunizado con un antígeno que contiene (1→6)- β -D-glucano de levadura que interconecta todos los componentes estructurales principales de la pared celular (véase, Kollár *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:17762-17775) reconocen este polisacárido, permitiendo establecer inmunoensayos robustos y sensibles. En algunas realizaciones de la presente invención, un inmunoensayo cuantitativo (ELISA) permite el análisis de un aditivo nutricional derivado de YCW, MYCOSORB (ALLTECH, Inc.), en muestras de comida para animales. Un ensayo para detectar (1→6)- β -D-glucano de YCW es muy específico en la cuantificación de YCW, dado que (1→6)- β -D-glucano es muy poco frecuente entre los hidratos de carbono vegetales. Por tanto, los anticuerpos dirigidos contra este polisacárido de

YCW no interaccionan significativamente con polisacáridos vegetales presentes en la comida para animales, garantizando un bajo fondo del ensayo.

La solicitud da a conocer métodos para: 1) separación de un (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano soluble a partir de pared celular de levadura (véase, Kwiatkowski *et al.* (2009) J. Instit. Brew. 115:1031, y Arvindekar *et al.* (2002) Yeast 19:131-139), por ejemplo, como antígeno para la preparación de anticuerpos que reconocen (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano de levadura; oxidación de grupos hidroxilo de este polisacárido en la posición C-6 de anillos de glucopiranosos con reactivo de Pfitzner-Moffat (véase, Pfitzner *et al.* (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:3027), con el fin de convertirlos en grupo aldehído (véase, Zekovic *et al.* (2006) Chem. Papers 60:243-248); y el uso de esta forma oxidada de (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano en la reacción de aminación reductiva (véase, Abdel-Magid *et al.* (1996) J. Org. Chem. 61:3849-3862) con los residuos de lisina de la albúmina sérica bovina (BSA), para producir un conjugado de polisacárido-proteína. La solicitud da a conocer métodos para la separación y purificación (por ejemplo, usando intercambio iónico, DEAE-celulosa y tampones de Na₂HPO₄ de diferente concentración iónica) de conjugado de (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano-BSA, que se usa como inmunógeno soluble en la inmunización de animales (por ejemplo, conejos) (véase, Howard *et al.* (2001) Basic Methods in Antibody Production and Characterization, CRC Press, págs. 11-18 y 31-50). Adicionalmente se dan a conocer métodos para la preparación de resina de fase de afinidad recubierta con BSA (véase, Matejtschuk (1997) Affinity Separations: a Practical Approach, Oxford University Press) y su uso en la absorción de anticuerpos específicos para BSA a partir de sueros de conejo que contienen anticuerpos tanto específicos para BSA como específicos para (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano. En algunas realizaciones de la presente invención, métodos para la conjugación de polisacáridos a proteínas encuentran uso en la producción de vacunas para seres humanos y animales, ya que tales métodos conservan la estructura original del polisacárido y no modifican su extremo reductor como lo hacen los métodos de conjugación típicos (véase, la patente estadounidense n.º 6.596.861).

Glucanos de pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*

Los glucanos son prevalentes entre los polisacáridos de pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (véase, Kwiatkowski *et al.* (2009) J. Instit. Brew. 115:151-158). Las funciones de (1→3)- β -D-glucano en el mantenimiento de la forma y rigidez de la pared celular de levadura (véase, Klis *et al.* (2006) Yeast 23:185-202; Lesage *et al.* (2006) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70:317-343) y del (1→6)- β -D-glucano como polisacárido que une entre sí todos los polisacáridos de pared celular están documentadas (véase, Amaniada *et al.* (2009) J. Biol. Chem. 284:13401-13412; Kollár *et al.* (1997) J. Biol. Chem. 272:17762-17777; Klis *et al.* (2002) FEMS Microbiology Rev. 26:239-256). La presencia de (1→4)- α -D-glucano de tipo glucógeno soluble e insoluble en las células de *S. cerevisiae* que se hacen crecer de manera aerobia se mencionó frecuentemente en la bibliografía inicial sobre levaduras (véase, Gunja-Smith *et al.* (1974) Biochem. Biophys. Res. Com. 56:588-592; Grba *et al.* (1975) Appl. Microbiol. Biotechnol. 2:29-37), y se han identificado dos formas de glucógeno sintetasa (véase, Gunja-Smith *et al.* (1977) J. Bacteriol. 130:818-825; Rothman-Denes *et al.* (1970) PNAS 66:967-974). El glucógeno es el hidrato de carbono de reserva de energía acumulado por *S. cerevisiae*, que puede movilizarse durante periodos de inanición de levadura. Es un polímero de α -D-glucosa con un peso molecular de $\sim 10^8$ y una estructura ramificada con 10-14 residuos de α -D-glucosa unidos mediante enlaces 1→4 (véase, Aklujkar *et al.* (2008) J. Instit. Brew. 114:205-208; Boulton *et al.* (2001) The Biochemistry of Fermentation. En: Brewing Yeast and Fermentation, Blackwell Science, Iowa, págs. 89-92).

El contenido en (1→4)- α -D-glucano en la pared celular de levadura puede variar entre tan sólo el 1% (véase, Lille *et al.* (1980) J. Bacteriol. 143:1384-1394) hasta el 29% (véase, Sedmak *et al.*, solicitud de patente estadounidense n.º 2006/0263415) del peso seco, dependiendo del estado nutricional de las células, el método de aislamiento, las condiciones del entorno y el momento en el que se recogieron las células (véase, Lille *et al.* (1980) J. Bacteriol. 143:1384-1394). Las células de levadura de cerveza producidas de manera industrial (véase, Sedmak *et al.*, solicitud de patente estadounidense n.º 2006/0263415) contenían glucanos a una concentración del 28,9% de peso seco (p.s.), lo cual incluía el 12,4% p.s. de (1→4)- α -D-glucano. Cuando se trataron estas células con proteasa alcalina, el componente de pared celular insoluble en agua contenía el 54,5% p.s. de glucanos y más de la mitad del peso de (1→4)- α -D-glucano (el 29,2% p.s.).

En 2002, Arvindekar y Patil (véase, Arvindekar *et al.* (2002) Yeast 19:131-139) propusieron una explicación para la presencia de la fracción insoluble que otros han definido como glucógeno de levadura "difícil de eliminar mediante lavado" (véase, Fleet *et al.* (1976) J. Gen. Microbiol. 94:180-192) dentro de la pared celular de levadura, basándose en su hallazgo de que (1→4)- α -D-glucano se une de manera covalente a (1→6)- β -D-glucano. Sin embargo, esto no concordaba con el artículo de 1997 publicado por Kollar y colaboradores (véase, Kollár *et al.* (1997) J. Biol. Chem. 272:17762-17775) y con el trabajo publicado por Amaniada y colaboradores (véase, Amaniada *et al.* (2009) J. Biol. Chem. 184:13401-13412) sobre la función y la estructura del (1→6)- β -D-glucano dentro de la pared celular de levadura. De manera notable, los hallazgos de Arvindekar y Patil requirieron una verificación estructural, ya que los autores trabajaron con fracciones diminutas procedentes de hidrólisis enzimática de la pared celular de levadura y no usaron RMN para la cuantificación o asignaciones estructurales para sus productos separados. En experimentos llevados a cabo durante el transcurso del desarrollo de realizaciones de la invención, se desarrollaron métodos de separación a gran escala para el aislamiento de polisacárido de (1→4)- α -D-glucano/(1→6)- β -D-glucano mixto a partir de pared celular de *S. cerevisiae*, y se estableció la estructura de este producto usando espectroscopía de RMN.

Comida y alimentos para animales

La comida para animales es cualquier producto alimenticio que se usa específicamente para alimentar a ganado domesticado (por ejemplo, vacas, cabras, ovejas, caballos, aves de corral, búfalos, alpacas, llamas, burros, mulas, conejos, pollos, gansos, pavos y cerdos). Las comidas para animales incluyen con frecuencia heno, paja, ensilado, comidas comprimidas y granuladas, aceites y raciones mezcladas, y también cereales germinados y legumbres. La industria a nivel mundial de comida para animales consumió 635 millones de toneladas de comida en 2006, con una tasa de crecimiento anual de aproximadamente el 2%. El uso de terreno agrícola para cultivar comida en vez de alimentos para seres humanos puede ser controvertido; algunos tipos de comida, tales como maíz, también pueden servir como alimentos para seres humanos, mientras que otros, tales como la hierba, no. Además de proporcionar una fuente de energía para animales, las comidas para animales también proporcionan nutrientes (por ejemplo selenio) usados por el organismo. Las comidas para animales se mezclan con frecuencia con suplementos y/o aditivos (por ejemplo, MYCOSORB) antes de alimentarse a un animal.

Métodos de inmunodetección

La invención proporciona métodos para la detección de sustancias en muestras, comprendiendo tales métodos ensayos de inmunodetección o inmunoensayos. Un inmunoensayo (ensayo de inmunodetección, método de inmunodetección) implica el uso de un anticuerpo para la detección (visualización, identificación cualitativa, detección cuantitativa) de una sustancia (por ejemplo, antígeno) a la que se une el anticuerpo. Un antígeno reconocido por un anticuerpo puede ser una macromolécula o un fragmento de la misma (por ejemplo, polímero, hidrato de carbono, glicoproteína, proteína, resto o monómero de los mismos). Por ejemplo, algunos métodos de la presente invención encuentran uso en la detección de glucanos de pared celular de levadura (por ejemplo, (1→4)- α -D-glucano, (1→6)- β -D-glucano y/o (1→4)- α /(1→6)- β -D-glucano).

Numerosos inmunoensayos encuentran uso en la detección cualitativa o cuantitativa de sustancias (por ejemplo, sustancias encontradas a baja concentración, sustancias presentes en mezclas complejas, sustancias de hidratos de carbono, (1→4)- α -D-glucano de levadura, (1→6)- β -D-glucano de levadura, (1→4)- α /(1→6)- β -D-glucano de levadura). Los tipos de inmunoensayos incluyen, pero no se limitan a, ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), pruebas de flujo lateral, inmunotransferencias de tipo Western, ensayos basados en micropartículas (por ejemplo, ensayos Luminex®), inmunoensayos magnéticos, inmunotransferencias por puntos, inmunoensayos enzimáticos (EIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayos quimioluminiscentes (CLIA), inmunoensayos de recuento (CIA) y similares (véase, por ejemplo, Wild *et al.* (2005) "The Immunoassay Handbook, 3ª ed.", Elsevier Ltd., Oxford, R.U.). Los inmunoensayos pueden ser de competencia o no de competencia.

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, "ELISA", se ha usado como herramienta de diagnóstico en medicina y fitopatología, así como comprobación de control de calidad en diversas industrias. En un ejemplo de un ELISA típico incluye una molécula de sonda que se inmoviliza en primer lugar en una microplaca de poliestireno u otra superficie. A continuación, se aplica y se incuba un agente de bloqueo tal como BSA. Se hace que una muestra biológica u otra que contiene una molécula diana específica (con frecuencia una proteína) de concentración desconocida entre en contacto con la molécula de sonda inmovilizada. Si está presente, la molécula diana se captura por la sonda de manera proporcional a la concentración de la molécula diana. A continuación, normalmente se lava la superficie con una disolución de detergente leve para retirar cualquier molécula que no esté unida específicamente. A continuación, se aplica una molécula adicional, tal como un segundo anticuerpo, para formar un complejo de tipo "sándwich" con la sonda de captura, la molécula diana y la sonda detectora marcada. La segunda molécula se denomina con frecuencia sonda detectora o anticuerpo detector, y habitualmente se une de manera covalente a una enzima, hapteno u otra molécula de marcaje.

Tras una etapa de lavado final se revela la placa añadiendo un conjugado que se une al anticuerpo detector marcado y contiene un sustrato enzimático, reactivo de detección marcado de manera fluorescente, o una variedad de otros indicadores. El indicador produce una señal detectable proporcional a la cantidad de antígeno diana en la muestra. Normalmente, los ELISA se leen usando un lector de placas colorimétrico o fluorescente y dan como resultado una única medida de analito diana por pocillo. Otras variantes del ensayo ELISA incluyen, pero no se limitan a, ELISA indirecto, de competencia o inverso (véase, por ejemplo, Crowther *et al.* (2008) "The ELISA Guidebook, 2ª ed.", Humana Press).

En muchos casos, se realizan ELISA en microplacas que se hace que coincidan con un formato normalizado que permite su procesamiento mediante un instrumento automatizado. Estas normas se establecen por la Sociedad de ciencias biomoleculares (SBS) y se conocen como normas de SBS. Según las normas de SBS, la "huella" para una placa de múltiples pocillos es de aproximadamente 85 mm x 125 mm con pocillos ubicados en un formato de posiciones especificado dependiendo del número total de pocillos. El Instituto nacional estadounidense de estándares (ANSI) ha publicado las normas de SBS para microplacas como: "dimensiones de huella" (ANSI/SBS 1-2004), "dimensiones de altura" (ANSI/SBS 2-2004), "dimensiones de reborde exterior inferior" (ANSI/SBS 3-2004) y "posiciones de pocillos" (ANSI/SBS 4-2004). Lo más habitualmente, los usuarios de ELISA emplean 96 pocillos en una única placa. Alternativamente, cuando se necesitan menos de 96 pocillos en un ensayo, pueden emplearse

hasta doce "tiras" de 8 pocillos de manera que sólo una parte de los 96 pocillos se usan a la vez.

Servicios de pruebas

5 En algunas realizaciones, se usa un programa de análisis basado en ordenador para traducir los datos sin procesar generados por un ensayo (por ejemplo, inmunoensayo, ELISA) (por ejemplo, la presencia, ausencia o cantidad de un antígeno) (por ejemplo, (1→4)- α -D-glucano de levadura, (1→6)- β -D-glucano de levadura, (1→4)- α -/(1→6)- β -D-glucano de levadura) para dar datos con valor predictivo para un usuario final (por ejemplo, un criador o cuidador/adiestrador de ganado o animales de compañía, un veterinario, un granjero, un consumidor). El usuario final puede acceder a los datos predictivos usando cualquier medio adecuado. Por tanto, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona el beneficio adicional de que el usuario final, que no es probable que tenga formación en el análisis de inmunoensayos, no necesita entender los datos sin procesar. Los datos se presentan directamente al usuario final en su forma más útil. Entonces, el usuario final puede usar inmediatamente la información con el fin de optimizar el cuidado del sujeto (por ejemplo, ganado o animal de compañía).

15 La presente invención contempla cualquier método que puede recibir, procesar y transmitir la información referente a muestras hacia y desde laboratorios que llevan a cabo los ensayos. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente invención, se obtiene una muestra (por ejemplo, una muestra de comida, un extracto de muestra de comida) y se envía a un servicio de elaboración de perfiles (por ejemplo, laboratorio, etc.), ubicado en cualquier parte del mundo (por ejemplo, en un país igual o diferente del país en el que reside el sujeto o en el que se usa en última instancia la información) para generar datos sin procesar. El usuario final puede hacer que una tercera parte obtenga la muestra (por ejemplo, extracto de comida) y la envíe al centro de elaboración de perfiles, o los sujetos pueden recoger la muestra por sí mismos y enviarla directamente a un centro de elaboración de perfiles. Cuando la muestra comprende información anteriormente determinada, el usuario final puede enviar directamente la información al servicio de elaboración de perfiles (por ejemplo, puede escanearse una tarjeta de información que contiene la información con un ordenador y transmitirse los datos a un ordenador del centro de elaboración de perfiles usando un sistema de comunicación electrónica). Una vez recibida por el servicio de elaboración de perfiles, se procesa la muestra y se produce un perfil (por ejemplo, contenido de antígeno), específico para la información de diagnóstico o pronóstico deseada para el usuario final.

25 Después se preparan los datos de perfil en un formato adecuado para su interpretación por un usuario final. Por ejemplo, en vez de proporcionar datos sin procesar, el formato preparado puede representar una evaluación de riesgo (por ejemplo, probabilidad de que esté presente el antígeno) para el usuario final, junto con recomendaciones para opciones de cuidado de ganado particulares. Los datos pueden visualizarse al usuario final mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el servicio de elaboración de perfiles genera un informe que puede imprimir el usuario final (por ejemplo, en el punto de contacto, en el punto de cuidado del ganado) o visualizarse al usuario final en un monitor de ordenador.

35 En algunas realizaciones, en primer lugar se analiza la información en el punto de cuidado del ganado o en una instalación regional. Después se envían los datos sin procesar a una instalación de procesamiento central para su análisis adicional y/o para convertir los datos sin procesar en información útil para un usuario final u otra parte interesada. La instalación de procesamiento central proporciona la ventaja de privacidad (todos los datos se almacenan en una instalación central con protocolos de seguridad uniformes), velocidad y uniformidad del análisis de datos. Entonces, la instalación de procesamiento central puede controlar el destino de los datos tras la comunicación al usuario final. Por ejemplo, usando un sistema de comunicación electrónica, la instalación central puede proporcionar datos al usuario final.

40 En algunas realizaciones, el usuario final puede evaluar directamente los datos usando el sistema de comunicación electrónica. El usuario final puede pedir consejos adicionales basándose en los resultados. En algunas realizaciones, los datos se usan para un uso en investigación. Por ejemplo, los datos pueden usarse para optimizar adicionalmente un régimen nutricional para ganado o animales de compañía.

Composiciones y kits

50 Las composiciones para su uso en (por ejemplo, suficientes para, necesarias para o útiles para) los métodos de algunas realizaciones de la presente invención incluyen reactivos para detectar la presencia o ausencia de antígenos específicos (por ejemplo, (1→4)- α -D-glucano de levadura, (1→6)- β -D-glucano de levadura, (1→4)- α -/(1→6)- β -D-glucano de levadura). Cualquiera de estas composiciones, solas o en combinación con otras composiciones dadas a conocer, se dan a conocer en forma de un kit. Los kits pueden comprender además controles y/o reactivos de detección apropiados.

Conjugación de antígeno-portador

55 Adicionalmente se dan a conocer composiciones (por ejemplo, antígenos) que encuentran uso en el análisis (por ejemplo, análisis inmunológico; para la preparación de anticuerpos) de sustancias de pared celular de levadura. La solicitud da a conocer métodos para: separación de un (1→4)- α -/(1→6)- β -D-glucano soluble a partir de pared celular de levadura (véase, Kwiatkowski *et al.* (2009) J. Instit. Brew. 115:1031; Arvindekar *et al.* (2002) Yeast 19:131-139)

como antígeno para (1→6)-β-D-glucano de levadura; oxidación de grupos hidroxilo de este polisacárido en la posición C-6 de anillos de glucopiranosos con reactivo de Pfizner-Moffat (véase, Pfizner *et al.* (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:3027), con el fin de convertirlos en grupos aldehído (véase, Zekovic *et al.* (2006) Chem. Papers 60:243-248); y el uso de esta forma oxidada de (1→4)-α-(1→6)-β-D-glucano en la reacción de aminación reductiva (véase, Abdel-Magid *et al.* (1996) J. Org. Chem. 61:3849-3862) con los residuos de lisina de un portador (por ejemplo, una proteína portadora, por ejemplo, BSA), para producir un conjugado de polisacárido-portador. En algunas divulgaciones, la solicitud se refiere a la aplicación de técnicas de separación (por ejemplo, intercambio iónico, DEAE-celulosa y tampones de Na₂HPO₄ de diferente concentración iónica) en la separación de antígeno puro (por ejemplo, conjugado de (1→4)-α-(1→6)-β-D-glucano-BSA), que se usa como inmunógeno soluble para la inmunización de un animal (por ejemplo, de un conejo) (véase, Howard *et al.* (2001) "Basic Methods in Antibody Production and Characterization", CRC Press, págs. 11-18 y 31-50). La solicitud da a conocer además la preparación de fase de afinidad recubierta con BSA (véase, Matejschuk (1997) "Affinity Separations: A Practical Approach", Oxford University Press) y su uso en la absorción de anticuerpos específicos de portador (por ejemplo, específicos de BSA) a partir de antisueros (por ejemplo, sueros de conejo) que contienen tanto anticuerpos frente a portador (por ejemplo, BSA) como frente a antígeno (por ejemplo, (1→4)-α-(1→6)-β-D-glucano), facilitando por tanto la especificidad de la preparación de anticuerpos resultante. Los métodos dados a conocer para la conjugación de polisacáridos con portadores (por ejemplo, portadores proteico, por ejemplo, BSA) encuentran uso en la producción de vacunas para seres humanos y animales, ya que tales métodos conservan la estructura de polisacárido, en vez de provocar modificaciones en el extremo reductor como lo hacen los métodos de conjugación típicos (véase, Moreau *et al.*, patente estadounidense n.º 6.596.861).

La débil antigenicidad de poli u oligosacáridos requiere con frecuencia una modificación antes de su uso como antígenos. En algunas divulgaciones, se desarrollaron métodos de síntesis en los que se conjugaron antígenos de polisacárido (que contienen (1→6)-β-D-glucano) con un portador (por ejemplo, portador proteico, por ejemplo, BSA) que se originaba o derivaba de especies animales diferentes de la especie usada para la inmunización (véase, Howard *et al.* (2001) "Basic Methods in Antibody Production and Characterization", CRC Press, págs. 11-18 y 31-50; Matejschuk (1997) "Affinity Separations: A Practical Approach", Oxford University Press). Aunque la divulgación no está limitada en cuanto a la naturaleza o tipo del portador usado, BSA resulta ventajoso debido a su disponibilidad comercial y la presencia de cinco residuos de lisina, cada uno con un único grupo amino libre que puede conjugarse con poli u oligosacáridos mediante una variedad de métodos químicos (véase, Abdel-Magid *et al.* (1996) J. Org. Chem. 61:3849-3862; Lees *et al.* (1996) Vaccine 14:190-198; Pawlowski *et al.* (1999) Vaccine 17:1474-1483). En algunas divulgaciones, el resto de hidrato de carbono del antígeno y el portador que van a usarse en conjugación son solubles en agua. En algunas divulgaciones, los grupos aldehído del extremo reductor del resto de hidrato de carbono del antígeno (por ejemplo, polisacárido de (1→4)-α-(1→6)-β-D-glucano) no se usan para la conjugación directa con el portador (por ejemplo, BSA), porque hacerlo cambiaría sustancialmente la estructura y capacidad de unión del antígeno de polisacárido. Adicionalmente se da a conocer una estructura con conservación máxima de resto de hidrato de carbono mediante aplicación de un sistema de anhídrido acético/dimetilsulfóxido (Ac₂O/DMSO) (véase, Zekovic *et al.* (2006) Chem. Papers 60:243-248) para la oxidación en posiciones distintas de C3.

La solicitud da a conocer métodos para el uso de componentes de pared celular de levadura (por ejemplo, (1→4)-α-(1→6)-β-D-glucano soluble de pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*) en la síntesis de conjugado de antígeno (por ejemplo, (1→4)-α-(1→6)-β-D-glucano-BSA (albúmina sérica bovina)) que va a usarse en la producción de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos policlonales). La solicitud también da a conocer una composición inmunogénica que comprende (1→4)-α-(1→6)-β-D-glucano y/o un conjugado (por ejemplo, conjugado de proteína o azúcar) que comprende el mismo. En algunas divulgaciones, composiciones de anticuerpo encuentran uso en la detección de productos de pared celular de levadura en muestras de interés (por ejemplo, muestras o derivados de comida para animales, fracciones, o extractos de los mismos). Las composiciones dadas a conocer se extraen a partir de material enriquecido en glucano o producto enriquecido en glucano (GEM, ALLTECH, Inc., Nicholasville, KY, EE.UU.), por ejemplo, mediante extracción ácida (véase, Kwiatkowski *et al.* (2009) J. Instit. Brew. 115:1031). En algunas realizaciones, la oxidación leve de polisacárido (por ejemplo, (1→4)-α-(1→6)-β-D-glucano) en la posición C-6 de los anillos de glucopiranosos usando mezcla de dimetilsulfóxido (DMSO)/anhídrido acético (Ac₂O) (véase, Pfizner *et al.* (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:3027) convierte grupos hidroximetileno (-CH₂OH) en C-6 en los grupos aldehído (-CH=O) (véase, Zekovic *et al.* (2006) Chem. Papers 60:243-248), y produce una forma oxidada de antígeno (por ejemplo, (1→4)-α-(1→6)-β-D-glucano) que puede dar lugar a aminación reductiva con portador (por ejemplo, BSA) (véase, Moreau *et al.*, patente estadounidense n.º 6.596.861; Abdel-Magid *et al.* (1996) J. Org. Chem. 61:3849-3862). Los métodos de conjugación dados a conocer, por ejemplo, que comprenden la activación de polisacárido en C6-OH, proporcionan una estructura original totalmente conservada del resto de polisacárido, y por tanto son ventajosos para la preparación de antígeno. Métodos alternativos de activación de poli u oligosacáridos incluyendo, pero sin limitarse a, oxidación con peryodato (véase, Hay *et al.* (1973) Methods Carb. Chem. 5:357-370) o activación con CDAP (véase, Lees *et al.* (1996) Vaccine 14:190-198) proporcionan polisacáridos sustancialmente modificados, comprometiendo su utilidad como antígenos.

60 Anticuerpos

Adicionalmente se da a conocer un método de preparación de una inmunoglobulina para su uso en ensayos para detectar componentes de pared celular de levadura (por ejemplo, (1→4)-α-D-glucano de levadura, (1→6)-β-D-

- glucano de levadura, (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano de levadura) que comprenden las etapas de inmunizar a un sujeto con un componente de pared celular de levadura (por ejemplo, (1→4)- α -D-glucano de levadura, (1→6)- β -D-glucano de levadura, (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano de levadura, (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano-BSA, u otros fragmentos, variantes o conjugados de los mismos) y aislar inmunoglobulina a partir del receptor. También se da a conocer una inmunoglobulina preparada mediante este método.
- 5 Los inóculos para la producción de anticuerpos policlonales se preparan normalmente dispersando la composición antigénica en un diluyente fisiológicamente tolerable tal como solución salina u otros adyuvantes para formar una composición acuosa. Se administra una cantidad inmunoestimulante de inóculo a un sujeto y después se mantiene el sujeto inoculado durante un tiempo suficiente para que la composición antigénica induzca anticuerpos protectores.
- 10 Los anticuerpos pueden aislarse hasta el grado deseado mediante técnicas bien conocidas tales como cromatografía de afinidad (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies; a Laboratory Manual* (1988) Cold Springs Harbor Laboratory Press).
- Los anticuerpos incluyen preparaciones de antisuero a partir de una variedad de animales habitualmente usados (por ejemplo cabras, primates, conejos, burros, cerdos, caballos, cobayas, ratas o seres humanos). Se extrae sangre de los animales y se recupera el suero.
- 15 Una inmunoglobulina producida según la presente divulgación puede incluir anticuerpos completos, fragmentos o subfragmentos de anticuerpo. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas completas de cualquier clase, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, anticuerpos quiméricos o anticuerpos híbridos con especificidad doble frente a dos o más antígenos de la invención. También pueden ser fragmentos, por ejemplo, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv y similares, incluyendo fragmentos híbridos.
- 20 Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios pueden adaptarse usando métodos conocidos en la técnica para producir anticuerpos monocatenarios que se unen específicamente a un antígeno particular. Pueden generarse anticuerpos con especificidad relacionada, pero de composición idiotípica diferente, mediante intercambio de cadenas a partir de bibliotecas de inmunoglobulinas combinatorias aleatorias (véase, por ejemplo, Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11120-23, 1991).
- 25 También pueden construirse anticuerpos monocatenarios usando un método de amplificación de ADN, tal como PCR, usando ADNc de hibridoma como molde (véase, por ejemplo, Thirion *et al.*, 1996, *Eur. J. Cancer Prev.* 5, 507-11). Los anticuerpos monocatenarios pueden ser mono o biespecíficos, y pueden ser bivalentes o tetravalentes. La construcción de anticuerpos monocatenarios biespecíficos tetravalentes se enseña, por ejemplo, en Coloma y Morrison, 1997, *Nat. Biotechnol.* 15, 159-63. La construcción de anticuerpos monocatenarios biespecíficos bivalentes se enseña, por ejemplo, en Mallender & Voss, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 199-206.
- 30 Una secuencia de nucleótidos que codifica para un anticuerpo monocatenario puede construirse usando síntesis de nucleótidos manual o automatizada, clonarse en un constructo de expresión usando métodos de ADN recombinante convencionales, e introducirse en una célula para expresar la secuencia codificante, tal como se describe a continuación. Alternativamente, pueden producirse anticuerpos monocatenarios usando directamente, por ejemplo, tecnología de fagos filamentosos (véase, por ejemplo, Verhaar *et al.*, 1995, *Int. J. Cancer* 61, 497-501; Nicholls *et al.*, 1993, *J. Immunol. Met.* 165, 81-91).
- 35 También pueden producirse anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno particular induciendo la producción *in vivo* en la población de linfocitos o examinando paneles o bibliotecas de inmunoglobulinas de reactivos con unión altamente específica tal como se da a conocer en la bibliografía (véase, por ejemplo, Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 3833-3837, 1989; Winter *et al.*, *Nature* 349, 293-299, 1991).
- Pueden construirse anticuerpos quiméricos tal como se da a conocer en el documento WO 93/03151. También pueden prepararse proteínas de unión que se derivan de inmunoglobulinas y que son multivalentes y multiespecíficas, tales como los "diacuerpos" descritos en el documento WO 94/13804. Pueden purificarse anticuerpos mediante métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden purificarse por afinidad anticuerpos mediante paso por una columna a la que está unido el antígeno relevante. Entonces pueden eluirse de la columna los anticuerpos unidos usando un tampón con una alta concentración de sal.
- 45 Una composición inmunogénica de la invención puede administrarse a un sujeto que entonces actúa como fuente de inmunoglobulina, producida en respuesta a la exposición a la composición inmunogénica específica. Un sujeto así tratado donará plasma a partir del cual se obtendrá hiperinmunoglobulina mediante metodología de fraccionamiento de plasma convencional. Las composiciones dadas a conocer incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y/o policlonales) que pueden ser inmunoglobulinas completas de cualquier clase (por ejemplo IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, anticuerpos quiméricos) o anticuerpos híbridos con especificidad frente a dos o más antígenos de la invención. También pueden ser fragmentos, por ejemplo, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv y similares, incluyendo fragmentos híbridos.
- 50 En la técnica se conocen bien métodos de preparación de anticuerpos monoclonales y pueden incluir la fusión de esplenocitos con células de mieloma (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein 1975 *Nature* 256; 495; Harlow y Lane,

Antibodies; a Laboratory Manual (1988) Cold Springs Harbor Laboratory Press). Alternativamente, pueden obtenerse fragmentos de Fv monoclonales examinando una biblioteca de presentación de fagos adecuada (véase, por ejemplo, Vaughan TJ *et al* 1998 Nature Biotechnology 16; 535). Los anticuerpos monoclonales pueden humanizarse o humanizarse parcialmente mediante métodos conocidos.

- 5 En algunas divulgaciones, las composiciones de anticuerpo pueden reconocer antígenos de pared celular de levadura (por ejemplo, anticuerpos monoclonales o policlonales que pueden reconocer (1→4)- α -D-glucano de levadura, (1→6)- β -D-glucano de levadura, (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano de levadura, o fragmentos, variantes o conjugados de los mismos). Composiciones de anticuerpo dadas a conocer se unen a (1→4)- α -D-glucano de pared celular de levadura, pero no a restos que contienen (1→4)- α -D-glucano presentes en sustancias distintas de polímeros que contienen (1→4)- α -D-glucano de pared celular de levadura (por ejemplo, (1→4)- α -D-glucano de pared celular de levadura, (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano de pared celular de levadura, o fragmentos, variantes o conjugados de los mismos). En algunas divulgaciones, las composiciones de anticuerpo se unen a (1→6)- β -D-glucano de pared celular de levadura, pero no a restos que contienen (1→6)- β -D-glucano presentes en sustancias distintas de polímeros que contienen (1→6)- β -D-glucano de pared celular de levadura (por ejemplo, (1→6)- β -D-glucano de pared celular de levadura, (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano de pared celular de levadura, o fragmentos, variantes o conjugados de los mismos). En una divulgación adicional, las composiciones de anticuerpo se unen a (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano de pared celular de levadura, pero no a restos que contienen (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano presentes en sustancias distintas de pared celular de levadura (por ejemplo, (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano de pared celular de levadura, o fragmentos, variantes o conjugados de los mismos).

20 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de demostrar e ilustrar adicionalmente determinadas realizaciones preferidas y aspectos de la presente invención y no deben interpretarse como limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo 1

- 25 Extracción de (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano a partir de β -glucano de pared celular de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* de calidad alimentaria

Preparación de glucano de pared celular de levadura

- 30 Un (1→6)- β -D-glucano de calidad industrial (ALL-BGY, ALLTECH, Inc., Nicholasville, KY, EE.UU.) producido a partir de *S. cerevisiae* mediante un tratamiento enzimático/alcalino/térmico se lavó cuatro veces con agua desionizada para eliminar cualquier residuo soluble. Tras el secado por congelación, se obtuvo "material enriquecido en glucano" ("GEM").

Digestión ácida de glucano de pared celular de levadura

- 35 La figura 1 ilustra la preparación de las diversas fracciones. Se llevó a cabo la digestión ácida de glucano de pared celular de levadura tal como se describe en Kwiatkowski *et al.* (2009) J. Instit. Brew. 115:151-158; incorporado en el presente documento como referencia en su totalidad. Se sometió "material enriquecido en glucano" ("GEM") (70 g) a hidrólisis con 700 ml de HCl 100 mM (pH 2,2) a 80°C durante 6 h. Después de este tiempo, se centrifugó la mezcla a 13.500 x g/10°C/10 min y se recogió el sobrenadante. Se extrajo el gránulo dos veces con 150 ml de agua desionizada y se liofilizó, proporcionando 57,9 g de un producto amorfo blanco (P1).

- 40 Se combinaron los dos lavados con el sobrenadante original y se neutralizaron hasta pH 7,0 con NaOH 2 N. Se recogió el precipitado que se formó (gránulo P1/7) a partir de la centrifugación (1,82 g tras la liofilización) y se concentró el sobrenadante hasta un volumen de 450 ml usando un evaporador rotatorio a vacío Buchi por debajo de una temperatura de 37°C. Se concentró adicionalmente esta disolución usando dispositivos de centrifugación de ultrafiltración AMICON 15 de 5 kDa (Millipore Corporation, Delaware, EE.UU.). Se lavó el concentrado (~150 ml) mediante centrifugación dos veces con dos volúmenes iguales de agua desionizada, usando los mismos dispositivos de ultrafiltración, para retirar sal y los componentes de bajo peso molecular resultantes de la hidrólisis ácida. Se liofilizó el concentrado lavado (S1), proporcionando 7,5 g de producto amorfo blanco. Se sometió una parte del gránulo P1 a una segunda extracción usando la misma razón de reactivos y condiciones que en la primera extracción con HCl 0,1 N. Se liofilizaron estos productos para proporcionar P2 y S2. La segunda extracción con HCl 0,1 N no produjo un precipitado tras neutralizarse el sobrenadante. Se sometió una parte del gránulo P2 a una
- 50 tercera extracción usando la misma razón de reactivos y condiciones que en la primera extracción con HCl 0,1 N y se liofilizaron los productos para proporcionar P3 y S3. La tercera extracción con HCl 0,1 N no produjo un precipitado tras neutralizarse el sobrenadante. La composición en hidratos de carbono y la estructura de polisacárido de las fracciones soluble y no soluble a partir de las extracciones con HCl 0,1 N se establecieron usando espectroscopía de ¹H-RMN. Se analizó el contenido en manosa y glucosa en las muestras usando un análisis de la composición
- 55 mediante H₂SO₄-HPLC (véase, Dallies *et al.* (1998) Yeast 14:1297-1306; incorporado en el presente documento como referencia en su totalidad). Se calculó una cantidad estimada de contenido en proteína usando análisis de combustión de LECO y multiplicando el contenido en nitrógeno por un factor de 6,25.

Ejemplo 2

Preparación de antígeno

Oxidación mediante Ac₂O/DMSO de preparación de (1→4)-α-(1→6)-β-D-glucano

5 Se colocaron quinientos ochenta miligramos de glucano "soluble" en un vial de vidrio de 22 ml equipado con una varilla de agitación magnética y tapado con un septo de caucho. En este vial, se añadieron 10 ml de DMSO anhidro y 110 μl de anhídrido acético usando una jeringa de vidrio, a temperatura ambiente y con agitación. La suspensión de glucano se disolvió completamente en el plazo de 4 h de agitación a 20°C. Se continuó la agitación de la mezcla durante 24 h, tras lo cual se diluyó la mezcla de reacción con 40 ml de agua. Se concentró la disolución transparente resultante usando un dispositivo de centrifugación de ultrafiltración Amicon®15 de 30 kDa y se lavó el residuo en el filtro cinco veces con 12 ml de agua desionizada cada vez, para separar y purificar el producto de oxidación de disolventes y reactantes. Todas las centrifugaciones se realizaron a 4,750 x g/30 min/10°C. Se recogió el residuo final en el filtro y se secó por congelación proporcionando 502 mg del (1→4)-α-(1→6)-β-D-glucano oxidado en forma de un polvo blanco. El producto era parcialmente soluble en agua y completamente soluble en DMSO.

Análisis elemental

15 Hallado para glucano oxidado: C-40,05%; H-6,61%. Calculado para C₆H₈O₅ x H₂O: C-40,48%; H-5,66%.

Aminación reductiva de (1→4)-α-(1→6)-β-D-glucano oxidado con BSA

20 Se disolvió una muestra de 412 mg de (1→4)-α-(1→6)-β-D-glucano oxidado en 20 ml de agua desionizada y se combinó con una disolución de 256 mg de BSA en 2 ml de agua desionizada con agitación magnética. Luego se trató la mezcla con 60 mg de cianoborohidruro de sodio sólido. Se tapó el vial de reacción con un septo de caucho, y se agitó la mezcla a 20°C durante 24 h. Después de este tipo, se añadieron 100 mg de borohidruro de sodio y se agitó la mezcla durante 22 h adicionales. Luego se filtró la disolución transparente a través de un dispositivo de centrifugación de ultrafiltración Amicon®15 de 30 kDa a 4,750 x g/30 min/10°C. Se lavó el residuo en el filtro cuatro veces con 12 ml de agua cada vez y se liofilizó el concentrado final, proporcionando 573 mg de un polvo blanco.

Análisis elemental

25 C 45,01%, H 6,40%, N 2,11%.

Separación por cromatografía de intercambio iónico con DEAE-celulosa de conjugado de (1→4)-α-(1→6)-β-D-glucano-BSA

30 Se introdujo una disolución de 400 mg del conjugado en bruto en 5 ml de Na₂HPO₄ 5 mM en la parte superior de una columna de cromatografía de vidrio de 2 x 55 cm que contenía 50 g de DEAE-celulosa en Na₂HPO₄ 5 mM. Se usó Na₂HPO₄ a diversas concentraciones para la elución de: 40,1 mg de (1→4)-α-(1→6)-β-D-glucano (220 ml, 5 mM); 132,3 mg de conjugado de (1→4)-α-(1→6)-β-D-glucano-BSA puro (280 ml, 55 mM); y 96,7 mg de BSA (80 ml, 100 mM). Se concentró una disolución de conjugado de (1→4)-α-(1→6)-β-D-glucano-BSA puro hasta un volumen de 2 ml usando un dispositivo de centrifugación de ultrafiltración AMICON15 de 30 kDa, se lavó con agua desionizada y se liofilizó, proporcionando 132,3 mg (rendimiento total del 24,4%) de producto de tipo polvo blanco.

35 La electroforesis en gel produjo una banda ancha revelada usando tinción con azul de Comassie y PAS, con un centro a ~170 kDa. No se detectó BSA libre ni ninguna otra impureza en los electroferogramas.

Análisis elemental

C 40,11%, H 6,23%, N 3,06%, (20,44% en peso de BSA). La razón calculada de β-glucano:BSA es de 4:1.

Ejemplo 3

40 Preparación y purificación de anticuerpos policlonales

Preparación de antígenos e inmunización de conejos

Se liofilizaron diez mg de antígeno conjugado con BSA preparado tal como se describió en el ejemplo 2, se almacenaron a 4°C y se usaron para la inmunización de tres conejos (200 μg de antígeno por inmunización). El protocolo de inmunización fue tal como se indica en la tabla 1.

45 Tabla 1. Protocolo de inmunización para la generación de anticuerpos policlonales anti-(1→4)-α-(1→6)-β-D-glucano-BSA en conejos.

Día	Acción
0	Configuración, extracción previa de sangre, inmunización inicial
21	Refuerzo

35	Refuerzo
44-45	Extracción de sangre
49	Refuerzo
58-59	Extracción de sangre
63	Extracción de sangre

Purificación en fase de afinidad de anticuerpo policlonal

Se suspendió un gramo de agarosa activada con compuesto epoxídico (Sigma E 6632) en una disolución de 2,68 g de BSA (SIGMA A2153) en 27 ml de Na₂HPO₄ 10 mM y se agitó la mezcla durante 4 h a 4°C en un baño de agua helada. Después de este tiempo, se centrifugó la mezcla a 2500 x g/5 min/10°C y se lavó el gránulo y se centrifugó cuatro veces más con 30 ml de Na₂HPO₄ 100 mM/NaN₃ al 0,05% en peso cada vez.

Se suspendió el gránulo de la última centrifugación de la fase de afinidad recubierta con BSA (descrita anteriormente) en la disolución de 750 µl de los sueros (recogidos del conejo que se había inmunizado con el conjugado de glucano-BSA "soluble") en 20 ml de Na₂HPO₄ 10 mM/NaN₃ al 0,05% en peso y se volteó durante 2 h a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 1500 x g/5 min/10°C. Se recogió el sobrenadante y se lavó el gránulo tres veces más con 20 ml del mismo tampón, dando como resultado la recogida de tres sobrenadantes más. Se examinaron los sobrenadantes para determinar especificidad frente a BSA y glucano "soluble" tal como se presenta en la figura 2. Se combinaron entre sí los sobrenadantes primero y segundo, que contenían una cantidad significativa de anticuerpos, y se concentraron hasta un volumen de 2,5 ml mediante centrifugación a 5000 x g/5 min/10°C usando un dispositivo de filtro centrifugo AMICON Ultra-15 de 10 kDa. Se lavó el concentrado en el filtro con Na₂HPO₄ 10 mM/NaN₃ al 0,05% en peso y se diluyó hasta un volumen de 6 ml (6 g) con el mismo tampón. Se usó esta disolución a una dilución de 1:800 de "anticuerpos purificados por afinidad" en el ensayo ELISA para detectar MYCOSORB en comida para animales. En la figura 3 se presenta la curva de calibración obtenida.

Ejemplo 4

Detección de (1→4)-α-(1→6)-β-D-glucano de pared celular de levadura mediante ELISA

20 Material y métodos

Reactivos

Sólo se usaron reactivos de calidad analítica reconocida, a menos que se especifique lo contrario, y agua desionizada o desmineralizada o pureza equivalente de agua (18,2 MΩ/cm a 25°C).

Los reactivos y la preparación de disoluciones de reactivos fueron de la siguiente manera:

25 • Ácido clorhídrico, 12,1 N; HCl

• Ácido clorhídrico diluido, 1 N; HCl: se añadieron lentamente 41,3 ml de HCl 12,1 N a 400 ml de agua desionizada y se mezclaron con una barra de agitación en una placa de agitación hasta que se enfriaron. Se transfirió la disolución a un matraz aforado de 500 ml y se enrasó con agua desionizada, luego se almacenó a temperatura ambiente.

30 • Dimetilsulfóxido: el DMSO usado era de alta pureza, adecuado para espectrofotometría, cromatografía de líquidos y cromatografía de gases.

• Reactivo de extracción: para preparar el reactivo de extracción, se mezclaron 900 ml de DMSO con 98,75 ml de agua desionizada y 1,25 ml de HCl 12,1 N. Se mezcló la disolución con una barra de agitación en una placa de agitación a velocidad media y temperatura ambiente, luego se almacenó a 20°C o más.

• Cloruro de sodio ("NaCl")

35 • Cloruro de potasio ("KCl")

• Hidrogenofosfato de disodio ("Na₂HPO₄")

• Dihidrogenofosfato de potasio ("KH₂PO₄")

40 • Solución salina tamponada con fosfato ("PBS") 10X: para preparar 10X PBS, se mezclaron 80,0 g de cloruro de sodio [NaCl], 2,0 g de cloruro de potasio [KCl], 14,2 g de hidrogenofosfato de disodio [Na₂HPO₄] y 2,4 g de dihidrogenofosfato de potasio [KH₂PO₄] con aproximadamente 800 ml de agua desionizada. Se agitó la disolución usando una barra de agitación en una placa de agitación hasta que los sólidos se disolvieron completamente. Se transfirió la disolución a un matraz aforado de 1000 ml y se enrasó con agua desionizada, luego se almacenó a temperatura ambiente o a 2 - 8°C. El tiempo de almacenamiento máximo fue de 6 meses a 2 - 8°C como líquido sin diluir. Se calentó la disolución hasta temperatura ambiente antes de su uso.

45 • PBS diluida, 1X: para preparar 1X PBS, se diluyó 1 volumen de PBS, 10X, con 9 volúmenes de agua desionizada.

Se mezcló la dilución usando una barra de agitación en una placa de agitación a velocidad media y temperatura ambiente. El tiempo de almacenamiento máximo fue de un día.

- Polisorbato 20

5 • Solución salina tamponada con fosfato, 0,01 M con polisorbato 20 al 0,05%, pH 7,4: para prepararla, se disolvió el contenido de una bolsa en 1000 ml de agua desionizada. Se agitó la disolución en una placa de agitación hasta que se disolvió completamente, luego se almacenó a temperatura ambiente o a 2 - 8°C. El tiempo de almacenamiento máximo fue de 6 meses a 2 - 8°C como líquido sin diluir. Se calentó la disolución hasta temperatura ambiente antes de su uso.

- Leche desnatada en polvo

10 • Leche desnatada en polvo, al 3% (p/v) en PBS, 1X reactivo de bloqueo: para preparar 1X reactivo de bloqueo, se disolvió completamente leche en polvo en 1X PBS antes de su uso. Fue necesario un volumen de 10 ml para bloquear cada placa. El tiempo de almacenamiento máximo fue de un día.

- Anticuerpos policlonales de conejo; anticuerpo primario (disolución de anticuerpo n.º 1): Anticuerpos purificados por afinidad preparados tal como se describe en el presente documento. Almacenados a -80°C hasta su uso.

15 • Disolución diluida de anticuerpo policlonal de conejo: diluida hasta 1:X_i en PBS añadiendo 1 µl de disolución de anticuerpo n.º 1 a X_i µl de PBS, 1X. Fue necesario un volumen de 10 ml de disolución para cada placa de microtitulación. Se mezcló bien la disolución de anticuerpo diluida antes de su uso, y se descartó el anticuerpo diluido en exceso. El tiempo de almacenamiento máximo fue de un día.

20 • IgG (H+L) de cabra anti-conejo AffiniPure conjugada con peroxidasa; anticuerpo secundario con HRP, ref. n.º 111-035-045 (Jackson ImmunoResearch, PA, EE.UU. - disolución de anticuerpo n.º 2): rehidratada con 1,5 ml de agua desionizada y centrifugada hasta obtener una disolución completamente transparente. Almacenada en alícuotas de 10 µl a -80°C hasta su uso. El tiempo de almacenamiento máximo fue de 6 semanas a 2 - 8°C como líquido sin diluir.

25 • Anticuerpo de cabra anti-conejo diluido: Diluido hasta 1:Y_i en PBS añadiendo 1 µl de disolución de anticuerpo n.º 2 a Y_i µl de PBS, 1X. Se mezcló bien la disolución de anticuerpo diluida antes de su uso, y se descartó el anticuerpo diluido en exceso. El tiempo de almacenamiento máximo fue de un día.

30 • Sustrato de peroxidasa para micropocillos SureBlue Reserve TMB: volvió a dispensarse el volumen necesario únicamente en botellas de HDPE y LDPE de Nalgene de color ámbar. Se calentó el sustrato hasta temperatura ambiente antes de su uso. Se mantuvo la tapa cerrada herméticamente, protegido de la luz. Se descartó el sustrato en exceso y se almacenó el reactivo a 2 - 8°C. El tiempo de almacenamiento máximo fue de 24 meses desde la fecha de fabricación cuando se almacenó a 8°C.

- Muestra madre de MYCOSORB; ref. de lote n.º 285965 (ALLTECH, Inc., KY, EE.UU.): se usó una muestra homogénea de MYCOSORB.

35 • Dilución de MYCOSORB en piensos: se mezclaron 20 g del material de comida con cantidades crecientes de producto de MYCOSORB (0,01; 0,02; 0,08; 0,10; 0,12 g) en una botella de centrifuga de 250 ml en tres réplicas para generar una curva patrón. Se agitó la botella en un agitador orbital a 400 rpm durante 1 h. La precisión para el pesado de los materiales de comida era igual a ±0,025 g y para el producto de MYCOSORB, ±0,005 g.

40 • Lote grande de MYCOSORB diluido en piensos: se preparó una muestra grande de producto de MYCOSORB diluido en comida usando 1,2 g de producto y 300 g del material de comida en un recipiente de 1000 ml. Se agitó la botella en un agitador orbital a 400 rpm durante 1 h. La concentración final de producto de MYCOSORB en el material de comida era de 4,0 kg/T. Se transfirieron 20,0 g de la mezcla de comida-producto en lote grande de 300,0 g homogeneizada a una botella de centrifuga de 250 ml. Se repitió la transferencia 9 veces más para obtener 10 muestras repetidas. Se agitó la mezcla de manera intermitente entre cada 3 alícuotas preparadas para evitar la sedimentación del producto en el fondo de la botella. La precisión para el pesado de los materiales de comida era igual a ±0,025 g y para el producto de MYCOSORB, ±0,005 g.

45 • Dilución de cantidad de MYCOSORB desconocida en piensos: se preparó una muestra desconocida transfiriendo una cantidad desconocida de producto de MYCOSORB y 20,0 g (±0,025 g) del material de comida a cada una de cinco botellas de centrifuga de 250 ml. Se agitó la botella en un agitador orbital a 400 rpm durante 1 h. Se completó simultáneamente la preparación de muestras de la curva patrón para la(s) muestra(s).

Formulación de muestra

50 Se usaron tres materiales de comida (véanse la tabla 4, tabla 5 y tabla 6) para validar el ensayo. Se seleccionó la formulación de material de comida según composiciones que pueden encontrarse en la técnica. El tamaño de muestra tenía un total de 15 kg de material de comida que se homogeneizaron cuidadosamente antes de enviarse al laboratorio. Se almacenó la muestra a 2 - 8°C durante todo el periodo de estudio.

Verificación de homogeneidad de muestra

Se verificó la homogeneidad de la dilución del producto de MYCOSORB en el material de comida preparando un lote grande de producto de MYCOSORB diluido en comida a una concentración intermedia de producto en la comida de 4,0 kg/T. Se dividió la muestra en 10 submuestras y se extrajo adicionalmente según el procedimiento de extracción y esto estuvo seguido por la determinación del coeficiente de variación para la detección del producto por medio del ensayo ELISA cuatro veces para cada una de las 10 muestras.

Preparación de muestra

La preparación de la muestra de patrón se realizó tal como se describe en el presente documento y se presenta en la tabla 2, con el producto de MYCOSORB que iba a someterse a prueba. En este caso, el producto madre inicial se denominó tal como se menciona en el presente documento. Las muestras desconocidas se prepararon tal como se describió anteriormente. No se requirió ninguna trituración de la muestra de comida antes de llevar a cabo el procedimiento de extracción (esto también habría sucedido si el material de comida se proporcionara en forma granulada). Se encontró que la trituración del material de comida puede afectar a la fiabilidad final del ensayo.

Tabla 2. Etapas de dilución de producto de MYCOSORB para curva patrón.

Factor de dilución (kg/T) ^a	Número de grupo de muestra	Comida (g) ^b	MYCOSORB (g) ^c	Réplicas x muestras
0	0	20,0	0	2 x 10
0,5	1	20,0	0,01	2 x 3
1,0	2	20,0	0,02	2 x 3
4,0	3	20,0	0,08	2 x 3
5,0	4	20,0	0,10	2 x 3
6,0	5	20,0	0,12	2 x 3
de 0 a 6,0	C ^d	20,0	de 0 a 0,12	4 x 10

^a Factor de dilución expresado en kilogramos de producto de MYCOSORB por tonelada de material de comida

^b Intervalo de comida = $\pm 0,025$ g,

^c Intervalo de producto de MYCOSORB = $\pm 0,005$ g

^d En el que C es una cantidad de MYCOSORB desconocida en piensos

Procedimiento de extracción

Se agitaron todos los conjuntos de botellas en un agitador orbital a 400 rpm durante 1 h. Se retiraron tres botellas a la vez y se añadió un volumen de 80 ml de reactivo de extracción a cada botella usando un dispensador volumétrico superior para botellas. Se taparon las botellas. Se agitaron todas las muestras manualmente para garantizar un mezclado completo con el reactivo de extracción. Se colocaron las botellas en un baño de agua mantenido por termostato a 80°C durante 1 h, asegurándose de que la disolución de comida estaba totalmente sumergida. Tras la incubación, se retiraron las botellas del baño de agua y se mezcló el contenido de las botellas con varillas (marca NALGENE) usando un agitador de laboratorio de alto par motor. Se homogeneizó completamente la mezcla. Se usó una varilla limpia para cada nivel de inclusión de MYCOSORB y para cada muestra desconocida. Volvieron a colocarse las botellas en el baño de agua mantenido por termostato a 80°C durante 1 h. Tras la incubación, se retiraron las botellas del baño de agua y se añadieron 80 ml de agua desionizada a cada botella, usando un dispensador volumétrico superior para botellas, y luego se taparon las botellas. Se agitaron las botellas manualmente hasta que se mezclaron completamente; se usaron varillas de marca NALGENE con el agitador de laboratorio de alto par motor según se necesitó. Se centrifugaron las botellas a 8.000 g durante 10 min. Usando pipetas de vidrio, se transfirieron aproximadamente 10 ml del sobrenadante a 15 ml de tubos estériles de centrifuga. Se centrifugaron los tubos a 4.000 g durante 10 min y se transfirieron a nuevos tubos estériles de centrifuga de 15 ml, adecuadamente etiquetados, mediante decantación. Se almacenaron los tubos a -20°C durante la noche hasta usarse para el ensayo ELISA.

Procedimiento de ELISA

Se usó el sustrato de peroxidasa para micropocillos SureBlue Reserve TMB para desencadenar una reacción colorimétrica mediante la reacción con el anticuerpo secundario con HRP diluido, reaccionando adicionalmente con el propio anticuerpo primario diluido que reacciona específicamente con el sustrato de interés extraído del producto de MYCOSORB diluido, que está inmovilizado en la placa de microtitulación. Se detuvo en última instancia la reacción colorimétrica tras 20 min usando HCl 1 N y se realizó la lectura de absorbancia en un lector de placas a una longitud de onda de 450 nm. Por tanto, se midieron blancos compuestos únicamente por el material de comida para compensar una posible variación colorimétrica procedente de la matriz de comida que proporciona una señal de fondo en el espectrofotómetro. Para el cálculo, se restaron los valores de blanco de los valores de absorbancia obtenidos para cada muestra.

Se descongelaron las muestras anteriormente extraídas almacenadas durante la noche y se calentaron hasta temperatura ambiente. Se agitaron las muestras con vórtex para garantizar una muestra homogénea antes de su uso en ELISA para recubrir pocillos de placas de microtitulación.

5 Para cada réplica de muestra, se transfirieron 100 µl del sobrenadante a cada uno de 3 pocillos en una placa de microtitulación de 96 pocillos tal como se presenta en la tabla 3. Puede realizarse una distribución aleatorizada de las muestras en la placa en un laboratorio equipado con un dispensador de pocillos de microtitulación robotizado programado. Se distribuyeron todas las muestras de curva patrón y réplicas de muestra en una única placa (es decir, todas las réplicas de muestra de 0 kg/T se colocaron en placa a lo largo de las filas/columnas E1 a F10). Las muestras repetidas de MYCOSORB desconocidas se distribuyeron en la misma placa (es decir, se colocaron en placa a lo largo de las filas/columnas A11 a C12). Se sellaron las placas de microtitulación con película adhesiva para microplacas y se incubaron a 37°C durante 1 h. Tras la incubación, se retiró la disolución en cada pocillo de la placa de microtitulación y se sustituyó por 250 µl de PBS, 1X para un único lavado. Se repitió la operación un total de 2 veces más. Se bloqueó cada pocillo de la placa de microtitulación con 100 µl de leche desnatada diluida en disolución de PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Tras la incubación, se retiró la disolución en cada pocillo y se sustituyó por 250 µl de PBS, 1X para un único lavado, seguido por 250 µl de PBS que contenía polisorbato 20, al 0,05% para 2 lavados.

Se añadió un volumen de 100 µl del anticuerpo primario diluido a cada pocillo. Se incubó la placa de microtitulación a temperatura ambiente durante 1 h. Tras la incubación, se retiró la disolución en cada pocillo de la placa de microtitulación y se sustituyó por 250 µl de PBS, 1X que contenía polisorbato 20, al 0,05% para 3 lavados.

20 Se añadió un volumen de 100 µl del anticuerpo secundario diluido a cada pocillo. Se incubó la placa de microtitulación a temperatura ambiente durante 1 h. Tras la incubación, se retiró la disolución en cada pocillo de la placa de microtitulación y se sustituyó por 250 µl de PBS, 1X que contenía polisorbato 20, al 0,05% para 3 lavados.

25 Se añadió un volumen de 100 µl de sustrato TMB, previamente calentado hasta temperatura ambiente, a cada pocillo y se incubó la placa de microtitulación durante 20 min a temperatura ambiente. Tras exactamente 20 min con el sustrato TMB, se añadió inmediatamente un volumen de 100 µl de HCl 1 N a cada pocillo para detener el desarrollo colorimétrico. Se leyó cada placa de microtitulación en un lector de placas de microtitulación a 450 nm.

Tabla 3 . Distribución de grupos de muestra en la placa de microtitulación.

**	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C.1*	C.2	C.3	C.4	C.5	C.6	C.7	C.8	C.9	C.10	-	-
B	C.1	C.2	C.3	C.4	C.5	C.6	C.7	C.8	C.9	C.10	-	-
C	C.1	C.2	C.3	C.4	C.5	C.6	C.7	C.8	C.9	C.10	-	-
D	C.1	C.2	C.3	C.4	C.5	C.6	C.7	C.8	C.9	C.10	5.1	5.1
E	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	0.10	5.2	5.2
F	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	0.10	5.3	5.3
G	1.1	1.2	1.3	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3	4.1	4.2	4.3
H	1.1	1.2	1.3	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3	4.1	4.2	4.3

* En el que C es un nivel de inclusión de producto de MYCOSORB desconocido en piensos

** Véase la tabla 2 para la identificación de grupos muestras

30 *Exclusión de datos a partir de réplicas*

Fue necesario un análisis de datos estadístico para garantizar que todas las réplicas eran similares, excluyendo aquellas que no pasaban la prueba de la Q de Dixon y luego se identificaron en consecuencia como valores aberrantes según la definición: $Q_n = \frac{|x_a - x_b|}{R}$, donde R es el intervalo de todos los puntos de datos; x_a es el valor aberrante sospechado; x_b es el punto de datos más próximo a x_a . Si $Q_{calculado} > Q_{tabla}$, entonces se rechaza el punto cuestionable a un intervalo de confianza del 95%.

Formulación de curva patrón

Se usaron curvas de calibración para la cuantificación. Se construyen para cada matriz de comida usando al menos cinco niveles (incluyendo cero) en el intervalo de trabajo del producto tal como se menciona en la directiva del

consejo 96/23. Se calculó el promedio de las tres réplicas de absorbencias de pocillo a DO₄₅₀ para cada grupo de muestras. Se calculó el promedio de las diez réplicas de absorbencias de pocillo a DO₄₅₀ para la muestra de comida de blanco. Luego se preparó una curva patrón o curva de calibración con la diferencia ΔDO₄₅₀ (DO₄₅₀ de grupo de muestras - DO₄₅₀ de comida de blanco) obtenida en las ordenadas y los diferentes intervalos de concentración de producto de MYCOSORB, 0,5, 1,0, 4,0, 5,0, 6,0 kg/T en las abscisas.

El coeficiente de regresión y la ecuación de los niveles de inclusión representados gráficamente frente a la absorbencia como DO₄₅₀ se calcularon según una regresión lineal usando la recta de ajuste óptimo, ΔDO₄₅₀ = Ax (MYCOSORB) tras la corrección de los valores mediante el promedio de valor de blanco. Se validaron el intervalo de aceptabilidad y la linealidad de la curva de calibración mediante un valor del coeficiente de correlación (r²) superior a 0,95. Luego se usó la ecuación correspondiente de la curva para determinar el nivel de inclusión de producto de MYCOSORB en la(s) muestra(s) desconocida(s) resolviendo la ecuación correspondiente.

Interpolación

Si se encuentra un coeficiente de correlación superior a r² > 0,95 con la curva patrón, entonces se usa la ecuación correspondiente de la curva F(x) = Ax corregida (restada de la señal de fondo y la ordenada en el origen) para determinar el nivel de inclusión de producto de MYCOSORB en la(s) muestra(s) desconocida(s). Se calcula el promedio de las diez réplicas a DO₄₅₀ para el nivel de inclusión desconocido (C) de producto de MYCOSORB. Se resta el promedio obtenido del promedio de las diez réplicas de absorbencias de pocillos a DO₄₅₀ para la muestra de comida de blanco anteriormente calculado. Luego se usa el valor promedio de DO₄₅₀ para resolver la ecuación de la curva corregida F⁻¹(y_C), donde y_C=Ax_C: x_C = y_C/A, donde y_C es el promedio de DO₄₅₀ obtenido para la muestra desconocida (C) menos la DO₄₅₀ del blanco, x_C es el nivel de inclusión correspondiente de producto de MYCOSORB, y A es la pendiente de la curva patrón, en kg/T DO₄₅₀.

Límite de detección y cuantificación

Se midieron el límite de detección (L_D = 3σ_{blanco}) y límite de cuantificación (L_Q = 10σ_{blanco}) según la nomenclatura de la IUPAC y se facilitan como ΔDO₄₅₀.

Se determinaron el límite de detección (L_D) y límite de cuantificación (L_Q) a partir del análisis de blancos de matriz y se incluyeron en el cálculo de la concentración a partir de la regresión lineal corregida a partir del valor de DO₄₅₀ de fondo media por medio de la curva de calibración F(x) = Ax resuelto de la siguiente manera:

L_D = 3σ_{blanco}/A y L_Q = 3σ_{blanco}/A, donde L_D es la concentración detectable mínima de producto o límite de detección; L_Q es la concentración cuantificable mínima de producto o límite de cuantificación.

Homogeneidad

El coeficiente de variación de homogeneidad (RSD_H = CV_H) se definió como el coeficiente de variación promedio a partir de 10 réplicas independientes obtenidas de la misma muestra en el mismo día, por el mismo técnico, con el mismo equipo y método.

Precisión: repetibilidad

La precisión de la repetibilidad dentro de una ejecución (RSD_{intra} = CV_{intra}) se definió como el coeficiente de variación promedio a partir de las réplicas obtenidas de la misma muestra en el mismo día para la misma ejecución, por el mismo técnico, con el mismo equipo y método.

La precisión de la repetibilidad entre ejecuciones (RSD_{inter} = CV_{inter}) es el coeficiente de variación promedio a partir de resultados independientes obtenidos de la misma muestra en días diferentes durante ejecuciones diferentes, por el mismo técnico, con el mismo equipo y método.

Precisión: precisión global

La precisión evalúa la dispersión (o proximidad) del acuerdo entre mediciones sucesivas de la misma cantidad. La dispersión en un conjunto de medidas se expresa habitualmente en cuanto a la desviación estándar. Por tanto, la precisión se calculó a partir de la desviación estándar de un único experimento individual a un único nivel de inclusión obtenido de la misma muestra en el mismo día, por el mismo técnico, con el mismo equipo y método; a partir de la desviación estándar comparando cada ejecución individual, por el mismo técnico, con el mismo equipo y método según la fórmula:

$$\sigma_{Total} = \sqrt{\left[\frac{\sigma_{intra}^2}{n} + \sigma_{inter}^2 \right]}$$
, donde σ_{Total} es la desviación estándar del conjunto total de experimentos, σ_{intra} es la desviación estándar de un único experimento individual, σ_{inter} es la desviación estándar entre múltiples experimentos, y n es el número de réplicas. La comparación de la desviación estándar se logró a partir del análisis de varianza (ANOVA de un factor) usando una prueba de la F (valor de p ≤ 0,05) entre la varianza de las medias de grupos y la

media de las varianzas dentro de un grupo.

Exactitud

La exactitud es la proximidad de acuerdo que puede encontrarse entre resultados de prueba y el valor de referencia aceptado del producto que está midiéndose. Por tanto, se evaluó la exactitud a partir de la medición de la recuperación expresada como percentiles. En este aspecto, la recuperación representa la proporción de la cantidad de analito presente en, o mezclado, que se extrae y está disponible para su medición. El sesgo es la diferencia entre los resultados de prueba y un valor de referencia aceptado (concentración de adición conocida del analito). Se realizaron los cálculos según las formulas:

$$\text{Recuperación}(\%) = \frac{(X_c - X_b)}{X_{TH}}$$

10 donde X_c es la concentración medida en la muestra de adición conocida; X_b es la concentración medida en la muestra sin adición conocida (blanco); X_{TH} es la concentración teórica.

Material de comida usado para pruebas de validación

Se realizaron pruebas en el Center for Animal Nutrigenomics and Applied Animal Nutrition en ALLTECH, Inc., KY, EE.UU. con una formulación de comida para ganado vacuno, una formulación de comida para pollos y una formulación de comida para cerdos de material de comida mezclado con diferentes niveles de inclusión del producto de MYCOSORB. A continuación se incluye la descripción completa de la formulación de comida.

Material de comida para ganado vacuno

El material de comida se formuló por Coralis Vern (Vern sur Seiche, Francia, ref. n.º 111605) con el nombre de fórmula "Spirit Lait 2L5" (tabla 4). El tamaño de muestra era un total de 15 kg de material de comida que se homogeneizaron cuidadosamente antes de enviarse al laboratorio. Se almacenó la muestra a 2 - 8°C durante todo el periodo del estudio. El material de comida para ganado vacuno se proporcionó en forma granulada. No se requirió ninguna trituración de la muestra de comida antes de llevar a cabo el procedimiento de extracción.

Tabla 4. Formulación de comida para ganado vacuno usada para la validación del método.

Ingredientes	Tasas
Patrón de trigo, %	20,00
Cebada, %	6,00
Aceite de palma (torta de experimentación), %	12,00
Colza (sin aceite), %	8,10
Torta de aceite de soja 48/Brasil, %	4,20
Trigo, salvado fino, %	24,94
Trigo Amyplus (triticale), %	20,00
Melaza, %	1,00
Vinaza (extractos de fermentación), %	1,50
Harina de carbonato de calcio, %	1,06
Sal refinada, %	0,50
EMROD, %	0,20
Super 26 Eco aa, % (mezcla previa de vitaminas y minerales)	0,50
Total, %	100
Nutriente	
Materia seca, %	88,324
Proteína en bruto, %	17,002
Grasa, %	3,144
Celulosa, %	8,378
Cenizas, %	6,723
Almidón, %	24,955
Azúcares totales, %	4,420
Almidón y azúcares, %	29,376
Hidrato de carbono ruminal, g/kg	352,926
PDIN*, g/kg	117,260
PDIE*, g/kg	103,028
PDIA*, g/kg	49,723
Nitrógeno ruminal, g/kg	124,906
Lisina digerible en el rumen, g/kg	6,794
Metionina digerible en el rumen, g/kg	1,873
Calcio, %	0,800
Fósforo total, %	0,659

ES 2 691 260 T3

Sodio, %	0,500
Magnesio, %	0,236
Fósforo digerible en el rumen, %	0,466
Valor estructural, %	0,220
Tortas de trigo, %	20,000
Tortas de trigo triticale, %	20,000
Tortas de cereales, %	26,000
Resultado total, salvado de trigo, %	44,940
Tortas de colza, %	8,100
Gránulos de MP totales + durabilidad de gránulos, %	20,000
Vitamina A, UI/kg	4000
Vitamina D3, UI/kg	2000

5 * Sirve para definir el valor de proteína de comidas y los requisitos de proteínas de animales, expresados ambos en cuanto a proteína auténtica realmente digerible en el intestino delgado ("PDI"). El contenido en PDI de una dieta es la suma de (i) la fracción de PDIA, la proteína alimenticia no degradada en el rumen, pero realmente digerible en el intestino delgado; (ii) la fracción de PDIM, la proteína auténtica microbiana que es realmente digerible en el intestino delgado. Cada comida contribuye a la síntesis de proteínas microbianas tanto mediante el nitrógeno degradable (PDIMN) como mediante la energía disponible que suministra a los microorganismos del rumen (PDIME). El valor de cada comida viene dado directamente por la suma de PDIA y PDIM, considerando las dos ecuaciones siguientes: (1) PDIN = PDIA + PDIMN y (2) PDIE = PDIA + PDIME.

Material de comida para pollos

10 El material de comida se formuló en la Coldstream University of Kentucky, un grupo de alianza para la investigación entre la Universidad de Kentucky y ALLTECH, Inc., KY, EE.UU. (tabla 5). La preparación se realizó según composiciones encontradas en la técnica y que pueden generalizarse para las formulaciones habitualmente encontradas en la Unión Europea, Norteamérica, América latina, etc. El tamaño de muestra era un total de 15 kg de material de comida que se homogeneizaron cuidadosamente antes de enviarse al laboratorio. Se almacenó la muestra a 2 - 8°C durante todo el periodo de estudio.

Tabla 5. Formulación de comida para pollos usada para la validación del método.

Ingredientes	Fórmula para jóvenes, 22-42 días
	Base de maíz-soja
Maíz	62,15
Harina de soja (48%)	31,31
Aceite de maíz	3,10
Caliza	1,37
Fosfato de dicalcio	1,30
Sal	0,45
MEZCLA de vitaminas-minerales ^a	0,25
DL-Metionina	0,07
L-lisina	-
Total	100
Nutriente	
ME, kcal/kg	3120
Proteína en bruto, %	20
Calcio, %	0,90
Fósforo disponible, %	0,35
Lisina, %	1,11
Metionina, %	0,39
Metionina + Cisteína, %	0,72
Na, %	0,20

20 ^a Vitamina suministrada por kg de dieta: 2200 UI de vitamina A; 720 ICU de vitamina D3; 27 UI de vitamina E; 0,91 mg de vitamina K3 (2-metil-1,4-naftoquinona); 2 mg de tiamina; 8 mg de riboflavina; 55 mg de niacina; 18 mg de pantotenato de Ca; 5 mg de vitamina B6 (piridoxinas); 0,221 mg de biotina; 1 mg de ácido fólico; 478 mg de colina; 28 µg de vitamina B12 (cianocobalamina).

Material de comida para cerdos

El material de comida se formuló en la Coldstream University of Kentucky, un grupo de alianza para la investigación entre la Universidad de Kentucky y ALLTECH, Inc., KY, EE.UU. (tabla 6). La preparación se realizó según composiciones encontradas en la técnica y que pueden generalizarse para las formulaciones habitualmente

encontradas en la Unión Europea, Norteamérica, América latina, etc. El tamaño de muestra era un total de 15 kg de material de comida que se homogeneizaron cuidadosamente antes de enviarse al laboratorio. Se almacenó la muestra a 2 - 8°C durante todo el periodo de estudio.

Tabla 6. Formulación de comida para cerdos usada para la validación del método.

Ingredientes		Fórmula para cerdas preñadas y cerdas adultas	
		Base de maíz-soja	
Maíz (triturado, amarillo)		81,540	
Harina de soja decorticada (47,5%)		12,310	
Aceite de maíz		2,000	
Caliza (triturada)		0,690	
Fosfato de dicalcio		2,630	
Sal		0,500	
Mezcla de vitaminas (BASF) *		0,050	
Mezcla de oligoelementos (Prince) **		0,080	
Cloruro de colina (60%)		0,150	
Chromax		0,050	
Total		100	
Nutrientes			
ME, kcal/kg		3258	
CP, %		12,4	
Ca, %		0,54	
P disponible, %		0,60	
Lisina, %		0,54	
* Composición de mezcla de vitaminas:		PREMEZCLA BASF (Concentración/kg de dieta mixta)	
		Concentraciones/kg de dieta mixta	
Vitamina A, UI		5500	
Vitamina D, UI		550	
Vitamina E, UI		33	
Vitamina K, mg		1,1	
Vitamina B12, µg		15,125	
Niacina, mg		15,125	
Ácido pantoténico, mg		13,75	
Riboflavina, mg		4,125	
Biotina, mg		0,17875	
Ácido fólico, mg		0,825	
Piridoxina, mg		2,475	
Tiamina, mg		0,825	
Mineral	%	ppm suministrados (1,5 premezcla/tonelada)	Fuente
Hierro	13,33	100	Sulfato
Cinc	16,67	125	Óxido
Manganeso	6,672	50	Óxido
Cobre	2,000	15	Sulfato
Yodo	0,1709	1,28	EDDI
Selenio	0,0402	0,30	selenita
Calcio	4,815	36	-

5 Validación usando material de comida para ganado vacuno

Se realizaron pruebas en el Center for Animal Nutrigenomics and Applied Animal Nutrition en ALLTECH, Inc., KY, EE.UU. en un tipo europeo sólido de formulación de comida para ganado vacuno mezclado con cinco concentraciones diferentes de producto de MYCOSORB.

- 10 Se analizaron los materiales de comida para ganado vacuno mezclados individualmente con 0,0; 0,5; 1,0; 4,0; 5,0; 6,0 kg/T de producto de MYCOSORB así como una muestra del mismo material de comida para ganado vacuno mezclado con un nivel desconocido de producto de MYCOSORB cuando se distribuyeron sobre una misma placa de microtitulación.

Aplicabilidad

- 15 Se realizó la validación para determinar las características de un ensayo ELISA desarrollado para el análisis específico del producto de MYCOSORB y alternativas, como procedimiento de punto final de trazabilidad con el fin de seguir la pista del producto en piensos complejos.

Se usaron seis niveles de un producto de MYCOSORB para la validación correspondientes al intervalo de trabajo del nivel de inclusión (0,0; 0,5; 1,0; 4,0; 5,0; 6,0 kg/T) mezclado con la muestra de comida.

5 Disolución diluida de anticuerpo policlonal de conejo: se adaptó la dilución del anticuerpo primario según los niveles de fondo. Por tanto, se diluyeron los anticuerpos hasta 1:2.500 en PBS añadiendo 1 µl de disolución de anticuerpo n.º 1 a 1,2 ml de PBS, 1X. Fue necesario un volumen de 10 ml de disolución para cada placa de microtitulación.

Anticuerpo de cabra anti-conejo diluido: se adaptó la dilución del anticuerpo secundario según los niveles de fondo. Por tanto, se diluyeron los anticuerpos hasta 1:20.000 en PBS añadiendo 1 µl de disolución de anticuerpo n.º 2 a 20,0 ml de PBS, 1X.

Homogeneidad

10 Se logró la verificación de homogeneidad de la muestra para la mediana del nivel de inclusión de producto de MYCOSORB (4,0 kg/T) en el plan experimental. Se repitió el ensayo para este nivel particular 5 veces con 10 muestras individuales usando 4 réplicas en cada uno.

Según los valores calculados que se encuentran detallados en la tabla 7, el CV_H fue del 4,53%.

15 Tabla 7. Evaluación de homogeneidad con una única concentración de 4,0 kg/T de producto de MYCOSORB mezclado en un tipo europeo de dieta para ganado vacuno evaluado a través del procedimiento de ELISA para 5 ejecuciones con 10 preparaciones de muestra individuales analizadas en 4 réplicas.

N.º de ejecución	4	5	8	9	11	Promedio
<i>n</i>	4 x 10					
DO _{450 nm} promedio	1,155	1,055	0,833	1,166	1,044	1,051
σ _h	0,118	0,080	0,077	0,083	0,100	-
% de CV _h	10,21	7,58	9,27	7,09	9,59	-
Homogeneidad, % de CV _H	8,75					

Calibración

20 Se realizó la calibración del ensayo con la comida mezclada con una concentración de muestra patrón conocida tal como se describe en el presente documento y en el intervalo de 0,0 a 6,0 kg/T de producto de MYCOSORB. Se usó un ajuste lineal de curvas, $y = Ax$, para definir la relación entre concentración y respuesta (DO₄₅₀). Se muestra la curva patrón promedio de 5 ejecuciones en la figura 4.

Linealidad

25 Se evaluó la linealidad de las curvas patrón a partir del cálculo del coeficiente de regresión según la ecuación de los niveles de inclusión representados gráficamente frente a la absorbencia como DO₄₅₀ usando la recta de ajuste óptimo que pasa por el origen, $\Delta DO_{450} = Ax(\text{MYCOSORB})$ después de restar el blanco. Se verifica la linealidad de la curva patrón con un valor hallado del coeficiente de correlación superior a $r^2 > 0,95$, tabla 8.

Tabla 8. Linealidad de las curvas patrón.

N.º de ejecución	4	5	8	9	11	Promedio
Fecha	10/6/09	17/6/09	30/6/09	14/7/09	5/8/09	1/6 Valor aberrante
<i>n</i>	50	50	50	50	50	-
Pendiente (A)	0,2702	0,2249	0,2161	0,2179	0,2444	0,2347
Error cuadrático medio (ECM) *	0,0037	0,0005	0,0034	0,0008	0,0009	-
Linealidad (r ²)	0,969	0,974	0,970	0,949	0,978	0,979

30 * El error cuadrático medio se define en los modelos de regresión lineal como: $ECM = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n e_i^2$, donde $e_i = y_i - \hat{y}_i$; y_i es el valor de y medido experimentalmente; \hat{y}_i es el valor teórico para la concentración x_i esperada de producto de MYCOSORB.

Repetibilidad

35 La repetibilidad es una medida de la varianza interna mediante la evaluación de la desviación estándar de la repetibilidad. Se ha obtenido la evaluación de la repetibilidad dentro de la repetición de una ejecución de la misma muestra en el mismo día para la misma ejecución, por el mismo técnico, con el mismo equipo y método para representar la variación de la detección dentro de una ejecución, CV_{intra} (tabla 9). Se obtuvo la evaluación de la repetibilidad entre ejecuciones diferentes de la misma muestra en días diferentes durante ejecuciones diferentes, por el mismo técnico, con el mismo equipo y método para representar la variación de la detección entre ejecuciones, CV_{inter} (tabla 10).

Los resultados muestran que las curvas patrón obtenidas tanto en el mismo día como en días diferentes tienen escasa variabilidad, con una precisión dentro de un día promedio del 5,70% y una precisión entre días del 7,86% cuando se aplican a un intervalo de trabajo de curva patrón entre 0,0 y 6,0 kg/T. La precisión global fue del 8,28% (tabla 11).

5 Tabla 9. Precisión de la repetibilidad dentro de una ejecución para la construcción de curva patrón.

Concentración (kg/T)		0,0	0,5	1,0	4,0	5,0	6,0
Día 1 Ejecución n.º 4	DO ₄₅₀ nm	1,022	1,221	1,425	2,284	2,292	2,564
	σ_{intra}	0,033	0,056	0,117	0,071	0,062	0,132
	% de CV	3,26	4,60	8,20	3,11	2,69	5,14
Día 2 Ejecución n.º 5	DO ₄₅₀ nm	1,024	1,238	1,335	2,039	2,076	2,335
	σ_{intra}	0,031	0,073	0,030	0,215	0,077	0,153
	% de CV	3,03	5,91	2,21	10,54	3,72	6,55
Día 3 Ejecución n.º 8	DO ₄₅₀ nm	0,871	1,066	1,231	1,807	1,953	2,088
	σ_{intra}	0,044	0,053	0,051	0,136	0,192	0,127
	% de CV	5,06	4,96	4,17	7,53	9,82	6,08
Día 4 Ejecución n.º 9	DO ₄₅₀ nm	1,049	1,218	1,468	2,026	2,138	2,247
	σ_{intra}	0,041	0,059	0,035	0,266	0,095	0,141
	% de CV	3,93	4,86	2,39	13,12	4,44	6,26
Día 5 Ejecución n.º 11	DO ₄₅₀ nm	0,915	1,053	1,284	1,787	2,251	2,336
	σ_{intra}	0,044	0,067	0,049	0,095	0,247	0,189
	% de CV	4,79	6,34	3,85	5,30	10,98	8,09
% de CV _{intra} (precisión dentro de una ejecución)		4,01	5,33	4,16	7,92	6,33	6,42
Precisión promedio, % de CV _{intra}		5,70					

Tabla 10. Precisión de la repetibilidad entre ejecuciones para la construcción de curva patrón.

Concentración (kg/T)	0,0	0,5	1,0	4,0	5,0	6,0
DO ₄₅₀ nm	0,976	1,159	1,348	1,988	2,142	2,314
σ_{inter}	0,078	0,091	0,098	0,203	0,136	0,172
% de CV _{inter}	8,01	7,88	7,27	10,22	6,36	7,45
Precisión promedio, % de CV _{inter} (precisión entre ejecuciones)	7,86					

Tabla 11. Precisión global para la construcción de curva patrón.

Concentración (kg/T)	0,0	0,5	1,0	4,0	5,0	6,0
<i>n</i>	30	30	30	30	30	30
σ_{intra}	0,039	0,062	0,056	0,157	0,135	0,148
σ_{inter}	0,078	0,091	0,098	0,203	0,136	0,172
σ_{total}	0,080	0,095	0,101	0,215	0,149	0,185
Precisión, % de CV _{total}	8,20	8,23	7,50	10,81	6,95	7,98
Precisión global, % de CV _{total}	8,28					

L_D y L_Q (sensibilidad)

10 Se notifican los valores de L_D y L_Q en la tabla 12. Los valores de L_Q hallados estaban por debajo de la tasa de inclusión mínima recomendada de 2 kg/T del producto de MYCOSORB, permitiendo su cuantificación en el material de comida.

Límite de detección $L_D = 0,501 \pm 0,103$ kg/T

Límite de cuantificación $L_Q = 1,800 \pm 0,389$ kg/T

Tabla 12. Determinación de L_D y L_Q .

N.º de ejecución	<i>n</i>	DO ₄₅₀ del blanco		$3\sigma (\Delta DO_{450})$	$10\sigma (\Delta DO_{450})$	L_D (kg/T)	L_Q (kg/T)
		$X_{b\ inter} - X_{b\ intra}$	σ_{blanco}				
Día 1	10	0,046	0,033	0,100	0,334	0,370	1,323
Día 2	10	0,048	0,031	0,093	0,311	0,415	1,488
Día 3	10	-0,105	0,044	0,132	0,441	0,612	2,233
Día 4	10	0,072	0,041	0,124	0,412	0,568	2,100
Día 5	10	0,915	0,044	0,132	0,438	0,538	1,858

Promedio		0,116±0,018	0,387±0,061	0,501±0,103	1,800±0,389
----------	--	-------------	-------------	-------------	-------------

Exactitud

Se midió la exactitud a partir de 5 experimentos independientes que comprendían 10 muestras independientes cada uno y se ejecutaron en 4 réplicas en cada uno para la concentración de 4,0 kg/T de producto de MYCOSORB mezclado en el material de comida. Se calculó la concentración final para cada muestra según la ecuación expresada anteriormente usando los valores observados obtenidos para el cálculo de homogeneidad (tabla 13). Luego se calculó la precisión promedio a partir de la exactitud promediada obtenida para todas las ejecuciones y se comparó con la cantidad de concentración de adición conocida de 4,0 kg/T de producto de MYCOSORB mezclado en el material de comida. Se realizaron los cálculos según las ecuaciones facilitadas anteriormente.

Los resultados muestran que la evaluación de la recuperación representó una sobreestimación del 21% del contenido real del material de comida en concentración de adición conocida de producto de MYCOSORB (tabla 14).

Tabla 13. Exactitud y precisión medidas a partir de 5 experimentos independientes que comprendían 10 muestras independientes cada uno y se ejecutaron en 4 réplicas en cada uno para la concentración de 4,0 kg/T de producto de MYCOSORB mezclado en el material de comida.

N.º de ejecución	x_{TH} , Adición conocida (kg/T)	N.º de réplica, x_c (DO ₄₅₀)										\bar{x}_c	% de CV
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Día 1	4,0	5,0	4,0	5,1	3,8	4,3	4,3	3,9	4,4	3,9	4,1	4,3	9,69
Día 2	4,0	4,2	5,0	5,1	4,7	4,6	4,6	4,5	4,2	4,8	5,2	4,7	7,19
Día 3	4,0	3,6	3,6	4,1	4,4	3,8	3,9	3,7	3,9	3,3	4,3	3,9	8,79
Día 4	4,0	5,4	5,0	5,0	4,9	5,2	5,6	5,1	5,5	5,7	6,1	5,4	6,73
Día 5	4,0	4,4	4,5	3,7	4,4	4,2	4,4	3,5	4,4	4,3	4,9	4,3	9,10
% de CV_{intra} (precisión dentro de una ejecución)													8,30

Tabla 14. Recuperación global medida a partir del promedio de 5 experimentos independientes que comprendían 10 muestras independientes cada uno y se ejecutaron en 4 réplicas en cada uno para la concentración de 4,0 kg/T de producto de MYCOSORB mezclado en el material de comida.

x_{TH} , Adición conocida (kg/T)	\bar{x}_c promedio	σ_c
4,0	4,5	0,6
% de CV_{inter} (precisión entre ejecuciones)		12,62
Recuperación global (% de la concentración teórica)		112,21

Validación usando material de comida para pollos

Se realizaron pruebas en el Center for Animal Nutrigenomics and Applied Animal Nutrition en ALLTECH, Inc., KY, EE.UU. con una formulación sólida de comida para pollos mezclada con cinco concentraciones diferentes de producto de MYCOSORB.

Se analizaron los materiales de comida para pollos mezclados individualmente con 0,0; 0,5; 1,0; 4,0; 5,0; 6,0 kg/T de producto de MYCOSORB así como una muestra del mismo material de comida para pollos mezclado con un nivel desconocido de producto de MYCOSORB cuando se distribuyeron sobre una misma placa de microtitulación.

Aplicabilidad

Se realizó la validación para determinar las características de un ensayo ELISA desarrollado para el análisis del producto de MYCOSORB y alternativas, como procedimiento de punto final de trazabilidad con el fin de seguir la pista del producto mencionado con anterioridad en piensos complejos.

Se usaron seis niveles de un producto de MYCOSORB (n.º de ref. 285965) para la validación correspondientes al intervalo de trabajo de nivel de inclusión (0,0; 0,5; 1,0; 4,0; 5,0; 6,0 kg/T) mezclado con una muestra de comida.

Disolución diluida de anticuerpo policlonal de conejo: se adaptó la dilución del anticuerpo primario según los niveles de fondo. Por tanto, se diluyeron los anticuerpos hasta 1:7.500 en PBS añadiendo 1 µl de disolución de anticuerpo n.º 1 (4,15) a 7,5 ml de PBS, 1X. Fue necesario un volumen de 10 ml de disolución para cada placa de microtitulación.

Anticuerpo de cabra anti-conejo diluido: se adaptó la dilución del anticuerpo secundario según los niveles de fondo. Por tanto, se diluyeron los anticuerpos hasta 1:30.000 en PBS añadiendo 1 µl de disolución de anticuerpo n.º 2 a 30,0 ml de PBS, 1X.

Homogeneidad

Se logró la verificación de homogeneidad de la muestra para la mediana del nivel de inclusión de producto de MYCOSORB (4,0 kg/T) en el plan experimental. Se repitió el ensayo para este nivel particular 5 veces con 10 muestras individuales usando 4 réplicas en cada uno (tabla 15).

5 Tabla 15. Evaluación de homogeneidad con una única concentración de 4,0 kg/T de producto de MYCOSORB mezclado con material de comida para pollos evaluado a través del procedimiento de ELISA para 5 ejecuciones con 10 preparaciones de muestra individuales analizadas en 4 réplicas.

N.º de ejecución	2	3	4	5	6	Promedio
<i>n</i>	4 x 10					
DO _{450 nm} promedio	1,419	0,908	0,777	0,991	1,290	1,034
σ_h	0,048	0,060	0,081	0,060	0,069	-
% de CV _{<i>h</i>}	3,08	6,11	10,38	5,65	6,39	-
Homogeneidad, % de CV _{<i>H</i>}	6,32					

Calibración

10 Se realizó la calibración del ensayo con la comida mezclada con una concentración de muestra patrón conocida y en el intervalo de 0,0 a 6,0 kg/T de producto de MYCOSORB. Se usó un ajuste lineal de curvas, $y = Ax$, para definir la relación entre concentración y respuesta (DO₄₅₀). Se compiló la curva patrón promedio de 5 ejecuciones en la figura 5.

Linealidad

15 Se evaluó la linealidad de las curvas patrón a partir del cálculo del coeficiente de regresión según la ecuación de los niveles de inclusión representados gráficamente frente a la absorbencia como DO₄₅₀ usando la recta de ajuste óptimo que pasa por el origen, $\Delta DO_{450} = Ax$ (MYCOSORB) después de restar el blanco. Se verifica la linealidad de la curva patrón con un valor hallado del coeficiente de correlación superior a $r^2 > 0,95$. El coeficiente de regresión calculado para cada curva de ejecución patrón y para la curva de ejecución patrón promediada se notifica en la tabla 16.

Tabla 16. Linealidad de las curvas patrón en el material de comida para pollos.

N.º de ejecución	2	3	4	5	6	Media de curva promediada
Fecha	21/4/09	22/4/09	23/4/09	24/4/09	28/5/09	1/6 Valor aberrante
<i>n</i>	50	50	50	50	50	-
Pendiente (A)	0,2954	0,1904	0,1555	0,2282	0,2302	0,2199
Error cuadrático medio (ECM) *	0,0123	0,0018	0,0118	0,0003	0,0006	-
Linealidad (r ²)	0,995	0,999	0,991	0,992	0,992	0,997

20 * El error cuadrático medio se define en los modelos de regresión lineal como: $ECM = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n e_i^2$, donde $e_i^2 = v_i - \hat{y}_i$; y_i es el valor de *y* medido experimentalmente; \hat{y}_i es el valor teórico para la concentración x_i esperada de producto de MYCOSORB.

Repetibilidad

25 La repetibilidad es una medida de la varianza interna mediante la evaluación de la desviación estándar de la repetibilidad. La evaluación de la repetibilidad dentro de la repetición de una ejecución se obtuvo de la misma muestra en el mismo día para la misma ejecución, por el mismo técnico, con el mismo equipo y método para representar la variación de la detección dentro de una ejecución, CV_{*intra*} (tabla 17). Se obtuvo la evaluación de la repetibilidad entre ejecuciones diferentes de la misma muestra en días diferentes durante ejecuciones diferentes, por el mismo técnico, con el mismo equipo y método para representar la variación de la detección entre ejecuciones, CV_{*inter*} (tabla 18).

30 Los resultados muestran que las curvas patrón obtenidas tanto en el mismo día como en días diferentes tienen escasa variabilidad, con una precisión dentro de un día promedio del 6,00%. Sin embargo, la diferencia entre muestras fue más pronunciada con una precisión entre días del 21,52% y una precisión global del 21,75% (tabla 19) cuando se aplican a un intervalo de trabajo de curva patrón entre 0,0 y 6,0 kg/T.

35 Tabla 17. Precisión de la repetibilidad dentro de una ejecución para la construcción de curva patrón.

Concentración (kg/T)	0,0	0,5	1,0	4,0	5,0	6,0
Día 1 DO _{450 nm}	0,380	0,606	0,728	1,622	1,837	2,114

ES 2 691 260 T3

Ejecución n.º 2	σ_{intra} % de CV	0,031 8,17	0,018 3,01	0,041 5,59	0,104 6,40	0,070 3,82	0,098 4,62
Día 2 Ejecución n.º 3	DO ₄₅₀ nm σ_{intra} % de CV	0,310 0,030 9,55	0,401 0,034 8,44	0,492 0,021 4,30	1,092 0,030 2,77	1,237 0,016 1,32	1,463 0,050 3,40
Día 3 Ejecución n.º 4	DO ₄₅₀ nm σ_{intra} % de CV	0,227 0,019 8,14	0,344 0,017 5,08	0,418 0,020 4,86	0,856 0,025 2,89	0,950 0,041 4,31	1,192 0,035 2,97
Día 4 Ejecución n.º 5	DO ₄₅₀ nm σ_{intra} % de CV	0,343 0,058 17,01	0,457 0,032 6,96	0,617 0,029 4,70	1,338 0,057 4,23	1,491 0,140 9,42	1,644 0,124 7,52
Día 5 Ejecución n.º 6	DO ₄₅₀ nm σ_{intra} % de CV	0,361 0,064 17,61	0,517 0,011 2,09	0,588 0,035 5,99	1,341 0,069 5,12	1,561 0,109 6,99	1,661 0,047 2,84
% de CV _{intra} (precisión dentro de una ejecución)		12,10	5,12	5,09	4,28	5,17	4,27
Precisión promedio, % de CV _{intra}		6,00					

Tabla 18. Precisión de la repetibilidad entre ejecuciones para la construcción de curva patrón.

Concentración (kg/T)	0,0	0,5	1,0	4,0	5,0	6,0
DO ₄₅₀ nm	0,324	0,465	0,568	1,250	1,415	1,615
σ_{inter}	0,060	0,102	0,119	0,289	0,337	0,337
% de CV _{inter}	18,54	21,88	20,93	23,14	23,78	20,86
Precisión promedio, % de CV _{inter} (precisión entre ejecuciones)	21,52					

Tabla 19. Precisión global para la construcción de curva patrón.

Concentración (kg/T)	0,0	0,5	1,0	4,0	5,0	6,0
<i>n</i>	30	30	30	30	30	30
σ_{intra}	0,059	0,034	0,034	0,071	0,060	0,060
σ_{inter}	0,060	0,102	0,119	0,289	0,337	0,337
σ_{total}	0,063	0,102	0,120	0,290	0,338	0,338
Precisión, % de CV _{total}	19,35	21,99	21,05	23,22	23,90	20,96
Precisión global, % de CV _{total}	8,28					

L_D y L_Q (sensibilidad)

5 Se notifican los valores de L_D y L_Q en la tabla 20. Los valores de L_Q hallados están por debajo de la tasa de inclusión recomendada del producto de MYCOSORB permitiendo su cuantificación en material de comida.

Límite de detección $L_D = 0,547 \pm 0,237$ kg/T

Límite de cuantificación $L_Q = 1,864 \pm 0,806$ kg/T

Tabla 20. Determinación de L_D y L_Q en material de comida para pollos.

	<i>n</i>	DO ₄₅₀ del blanco		L_D (ΔDO_{450})	L_Q (ΔDO_{450})	x_D (kg/T)	x_Q (kg/T)
		$X_{b\ inter} - X_{b\ intra}$	σ_{blanco}				
Día 1	10	0,056	0,031	0,093	0,311	0,316	1,093
Día 2	10	-0,014	0,030	0,089	0,297	0,467	1,552
Día 3	10	-0,097	0,019	0,056	0,185	0,357	1,228
Día 4	10	0,018	0,058	0,175	0,583	0,767	2,622
Día 5	10	0,037	0,064	0,191	0,636	0,829	2,827
Promedio					0,121±0,059	0,402±0,196	0,547±0,237

Exactitud

10 Se midió la exactitud a partir de 5 experimentos independientes que comprendían 10 muestras independientes cada uno y se ejecutaron en 4 réplicas en cada uno para la concentración de 4,0 kg/T de producto de MYCOSORB mezclado en el material de comida. Se calculó la concentración final para cada muestra tal como se describe en el presente documento usando los valores observados obtenidos para el cálculo de homogeneidad (tabla 21). Luego se calculó la precisión promedio a partir de la exactitud promediada obtenida para todas las ejecuciones y se comparó con la cantidad de concentración de adición conocida de 4,0 kg/T de producto de MYCOSORB mezclado

15

en el material de comida. Se realizaron los cálculos según las ecuaciones facilitadas en el presente documento.

Los resultados muestran que la recuperación representó una sobreestimación del 18% del contenido real del material de comida en concentración de adición conocida de producto de MYCOSORB (tabla 22).

5 Tabla 21. Exactitud y precisión medidas a partir de 5 experimentos independientes que comprendían 10 muestras independientes cada uno y se ejecutaron en 4 réplicas en cada uno para la concentración de 4,0 kg/T de producto de MYCOSORB mezclado en el material de comida.

N.º de ejecución	x_{TH} , Adición conocida (kg/T)	N.º de réplica, x_c (DO ₄₅₀)										\bar{x}_c	% de CV
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Día 1	4,0	4,8	5,2	4,8	4,7	4,8	4,6	5,0	4,8	4,7	4,7	4,8	2,92
Día 2	4,0	5,0	4,6	4,9	4,5	4,9	4,2	4,6	5,0	5,0	4,9	4,8	5,80
Día 3	4,0	4,9	6,2	4,6	5,5	4,9	5,0	4,7	5,0	5,0	4,3	5,0	9,84
Día 4	4,0	4,7	4,4	4,0	4,2	3,9	4,7	4,4	4,4	4,3	4,3	4,3	5,36
Día 5	4,0	4,1	4,3	4,8	4,4	4,8	4,6	4,8	5,0	5,0	5,0	4,7	6,060
% de CV_{intra} (precisión dentro de una ejecución)												6,00	

Tabla 22. Recuperación global medida a partir del promedio de 5 experimentos independientes que comprendían 10 muestras independientes cada uno y se ejecutaron en 4 réplicas en cada uno para la concentración de 4,0 kg/T de producto de MYCOSORB mezclado en el material de comida.

x_{TH} , Adición conocida (kg/T)	\bar{x}_c promedio	σ_c
4,0	4,7	0,2
% de CV_{inter} (precisión entre ejecuciones)		5,07
Recuperación global (% de la concentración teórica)		117,95

10 Validación usando material de comida para cerdos

Se realizaron pruebas en el Center for Animal Nutrigenomics and Applied Animal Nutrition de ALLTECH, Inc., KY, EE.UU. con una formulación sólida de comida para cerdos mezclada con cinco concentraciones diferentes de producto de MYCOSORB.

15 Se analizaron los materiales de comida para cerdos mezclados individualmente con 0,0; 0,5; 1,0; 4,0; 5,0; 6,0 kg/T de producto de MYCOSORB así como una muestra del mismo material de comida para cerdos mezclado con un nivel desconocido de producto de MYCOSORB cuando se distribuyeron sobre una misma placa de microtitulación.

Aplicabilidad

20 Se realizó la validación para determinar las características de un ensayo ELISA desarrollado para el análisis del producto de MYCOSORB y alternativas, como procedimiento de punto final de trazabilidad con el fin de seguir la pista del producto en piensos complejos.

Se usaron seis niveles de un producto de MYCOSORB para la validación correspondientes al intervalo de trabajo de nivel de inclusión (con 0,0; 0,5; 1,0; 4,0; 5,0; 6,0 kg/T) mezclado con muestra de comida.

25 Disolución diluida de anticuerpo policlonal de conejo: se adaptó la dilución del anticuerpo primario según los niveles de fondo. Por tanto, se diluyeron los anticuerpos hasta 1:3.500 en PBS añadiendo 1 μ l de disolución de anticuerpo n.º 1 a 3,5 ml de PBS, 1X. Fue necesario un volumen de 10 ml de disolución para cada placa de microtitulación.

Anticuerpo de cabra anti-conejo diluido: se adaptó la dilución del anticuerpo secundario según los niveles de fondo. Por tanto, se diluyeron los anticuerpos hasta 1:30.000 en PBS añadiendo 1 μ l de disolución de anticuerpo n.º 2 a 30,0 ml de PBS, 1X.

Homogeneidad

30 Se logró la verificación de homogeneidad de la muestra para la mediana del nivel de inclusión de producto de MYCOSORB (4,0 kg/T) en el plan experimental. Se repitió el ensayo para este nivel particular 5 veces con 10 muestras individuales usando 4 réplicas en cada uno (tabla 23).

35 Tabla 23. Evaluación de homogeneidad con una única concentración de 4,0 kg/T de producto de MYCOSORB mezclado con material de comida para cerdos evaluado a través del procedimiento de ELISA para 5 ejecuciones con 10 preparaciones de muestra individuales analizadas en 4 réplicas.

N.º de ejecución	1	2	2	2	5	Promedio
------------------	---	---	---	---	---	----------

ES 2 691 260 T3

<i>n</i>	4 x 10					
DO _{450 nm} promedio	1,091	1,533	1,486	1,845	0,856	1,362
σ_{intra}	0,109	0,161	0,077	0,199	0,048	-
% de CV _H	10,02	10,51	5,15	10,76	5,57	-
Homogeneidad, % de CV _H	8,40					

Calibración

Se realizó la calibración del ensayo con la comida mezclada con una concentración de muestra patrón conocida y en el intervalo de 0,0 a 6,0 kg/T de producto de MYCOSORB. Se usó un ajuste lineal de curvas, $y = Ax$ con la ordenada en el origen fijada en cero, para definir la relación entre concentración y respuesta (DO₄₅₀). Se compiló la curva patrón promedio de 5 ejecuciones en la figura 6.

Linealidad

Se evaluó la linealidad de las curvas patrón a partir del cálculo del coeficiente de regresión según la ecuación de los niveles de inclusión representados gráficamente frente a la absorbencia como DO₄₅₀ usando la recta de ajuste óptimo, pasando la recta de ajuste óptimo por el origen, $\Delta DO_{450} = Ax(\text{MYCOSORB})$ después de restar el blanco. Se verifica la linealidad de la curva patrón con un valor hallado del coeficiente de correlación superior a $r^2 > 0,95$. El coeficiente de regresión calculado para cada curva de ejecución patrón y para la curva de ejecución patrón promediada se notifica en la tabla 24.

Tabla 24. Linealidad de las curvas patrón en el material de comida para cerdos.

N.º de ejecución	1	2	3	4	5	Media de curva promediada
Fecha	7/5/09	12/5/09	13/5/09	22/5/09	18/8/09	1/6 Valor aberrante
<i>n</i>	50	50	50	50	50	-
Pendiente (A)	0,2522	0,2593	0,2620	0,2856	0,1818	0,1929
Error cuadrático medio (ECM) *	0,0017	0,0021	0,0020	0,0073	0,0181	-
Linealidad (r ²)	0,996	0,995	0,990	0,974	0,987	0,997

El error cuadrático medio se define en los modelos de regresión lineal como: $ECM = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n e_i^2$, donde $e_i^2 = y_i - \hat{y}_i$; y_i es el valor de y medido experimentalmente; \hat{y}_i es el valor teórico para la concentración x_i esperada de producto de MYCOSORB.

Repetibilidad

La repetibilidad es una medida de la varianza interna mediante la evaluación de la desviación estándar de la repetibilidad. Se ha obtenido la evaluación de la repetibilidad dentro de la repetición de una ejecución de la misma muestra en el mismo día para la misma ejecución, por el mismo técnico, con el mismo equipo y método para representar la variación de la detección dentro de una ejecución, C_{intra} (tabla 25). Se obtuvo la evaluación de la repetibilidad entre ejecuciones diferentes de la misma muestra en días diferentes durante ejecuciones diferentes, por el mismo técnico, con el mismo equipo y método para representar la variación de la detección entre ejecuciones, CV_{inter} (tabla 26).

Los resultados muestran que las curvas patrón obtenidas tanto en el mismo día como en días diferentes tienen escasa variabilidad, con una precisión dentro de un día promedio del 7% y una precisión entre días del 20% cuando se aplican a un intervalo de trabajo de curva patrón entre 0,0 y 6,0 kg/T.

Tabla 25. Precisión de la repetibilidad dentro de una ejecución para la construcción de curva patrón.

Concentración (kg/T)		0,0	0,5	1,0	4,0	5,0	6,0
Día 1 Ejecución n.º 1	DO _{450 nm}	0,284	0,430	0,540	1,372	1,542	1,757
	σ_{intra}	0,012	0,040	0,055	0,051	0,111	0,121
	% de CV	4,29	9,35	10,19	3,70	7,22	6,90
Día 2 Ejecución n.º 2	DO _{450 nm}	0,279	0,419	0,598	1,376	1,510	1,839
	σ_{intra}	0,035	0,028	0,011	0,040	0,201	0,137
	% de CV	12,59	6,61	1,79	2,92	13,35	7,46
Día 3 Ejecución n.º 3	DO _{450 nm}	0,259	0,432	0,490	1,417	1,590	1,742
	σ_{intra}	0,020	0,007	0,028	0,118	0,044	0,174
	% de CV	7,91	1,56	5,67	8,34	2,75	10,02
Día 4 Ejecución n.º 4	DO _{450 nm}	0,305	0,455	0,737	1,447	1,556	2,142
		0,027	0,024	0,101	0,271	0,104	0,060

ES 2 691 260 T3

	σ_{intra} % de CV	9,01	5,17	13,70	18,73	6,70	2,81
Día 5 Ejecución n.º 5	DO ₄₅₀ nm	0,236	0,308	0,374	0,735	0,876	0,984
	σ_{intra} % de CV	0,020	0,018	0,017	0,029	0,048	0,023
		8,39	5,87	4,58	3,99	5,52	2,31
% de CV _{intra} (precisión dentro de una ejecución)		8,44	5,71	7,18	7,53	7,10	5,90
Precisión promedio, % de CV _{intra}		6,98					

Tabla 26. Precisión de la repetibilidad entre ejecuciones para la construcción de curva patrón.

Concentración (kg/T)	0,0	0,5	1,0	4,0	5,0	6,0
DO ₄₅₀ nm	0,273	0,409	0,548	1,269	1,415	1,693
σ_{inter}	0,026	0,058	0,134	0,300	0,302	0,428
% de CV _{inter}	9,62	14,16	24,45	23,67	21,38	25,28
Precisión promedio, % de CV _{inter} (precisión entre ejecuciones)	19,76					

Tabla 27. Precisión global para la construcción de curva patrón.

Concentración (kg/T)	0,0	0,5	1,0	4,0	5,0	6,0
<i>n</i>	30	30	30	30	30	30
σ_{intra}	0,023	0,023	0,042	0,102	0,102	0,103
σ_{inter}	0,026	0,058	0,134	0,300	0,302	0,428
σ_{total}	0,028	0,059	0,135	0,304	0,306	0,430
Precisión, % de CV _{total}	10,33	14,39	24,70	23,94	21,63	25,42
Precisión global, % de CV _{total}	20,07					

L_D y L_Q (sensibilidad)

5 Se notifican los valores de L_D y L_Q en la tabla 28. Los valores de L_Q hallados están por debajo de la tasa de inclusión recomendada del producto de MYCOSORB, permitiendo su cuantificación en material de comida.

Límite de detección $L_D = 0,403 \pm 0,150$ kg/T

Límite de cuantificación $L_Q = 1,363 \pm 0,498$ kg/T

Tabla 28. Determinación de L_D y L_Q en material de comida para cerdos.

	N	DO ₄₅₀ del blanco		3σ (ΔDO_{450})	10σ (ΔDO_{450})	L_D (kg/T)	L_Q (kg/T)
		$X_{b\ inter} - X_{b\ intra}$	σ_{blanco}				
Día 1	10	0,064	0,071	0,111	0,371	0,613	2,054
Día 2	10	-0,006	0,035	0,105	0,351	0,407	1,386
Día 3	10	-0,027	0,020	0,061	0,205	0,234	0,795
Día 4	10	0,019	0,027	0,082	0,275	0,289	0,991
Día 5	10	-0,050	0,020	0,059	0,198	0,471	1,591
Promedio				0,084±0,024	0,280±0,080	0,403±0,150	1,363±0,498

Exactitud

10 Se midió la exactitud a partir de 5 experimentos independientes que comprendían 10 muestras independientes cada uno y se ejecutaron en 4 réplicas en cada uno para la concentración de 4,0 kg/T de producto de MYCOSORB mezclado en el material de comida. Se calculó la concentración final para cada muestra tal como se describe en el presente documento usando los valores observados obtenidos para el cálculo de homogeneidad (tabla 29). Luego se calculó la precisión promedio a partir de la exactitud promediada obtenida para todas las ejecuciones y se comparó con la cantidad de concentración de adición conocida de 4,0 kg/T de producto de MYCOSORB mezclado en el material de comida. Se realizaron los cálculos según las ecuaciones descritas en el presente documento.

Los resultados muestran que la evaluación de la recuperación representó una sobreestimación del 20% del contenido real del material de comida en concentración de adición conocida de producto de MYCOSORB (tabla 30).

20 Tabla 29. Exactitud y precisión medidas a partir de 5 experimentos independientes que comprendían 10 muestras independientes cada uno y se ejecutaron en 4 réplicas en cada uno para la concentración de 4,0 kg/T de producto de MYCOSORB mezclado en el material de comida.

N.º de	X_{TH}	N.º de réplica, x_c (DO ₄₅₀)	\bar{x}_c	% de
--------	----------	--	-------------	------

ejecución	Adición conocida (kg/T)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		CV
Día 1	4,0	4,3	4,6	3,6	3,8	4,1	3,4	5,2	4,4	5,0	4,2	4,3	12,80
Día 2	4,0	6,1	4,9	4,1	4,5	4,6	4,5	4,7	4,2	5,2	5,7	4,8	12,50
Día 3	4,0	4,9	4,4	4,3	5,1	4,6	4,9	4,6	4,4	4,7	5,1	4,7	5,91
Día 4	4,0	5,0	4,2	5,9	4,3	5,6	5,4	5,4	5,6	6,6	5,6	5,4	12,64
Día 5	4,0	4,6	4,8	4,9	4,9	4,8	5,5	4,4	5,3	4,6	5,3	4,9	6,97
% de CV_{intra} (precisión dentro de una ejecución)													10,16

Tabla 30. Recuperación global medida a partir del promedio de 5 experimentos independientes que comprendían 10 muestras independientes cada uno y se ejecutaron en 4 réplicas en cada uno para la concentración de 4,0 kg/T de producto de MYCOSORB mezclado en el material de comida.

x_{TH} , Adición conocida (kg/T)	\bar{x}_c promedio	σ_c
4,0	4,4	0,3
% de CV_{inter} (precisión entre ejecuciones)		8,47
Recuperación global (% de la concentración teórica)		120,46

Verificación usando material de comida para pollos y cerdos

- 5 Se realizó el ensayo ELISA en comida para la detección de MYCOSORB en matrices de pollo y cerdo, y se verificó en un laboratorio independiente y se comparó con los resultados de la validación. Se verificó el ensayo en Alimetrics, Ltd., Koskelontie 19B, Espoo, Finlandia.

- 10 Se realizó la calibración del ensayo en 2 días diferentes con la comida mezclada con una concentración de muestra patrón conocida en el intervalo de 0,0 a 6,0 kg/T de producto de MYCOSORB. Se usó un ajuste lineal de curvas con $y = Ax$ con la ordenada en el origen fijada en cero para definir la relación entre concentración y respuesta (DO_{450}) en piensos para cerdos y en piensos para pollos. La absorbancia y la calibración resultante difirieron significativamente entre ejecuciones diferentes; sin embargo, las concentraciones absolutas para las muestras conocidas y enmascaradas siguieron siendo iguales.

Linealidad

- 15 Se evaluó la linealidad de las curvas patrón a partir del cálculo del coeficiente de regresión según la ecuación de los niveles de inclusión representados gráficamente frente a la absorbancia como DO_{450} usando la recta de ajuste óptimo, pasando la recta de ajuste óptimo por el origen, $\Delta DO_{450} = Ax(\text{MYCOSORB})$ después de restar el blanco. Se verifica la linealidad de la curva patrón con un valor hallado del coeficiente de correlación superior a $r^2 > 0,95$. El coeficiente de correlación osciló entre 0,991 y 0,994 (tabla 31).

- 20 Tabla 31. Linealidad de las curvas patrón en el material de comida para pollos y cerdos.

N.º de ejecución	1	2	3	4	Media de curva promediada
Matriz	Comida para pollos		Comida para cerdos		-
Fecha	6/4/10	7/4/10	6/4/10	6/4/10	-
n	15	15	15	15	-
Pendiente (A)	0,0954	0,0775	0,0828	0,0809	-
Linealidad (r^2)	0,991	0,994	0,993	0,992	0,997

El error cuadrático medio se define en los modelos de regresión lineal como: $ECM = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n e_i^2$, donde $e_i^2 = y_i - \hat{y}_i$; y_i es el valor de y medido experimentalmente; \hat{y}_i es el valor teórico para la concentración x_i esperada de producto de MYCOSORB.

L_D y L_Q (sensibilidad)

- 25 Se determinaron los valores de L_D y L_Q en una matriz de ácido clorhídrico al 40%. La estimación de los valores de L_D y L_Q respectivos fue respectivamente de 0,35 y 1,20 kg/T de MYCOSORB mezclado con los piensos para pollos y de 0,27 y 0,91 kg/T de MYCOSORB mezclado con los piensos para cerdos (tabla 32 y tabla 33, respectivamente).

Tabla 32. Resultados obtenidos con las muestras de blanco en dos ejecuciones independientes llevadas a cabo con un intervalo de un día y realizadas por el laboratorio de verificación con los piensos para pollos.

	Fecha	ID de muestra	Ingesta de muestra (g)	Resultado (kg/T)
Día 1	6/4/2010	0,3	20	0,230

ES 2 691 260 T3

		0,4	20	0,150
		0,6	20	0,010
Día 2	7/4/2010	0,1	20	0,320
		0,4	20	0,110
		0,10	20	0,020
Promedio			0,140	

Tabla 33. Resultados obtenidos con las muestras de blanco en dos ejecuciones independientes llevadas a cabo con un intervalo de un día y realizadas por el laboratorio de verificación con los piensos para cerdos.

	Fecha	ID de muestra	Ingesta de muestra (g)	Resultado (kg/T)
Día 1	6/4/2010	0,2	20	0,230
		0,3	20	0,290
		0,4	20	0,082
Día 2	7/4/2010	0,1	20	0,220
		0,3	20	0,110
		0,7	20	0,064
Promedio			0,170	

Exactitud y precisión para muestras “conocidas”

- 5 Se midió la exactitud a partir de 2 experimentos independientes que comprendían 6 réplicas en cada uno con una concentración de 4,0 kg/T de producto de MYCOSORB mezclado en el material de comida. Se calculó la precisión promedio a partir de la exactitud promediada obtenida para todas las ejecuciones y se comparó con la cantidad de concentración de adición conocida de 4,0 kg/T de producto de MYCOSORB mezclado en el material de comida.

Los valores obtenidos cumplieron los criterios tanto para exactitud como para precisión, de la siguiente manera.

- 10 Se ha obtenido la evaluación de la repetibilidad dentro de la repetición de una ejecución de la misma muestra en el mismo día para la misma ejecución, por el mismo técnico, con el mismo equipo y método para representar la variación de la detección dentro de una ejecución, CV_{intra} . Se obtuvo la evaluación de la repetibilidad entre ejecuciones diferentes de la misma muestra en días diferentes durante ejecuciones diferentes, por el mismo técnico, con el mismo equipo y método para representar la variación de la detección entre ejecuciones, CV_{inter} .

- 15 Los valores obtenidos cumplieron los criterios tanto para exactitud como para precisión, de la siguiente manera para las matrices de pollo y cerdo (tabla 34 y tabla 35).

Tabla 34. Exactitud y precisión medidas a partir de pruebas con 6 réplicas realizadas en 2 días independientes usando muestras conocidas (4,0 kg/T) de producto de MYCOSORB mezclado en el material de comida para pollos.

	Fecha	ID de muestra	Ingesta de muestra (g)	Resultados (kg/T)
Día 1	4/3/2010	H.1	20	4,4
		H.2	20	4,4
		H.3	20	3,9
		H.4	20	4,1
		H.5	20	4,4
		H.6	20	4,2
Día 2	5/3/2010	H.7	20	3,8
		H.8	20	3,3
		H.9	20	3,7
		H.10	20	3,4
		H.11	20	3,8
		H.12	20	4,1
Promedio				4,0
% de CV_{intra} (precisión dentro de una ejecución)			6,6	
% de CV_{inter} (precisión entre ejecuciones)			9,7	
Recuperación global (% de la concentración teórica)			99%	

Tabla 35. Exactitud y precisión medidas a partir de pruebas con 6 réplicas realizadas en 2 días independientes usando muestras conocidas (4,0 kg/T) de producto de MYCOSORB mezclado en el material de comida para cerdos.

	Fecha	ID de muestra	Ingesta de muestra (g)	Resultados (kg/T)
Día 1	4/3/2010	H.1	20	4,7
		H.2	20	4,1
		H.3	20	4,4
		H.4	20	4,6

		H.5	20	3,8
		H.6	20	4,3
Día 2	5/3/2010	H.7	20	3,5
		H.8	20	3,7
		H.9	20	3,1
		H.10	20	3,2
		H.11	20	3,6
		H.12	20	3,5
Promedio			3,9	
% de CV_{intra} (precisión dentro de una ejecución)			7,5	
% de CV_{inter} (precisión entre ejecuciones)			14,0	
Recuperación global (% de la concentración teórica)			96%	

Exactitud y precisión para muestras “desconocidas”

Se midió la exactitud a partir de 2 experimentos independientes que comprendían 3 réplicas en cada uno con una concentración de 4,0 kg/T de producto de MYCOSORB mezclado en el material de comida en una prueba de enmascaramiento. Los valores obtenidos cumplieron los criterios tanto para exactitud como para precisión, de la siguiente manera (tabla 36 y tabla 37).

5

Tabla 36. Exactitud y precisión medidas a partir de pruebas con 3 réplicas realizadas con muestras desconocidas (4,0 kg/T) de producto de MYCOSORB mezclado en el material de comida para pollos.

Fecha de medición	ID de muestra (ml)	Ingesta de muestra (g)	Resultados (kg/T)
6/4/2010	C.6	20	4,0
	C.7	20	3,8
	C.8	20	4,1
Promedio		4,0	
Desviación estándar de la repetibilidad		0,11	
DER (%)		3,0%	

Tabla 37. Exactitud y precisión medidas a partir de pruebas con 3 réplicas realizadas con muestras desconocidas (4,0 kg/T) de producto de MYCOSORB mezclado en el material de comida para cerdos.

Fecha de medición	ID de muestra (ml)	Ingesta de muestra (g)	Resultados (kg/T)
6/4/2010	C.6	20	4,5
	C.7	20	3,8
	C.8	20	4,4
Promedio		4,2	
Desviación estándar de la repetibilidad		0,36	
DER (%)		8,5%	

10 Robustez

El análisis de robustez evalúa la capacidad del método de medición para resistir a cambios en los resultados cuando se somete a cambios menores en las variables ambientales y de procedimiento.

15

Se investigó la estabilidad del ensayo ELISA cambiando la dilución de anticuerpo primario y secundario, la estabilidad del anticuerpo primario, cambiando la distribución de las diferentes muestras que iban a someterse a prueba en las placas de microtitulación (una única placa que contenía todas las muestras que iban a medirse y que comprendía el blanco, los patrones y la muestra desconocida frente a múltiples placas de microtitulación que comprendían más repeticiones por muestra analizada pero en las que el blanco, los patrones y la muestra desconocida están en placas de microtitulación diferentes). La tabla 38 notifica las variaciones y muestra que los resultados son coherentes, incluso con los cambios realizados, indicando una fuerte robustez de la prueba especialmente con la variación en las diluciones de anticuerpo.

20

Tabla 38 . Prueba de robustez. Se muestran en negrita las condiciones habituales. También se destacan el diez por ciento de alteraciones si se hallan.

Condición alterada	Valor de la condición	Muestra de comida	x_c	Recuperación	CV_{intra}	CV_{inter}	CV_{total}
Anticuerpo primario, Ac secundario	1:2000	Ganado	4,45	120,98	7,90	10,85	12,06
	1:2500	vacuno	4,47	121,06	8,98	13,86	15,13
	1:4000		4,44	121,01	10,54	10,18	14,12
	1:5000		4,49	123,30	9,57	13,42	16,14
Anticuerpo primario,	1:2000	Ganado	4,37	119,56	10,03	9,39	12,70

Ac secundario 1:30.000	1:2500	vacuno	4,55	121,75	8,86	14,58	15,73
	1:4000		4,30	115,85	10,66	11,11	14,10
	1:5000		4,35	117,29	9,91	14,55	16,33
Estabilidad de anticuerpo primario	2 - 8°C	Pollos	4,8	134,80	5,59	-	-
	1 semana, TA		4,9	138,10	6,85	-	-
Distribución de placa	Única placa	Pollos	4,72	120,68	6,13	5,19	8,07
	Múltiples placas		4,82	124,23	5,99	5,89	8,11

Ejemplo 5

Pruebas de especificidad de anticuerpos monoclonales

Métodos

5 Se sometieron a prueba diecisiete compuestos a una concentración de 50 µg/ml en PBS para determinar la reactividad cruzada por anticuerpos monoclonales producidos contra conjugado de (1→4)-α-D-glucano de levadura/(1→6)-β-D-glucano-BSA.

10 Los compuestos sometidos a prueba fueron: almidón de patata soluble, almidón de arroz, almidón de trigo, almidón de maíz, BSA, glucógeno (de conejo), glucógeno (de ostra), glucógeno (bovino), manano, laminarina, zimosina A, Maltrin QD, glucano de levadura de panadería, (1→3)-β-D-glucano de *Eug. gracilis*, levadura de *Torula*, batidora de bolas Ycw-02 (fracción de pared celular de levadura - preparación de batidora de bolas), β glucano de cebada.

15 También se sometieron a prueba el extracto de pared celular de levadura (lote de MYCOSORB n.º 08FS001) y el (1→4)-α-D-glucano/(1→6)-β-D-glucano-antígeno de BSA usados para producir el anticuerpo monoclonal a concentraciones de 1 µg/ml, 2 µg/ml y 5 µg/ml. Se sometieron a ensayo ambos anticuerpos monoclonales (513A161.1 y 513A431.1) en el siguiente intervalo de diluciones: 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:1500 y 1:2000. Se usaron placas de microtitulación Nunc de noventa y seis pocillos con el lote n.º 0702013. Se recubrieron las placas con 100 µl/pocillo de compuesto y se agitaron dando golpecitos 8-10 veces con las yemas de los dedos. Se cubrieron las placas con cinta selladora y se incubaron durante 1 h a 37°C. Se retiró disolución y se lavaron las placas 3 veces con 200 µl de PBS por lavado usando una pipeta multicanal. Se les dieron golpecitos a las placas 8-10 veces con las yemas de los dedos antes de retirar cada disolución de lavado. Entre los lavados, se retiró el fluido en exceso dando golpecitos a la placa con toallitas de papel. Para el bloqueo, se añadieron 100 µl/pocillo de leche al 3% (sin centrifugar). Se incubaron las placas 1 h a temperatura ambiente. Se retiró la disolución de bloqueo y se lavaron los pocillos con 1 x 200 µl de PBS, 2 x 200 µl de PBS + polisorbato 20 al 0,05%. Se agitaron las placas dando golpecitos 8-10 veces con las yemas de los dedos antes de la retirada de cada disolución de lavado. Entre los lavados, se retiró el fluido en exceso dando golpecitos a la placa con toallitas de papel.

25 Se añadieron 100 µl de cada dilución de sueros apropiados por pocillo. Se usó PBS (100 µl/pocillo) para los pocillos de blanco. Se incubó la placa, se cubrió, durante 1 h a temperatura ambiente. Se retiró disolución y se lavaron los pocillos 3 veces con 200 µl de PBS + polisorbato 20 al 0,05% cada vez. Se le dieron golpecitos a la placa 8-10 veces con las yemas de los dedos para agitarla antes de la retirada de cada lavado. Entre los lavados, se retiró el fluido en exceso dando golpecitos a la placa con toallitas de papel. Se añadieron cien µl del anticuerpo secundario (1:10.000 anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón, conjugado con peroxidasa) por pocillo. Se incubó la placa, se cubrió, durante 1 h a temperatura ambiente. Se retiró disolución y se lavaron los pocillos 3 veces con 200 µl por lavado de PBS + polisorbato 20 al 0,05%. Se le dieron golpecitos a la placa 8-10 veces con las yemas de los dedos para agitarla antes de la retirada de cada lavado. Entre los lavados, se retiró el fluido en exceso dando golpecitos a la placa con toallitas de papel.

35 Se añadieron 100 µl del sustrato de TMB a temperatura ambiente por pocillo. Después de 5 minutos, se detuvo la reacción con 100 µl por pocillo de HCl 1 N. Se limpiaron los fondos de placa despejándolos de huellas dactilares, y después de una agitación durante 10 segundos, se leyó la absorbancia a 450 nm usando un lector de placas de microtitulación.

Resultados

40 Se muestran gráficos de barras de los datos de ELISA en las figuras 9-14. Ambos 513A161.1 y 513A431.1 reaccionaron de forma muy robusta con el antígeno 499-73-3 a una concentración de tan sólo 1 µg/ml, produciendo 2 µg/ml la lectura de absorbancia más intensa. Los anticuerpos también pudieron reconocer 08FS001 a concentraciones que oscilaron entre 1 µg/ml y 5 µg/ml, con la lectura de absorbancia más intensa a 5 µg/ml. Sin embargo, la absorbancia fue significativamente menor para 08FS001 que para el antígeno 499-73-3. El anticuerpo 513A161.1 reconoció laminarina y reaccionó significativamente con la misma, pero no lo hizo 513A431.1. Ambos anticuerpos tuvieron una lectura de absorbancia muy intensa para zimosina A que fue similar y a veces más intensa que la absorbancia observada con el antígeno 499-73-3. Sorprendentemente, los anticuerpos mostraron una reacción cruzada significativa con zimosina A, Maltrin QD, glucano de levadura de panadería, (1→3)-β-D-glucano de *Eug. gracilis*, levadura de *Torula* y gránulo de batidora de bolas Ycw-02, limitando su uso para ensayos ELISA

cuantitativos.

Ejemplo 6

Intentos para optimizar las condiciones del ensayo ELISA para anticuerpos monoclonales para detectar antígeno extraído de comida

5 *Dilución en PBS frente a PBS+leche desnatada en polvo al 3%*

Los intentos para usar el anticuerpo monoclonal 513A161.1 (ejemplo 5) para detectar antígeno extraído de comida en ensayos ELISA cuantitativos dieron como resultado bajas lecturas de absorbancia. Para determinar si la dilución de los anticuerpos en leche al 3% en contraposición a PBS afectó a las lecturas de absorbancia (por ejemplo, provocando un bloqueo excesivo cuando se estaba en combinación con componentes de extracto de comida), se realizó el siguiente protocolo:

Se sometieron extractos del extracto de pared celular de levadura (lote de MYCOSORB n.º 08FS001) a un procedimiento de extracción química tal como se comenta en el ejemplo 4 por medio de una disolución que contenía HCl al 0,5%. Se realizaron ensayos ELISA tal como se describe en el ejemplo 5, usando el anticuerpo monoclonal 513A161 a una dilución de 1:400 como anticuerpo primario y anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón-HRP (1:10.000) diluido o bien en PBS o bien en leche al 3% como anticuerpo secundario. Se recubrieron las placas de microtitulación con extracto de pared celular de levadura a 100 µl/pocillo o con extracto diluido 1:1 en PBS a 200 µl/pocillo.

Los resultados mostrados en la figura 15 establecieron que se observó un efecto ligero pero estadísticamente no significativo de los diluyentes de anticuerpo. Adicionalmente, los intentos para usar el anticuerpo monoclonal para detectar antígeno en patrones de comida extraídos con HCl al 0,5%, los triplicados dieron como resultado una enorme variabilidad en las lecturas entre réplicas, grandes desviaciones estándar y lecturas de absorbancia infladas.

Etapas de recubrimiento con antígeno - temperatura y tiempo

Los intentos para usar el anticuerpo monoclonal 513A161.1 (ejemplo 5) para detectar antígeno extraído de comida en ensayos ELISA cuantitativos dieron como resultado bajas lecturas de absorbancia. Para aumentar las lecturas de absorbancia del ELISA usando el anticuerpo monoclonal de ratón 513A161.1, se realizó el siguiente experimento para determinar si el cambio del tiempo y la temperatura de la etapa de incubación y recubrimiento de antígeno mejoraría la detección de antígeno extraído de comida sin aumentar el fondo/la unión no específica.

El protocolo consistió en llevar a cabo la extracción de comida tal como se describió anteriormente para generar muestras de análisis. Las alícuotas de muestra o bien se recubrieron sobre la placa inmediatamente o bien se almacenaron durante la noche a -25°C. Se repitió la preparación de muestras 3 veces para generar extracciones por triplicado. Se preparó una curva patrón de seis puntos (0, 0,4, 0,8, 1,2, 1,8, 2,4 kg/T) usando antígeno en preparaciones de comida para pollos. Se recubrieron las placas con curva patrón de extracto de comida y se dejaron incubar o bien a 4°C durante la noche (estacionario), 4°C durante la noche (oscilación) o bien a 37°C durante 1 hora (estacionario). Se realizaron ensayos ELISA tal como se describe en el ejemplo 5 usando el anticuerpo monoclonal 513A161.1 a una dilución de 1:400 preparada en leche al 3% como anticuerpo primario y anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón-HRP (1:10.000) diluido en leche al 3% como anticuerpo secundario. La incubación del sustrato tuvo lugar durante 30 minutos, y se determinó la absorbancia a 450 nm.

Los resultados mostrados en la figura 16 indican que el cambio del tiempo y la temperatura a los que se recubrió el antígeno sobre la placa no aumentó la absorbancia hasta un intervalo óptimo ni tampoco afectó a la linealidad de la curva patrón. Además, aumentó el fondo independientemente del tiempo de incubación.

Ejemplo 7

Pruebas de selectividad de anticuerpos policlonales (interferencia)

Para determinar el grado de interferencia, se realizó un conjunto de ensayos usando el material de comida para pollos descrito en el presente documento sin y con producto de MYCOSORB (n.º de ref. 285965) presente a 1 kg/T, siendo esto último sin o con varias proporciones de posibles productos que interfieren (50%, 100%, 200% comparado con el nivel de inclusión producto de MYCOSORB, p/p) pertenecientes a los hidratos de carbono o productos secundarios hallados en formulaciones de comida. A este respecto, se han investigado los siguientes productos y se sometieron a prueba para evaluar su impacto sobre la detección del producto de MYCOSORB a través de la metodología exacta en el presente documento:

- 50 • Amilosa (almidón de patata): (1→4):(1→6)-α-D-glucanos con una razón 30:1.
- Maltodextrinas y sólidos de jarabe de maíz: hidratos de carbono fácilmente digeribles producidos a partir de almidón de maíz natural, polímero de dextrosa.
- Glucógeno (de hígado bovino, tipo IX): (1→4):(1→6)-α-D-glucanos con una razón 10:1.

- Laminarina (de *Laminaria digitata*): (1→3);β(1→6)-β-D-glucanos con una razón 3:1.
- Residuos secos de destilería; subproductos de la producción de bioetanol a partir de maíz.
- Levadura de vinificación seca activa para champán Red Star® Pasteur (de *Saccharomyces bayanus*): levadura y pared celular de levadura (hidratos de carbono complejos compuestos por (1→3);β(1→6)-β-D-glucanos, (1→4):(1→6)-α-D-polimánosa unida a proteínas, (1→2):(1→4)-β-N-acetilglucosamina).

Tal como se muestra en la figura 7 y la figura 8, la suma de las diferencias entre las señales obtenidas con el producto de MYCOSORB y el producto de MYCOSORB mezclado con el 50, el 100, el 200% (p/p) de interferente, fue aproximadamente un valor de DO₄₅₀ de 0. Los resultados representan una falta de interferencia y, por tanto, las propiedades específicas del ensayo para la detección de producto de MYCOSORB en matriz de comida compleja consistieron en diferentes interferentes de hidratos de carbono.

Se facilitan resultados detallados para cada interferente individual y los límites de la prueba de ANOVA de un factor, para un intervalo de confianza del 95%, en la tabla 39 a la tabla 44 en las que se calcularon valores promedio de densidad óptica (450 nm) y diferencias entre muestras, así como la desviación estándar y el coeficiente de variación. Se evaluó la homogeneidad de las varianzas dentro de cada interferente usando las pruebas de Levene, O'Brien y Brown y Forsythe. En el caso de varianzas no constante, se usó el método de ANOVA de un factor de Kruskal-Willis no paramétrico, con una transformación de rangos que dio como resultado pruebas más robustas con respecto a la no normalidad, y resistencia a valores aberrantes. Se realizaron los análisis en placas independientes para cada concentración de interferente sometido a prueba o en una única placa individual. Se obtuvieron resultados idénticos para las dos preparaciones de placa.

Tabla 39. Valores promedio de DO₄₅₀ obtenidos para el producto de MYCOSORB cuando se mezcló con el 0, el 50, el 100, el 200% (p/p) de amilosa en comida para pollos. Se analizaron las diferencias entre los valores por medio de ANOVA de un factor y pruebas estadísticas de comparación de medias con un intervalo de confianza del 95%.

MYCOSORB 1 kg/T		MYCOSORB / razones de interferente (p/p)		
		+ 50%	+ 100%	+ 200%
ANOVA		No paramétrica de un factor de Kruskal-Wallis		
Amilosa	Blanco (comida sólo)			
	N	24	24	24
	Media (DO ₄₅₀)	0,3317	0,3538	0,3638
	Rango de media	20,396 ^C	40,479 ^C	48,625 ^C
	σ _{intra}	0,0157	0,0234	0,0242
	% de CV _{intra}	4,7471	6,6116	6,6448
	Control			
	N	24	24	24
	Media (DO ₄₅₀)	0,6601	0,7073	0,6294
	Rango de media	154,25 ^{AB}	196,48 ^A	113,17 ^B
	σ _{intra}	0,0348	0,0351	0,0206
	% de CV _{intra}	5,2709	4,9578	3,2661
	Control + amilosa			
	N	24	24	24
	Media (DO ₄₅₀)	0,6352 ^B	0,6561 ^{AB}	0,6365 ^B
	Rango de media	122,40 ^B	151,13 ^{AB}	129,58 ^B
	σ _{intra}	0,0200	0,0221	0,0346
	% de CV _{intra}	3,1418	3,3738	5,4299
Media de diferencia (DO ₄₅₀)	-0,0249	-0,0512	0,071	
Rango de media de diferencia	-31,85	-45,35	16,41	
Valor de Z crítico	3,197			
Valor crítico para comparación	57,678			

Tabla 40. Valores promedio de DO₄₅₀ obtenidos para el producto de MYCOSORB cuando se mezcló con el 0, el 50, el 100, el 200% (p/p) de maltodextrinas en comida para pollos. Se analizaron las diferencias entre los valores por medio de ANOVA de un factor y pruebas estadísticas de comparación de medias con un intervalo de confianza del 95%.

MYCOSORB 1 kg/T		MYCOSORB / razones de interferente (p/p)		
		+ 50%	+ 100%	+ 200%
ANOVA		Paramétrica de un factor y prueba de comparación de Tukey		
Malto-dextrinas	Blanco (comida sólo)			
	N	24	24	24
	Media (DO ₄₅₀)	0,3628 ^C	0,3818 ^B	0,3587 ^C

	σ_{intra}	0,0274	0,0288	0,0367
	% de CV_{intra}	7,5505	7,5414	10,218
	Control			
	N	24	24	24
	Media (DO ₄₅₀)	0,7022 ^A	0,6426 ^B	0,6822 ^A
	σ_{intra}	0,0276	0,0247	0,0276
	% de CV_{intra}	3,9264	3,8422	4,0480
	Control + maltodextrinas			
	N	24	24	24
	Media (DO ₄₅₀)	0,7088 ^A	0,6271 ^B	0,6407 ^B
σ_{intra}	0,0490	0,0449	0,0342	
% de CV_{intra}	6,9145	7,1518	5,3306	
Diferencia	0,0066	-0,0155	-0,0415*	
Valor crítico	0,0308			
σ para comparación	0,0099			

Tabla 41. Valores promedio de DO₄₅₀ obtenidos para el producto de MYCOSORB cuando se mezcló con el 0, el 50, el 100, el 200% (p/p) de glucógeno en comida para pollos. Se analizaron las diferencias entre los valores por medio de ANOVA de un factor y pruebas estadísticas de comparación de medias con un intervalo de confianza del 95%.

MYCOSORB 1 kg/T		MYCOSORB / razones de interferente (p/p)		
		+ 50%	+ 100%	+ 200%
ANOVA		No paramétrica de un factor de Kruskal-Wallis		
Glucógeno	Blanco (comida sólo)			
	N	24	24	24
	Media (DO ₄₅₀)	0,4452	0,4414	0,4495
	Rango de media	35,604 ^B	33,458 ^B	40,437 ^B
	σ_{intra}	0,0311	0,0235	0,0270
	% de CV_{intra}	6,9773	5,3259	6,0070
	Control			
	N	24	24	24
	Media (DO ₄₅₀)	0,8522	0,8423	0,8339
	Rango de media	150,33 ^A	143,69 ^A	137,54 ^A
	σ_{intra}	0,0610	0,0433	0,0312
	% de CV_{intra}	7,1611	5,1412	3,7443
	Control + glucógeno			
	N	24	24	24
	Media (DO ₄₅₀)	0,8474	0,8367	0,8051
Rango de media	149,94 ^A	140,06 ^A	124,58 ^A	
σ_{intra}	0,0358	0,0576	0,0584	
% de CV_{intra}	4,2302	6,8847	7,2482	
Media de diferencia (DO ₄₅₀)	-0,0048	-0,0056	-0,0288	
Rango de media de diferencia	0,39	-3,63	-12,96	
Valor de Z crítico	3,197			
Valor crítico para comparación	De 55,547 a 62,103			

5 Tabla 42. Valores promedio de DO₄₅₀ obtenidos para el producto de MYCOSORB cuando se mezcló con el 0, el 50, el 100, el 200% (p/p) de laminarina en comida para pollos. Se analizaron las diferencias entre los valores por medio de ANOVA de un factor y pruebas estadísticas de comparación de medias con un intervalo de confianza del 95%.

MYCOSORB 1 kg/T		MYCOSORB / razones de interferente (p/p)		
		+ 50%	+ 100%	+ 200%
ANOVA		No paramétrica de un factor de Kruskal-Wallis		
Laminarina	Blanco (comida sólo)			
	N	24	24	24
	Media (DO ₄₅₀)	0,3580	0,3478	0,3673
	Rango de media	37,88 ^{DE}	31,15 ^E	40,48 ^{DE}
	σ_{intra}	0,0428	0,0522	0,0553
	% de CV_{intra}	11,951	14,998	15,063
	Control			
	N	24	24	24
	Media (DO ₄₅₀)	0,5618	0,5981	0,5224

	<i>Rango de media</i>	126,96 ^{BC}	157,79 ^{AB}	94,708 ^{CD}
	σ_{intra}	0,0488	0,0229	0,0233
	% de CV_{intra}	8,6916	3,8358	4,4521
	Control + laminarina			
	<i>N</i>	24	24	24
	<i>Media</i> (DO ₄₅₀)	0,6288	0,5630	0,6155
	<i>Rango de media</i>	187,33 ^A	125,50 ^{BC}	174,21 ^{AB}
	σ_{intra}	0,0245	0,0341	0,0312
	% de CV_{intra}	3,8924	6,0501	5,0624
	<i>Media de diferencia</i> (DO ₄₅₀)	-0,0670	-0,0351	0,0931
<i>Rango de media de diferencia</i>	60,37*	-32,29	79,502*	
Valor de Z crítico	3,197			
Valor crítico para comparación	57,68			

Tabla 43 . Valores promedio de DO₄₅₀ obtenidos para el producto de MYCOSORB cuando se mezcló con el 0, el 50, el 100, el 200% (p/p) de levadura para vinificación RED STAR en comida para pollos. Se analizaron las diferencias entre los valores por medio de ANOVA de un factor y pruebas estadísticas de comparación de medias con un intervalo de confianza del 95%.

MYCOSORB 1 kg/T		MYCOSORB / razones de interferente (p/p)		
		+ 50%	+ 100%	+ 200%
ANOVA		No paramétrica de un factor de Kruskal-Wallis		
Levadura para vinificación	Blanco (comida sólo)			
	<i>N</i>	24	24	24
	<i>Media</i> (DO ₄₅₀)	0,3533	0,3396	0,3490
	<i>Rango de media</i>	41,75 ^B	29,90 ^B	37,85 ^B
	σ_{intra}	0,0240	0,0205	0,0261
	% de CV_{intra}	6,7991	6,0454	7,4902
	Control			
	<i>N</i>	24	24	24
	<i>Media</i> (DO ₄₅₀)	0,6223	0,5566	0,5846
	<i>Rango de media</i>	169,90 ^A	117,38 ^A	135,13 ^A
	σ_{intra}	0,0534	0,0546	0,0413
	% de CV_{intra}	8,5726	9,8003	7,0725
	Control + levadura Red Star®			
	<i>N</i>	24	24	24
	<i>Media</i> (DO ₄₅₀)	0,5977	0,6098	0,5950
<i>Rango de media</i>	145,65 ^A	156,17 ^A	142,79 ^A	
σ_{intra}	0,0257	0,0253	0,0274	
% de CV_{intra}	4,2986	4,1468	4,6038	
<i>Media de diferencia</i> (DO ₄₅₀)	-0,0246	0,0532	0,0104	
<i>Rango de media de diferencia</i>	-24,25	38,79	7,66	
Valor de Z crítico	3,197			
Valor crítico para comparación	57,68			

5 Tabla 44. Valores promedio de DO₄₅₀ obtenidos para el producto de MYCOSORB cuando se mezcló con el 0, el 50, el 100, el 200% (p/p) de residuos secos de destilería en comida para pollos. Se analizaron las diferencias entre los valores por medio de ANOVA de un factor y pruebas estadísticas de comparación de medias con un intervalo de confianza del 95%.

MYCOSORB 1 kg/T		MYCOSORB / razones de interferente (p/p)		
		+ 50%	+ 100%	+ 200%
ANOVA		No paramétrica de un factor de Kruskal-Wallis		
Residuos secos de destilería	Blanco (comida sólo)			
	<i>N</i>	24	24	24
	<i>Media</i> (DO ₄₅₀)	0,3504	0,3465	0,3458
	<i>Rango de media</i>	38,81 ^C	35,85 ^C	34,83 ^C
	σ_{intra}	0,0464	0,0515	0,0510
	% de CV_{intra}	13,228	14,858	14,744
	Control			
	<i>N</i>	24	24	24
	<i>Media</i> (DO ₄₅₀)	0,8338	0,7825	0,7793
	<i>Rango de media</i>	151,46 ^{AB}	108,19 ^B	129,58 ^{AB}

σ_{intra}	0,0411	0,0240	0,0934
% de CV_{intra}	4,9341	3,0669	11,990
Control + residuos secos de destilería			
<i>N</i>	24	24	24
<i>Media</i> (DO ₄₅₀)	0,8476	0,8136	0,8741
<i>Rango de media</i>	162,73 ^{AB}	134,40 ^{AB}	180,65 ^A
σ_{intra}	0,0382	0,0489	0,0465
% de CV_{intra}	4,5019	6,0098	5,3191
Diferencia	0,0138	0,0311	0,0948
	11,27	26,21	51,07
Valor crítico	3,197		
σ para comparación	57,68		

5 Resultarán evidentes diversas modificaciones y variaciones del método y sistema descrito de la invención para los expertos en la técnica. Aunque se ha descrito la invención en relación con realizaciones específicas preferidas, debe entenderse que la invención tal como se reivindica no ha de limitarse indebidamente a tales realizaciones específicas. En efecto, se pretende que diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para los expertos en los campos de la química de los hidratos de carbono, la microbiología, la nutrición y comida para animales, la inmunología, o campos relacionados estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar un componente de pared celular de levadura en una muestra, que comprende:
 - 5 - proporcionar una muestra de alimento o comida seleccionada del grupo que consiste en comida para ganado, comida para animales de compañía, ración total mezclada (TMR), forraje, gránulo de comida, concentrado de comida, producto conjunto de premezcla de comida, cereales, cereales de destilería, melaza, fibra, pasto, hierba, heno, semilla, hojas, harina, comida soluble y extractos de los mismos;
 - 10 - llevar a cabo un ensayo que comprende poner en contacto un anticuerpo primario que puede unirse a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en (1→4)- α -D-glucano, (1→6)- β -D-glucano y (1→4)- α -(1→6)- β -D-glucano con la muestra en condiciones tales que el anticuerpo primario forma un complejo con el antígeno, si está presente; y usar un anticuerpo secundario para detectar el complejo anticuerpo primario-antígeno, en el que detectar el complejo anticuerpo primario-antígeno proporciona una indicación de la presencia del componente de pared celular de levadura en la muestra.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el método comprende obtener el extracto a partir de la muestra usando disolvente orgánico y ácido.
- 15 3. Método según la reivindicación 1, en el que el método comprende obtener el extracto a partir de la muestra usando dimetilsulfóxido y ácido clorhídrico.

FIGURA 1

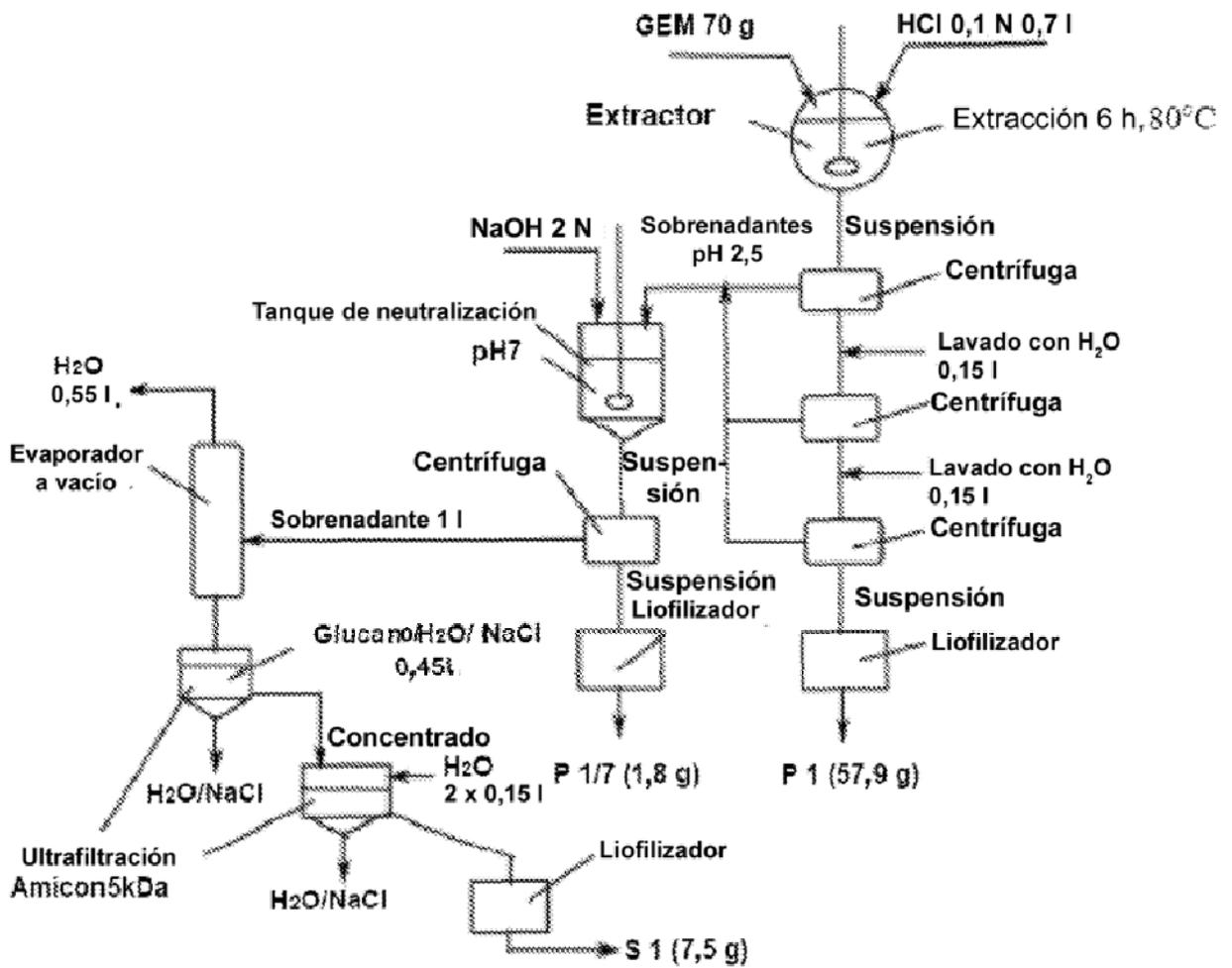


FIGURA 2

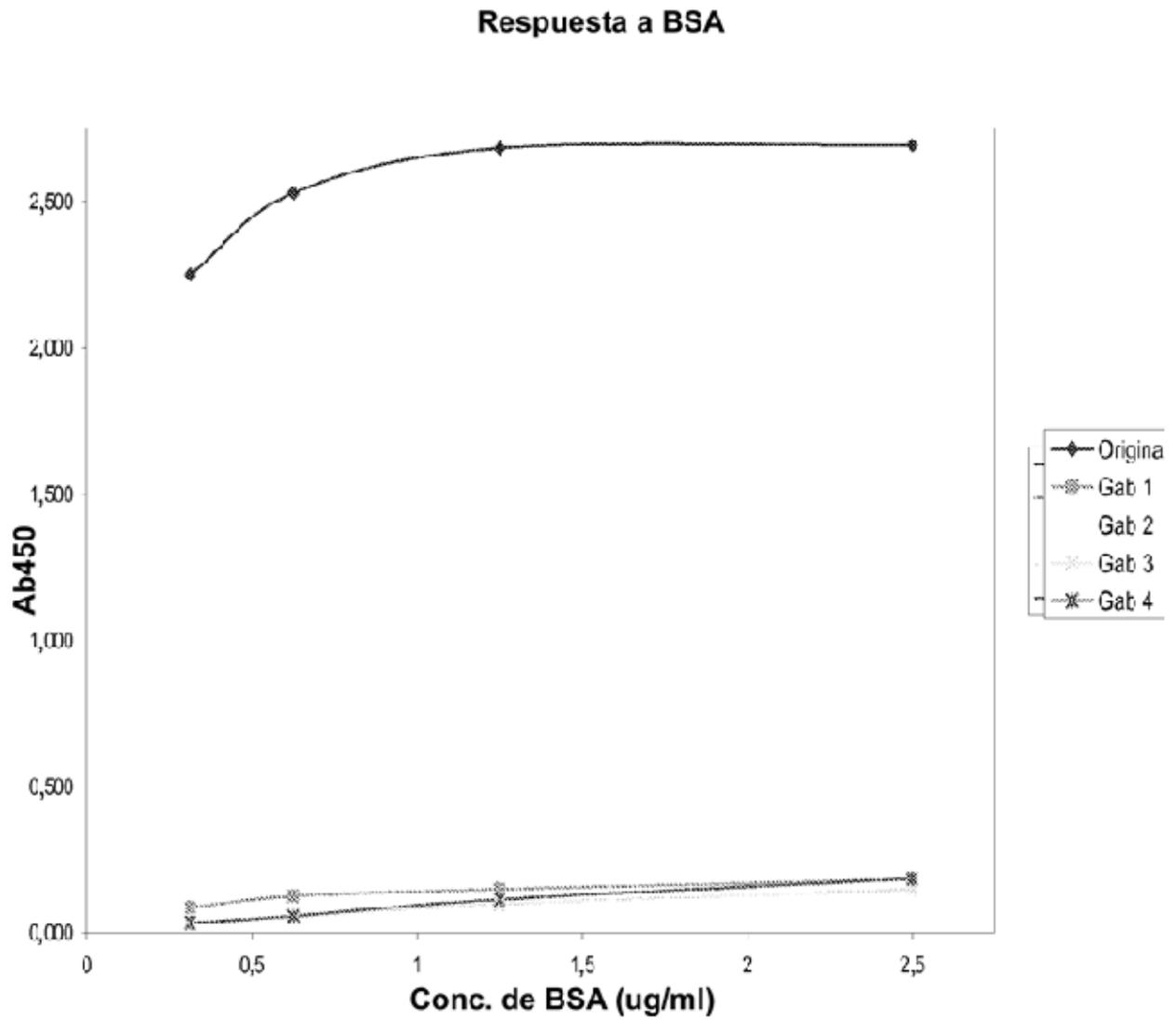


FIGURA 3

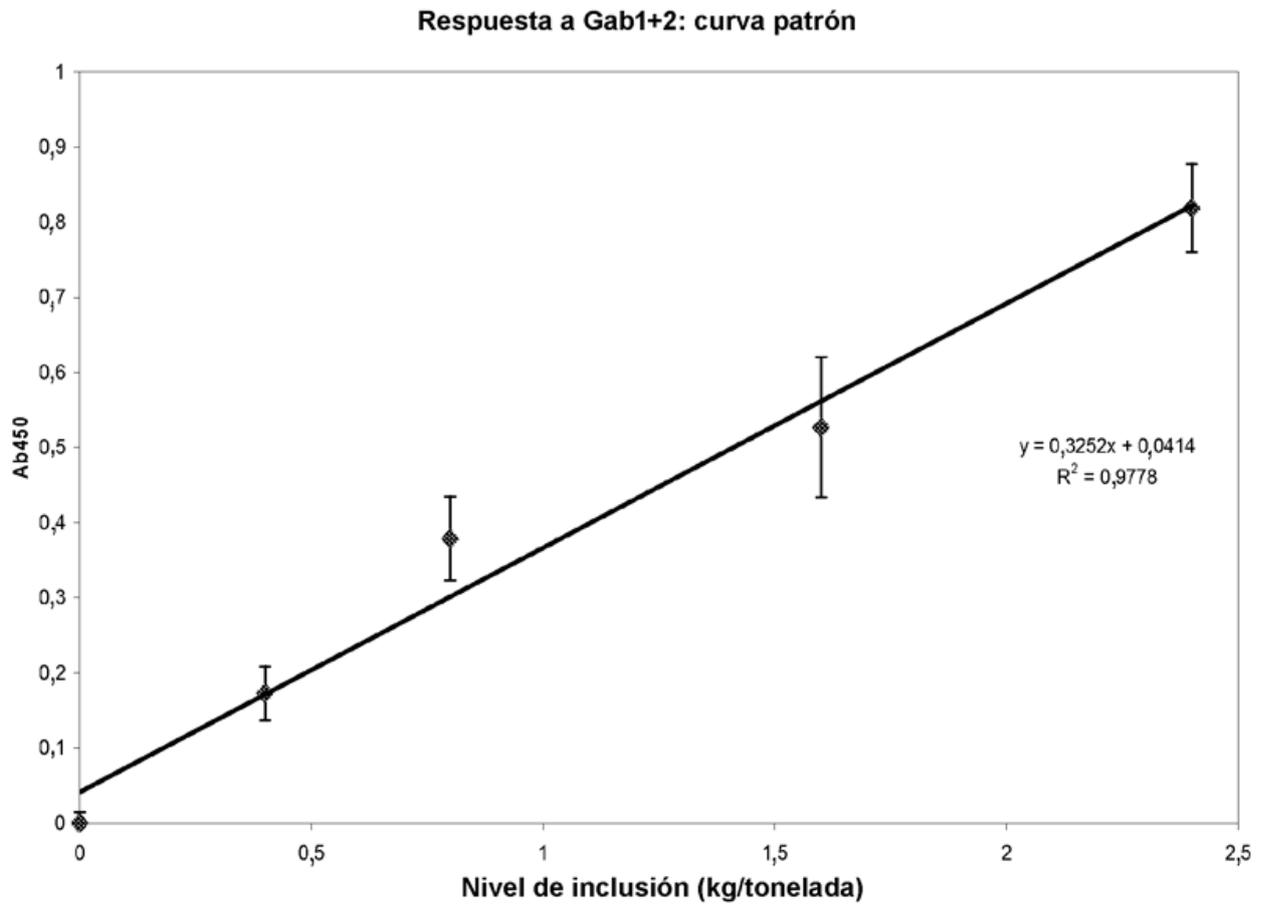


FIGURA 4

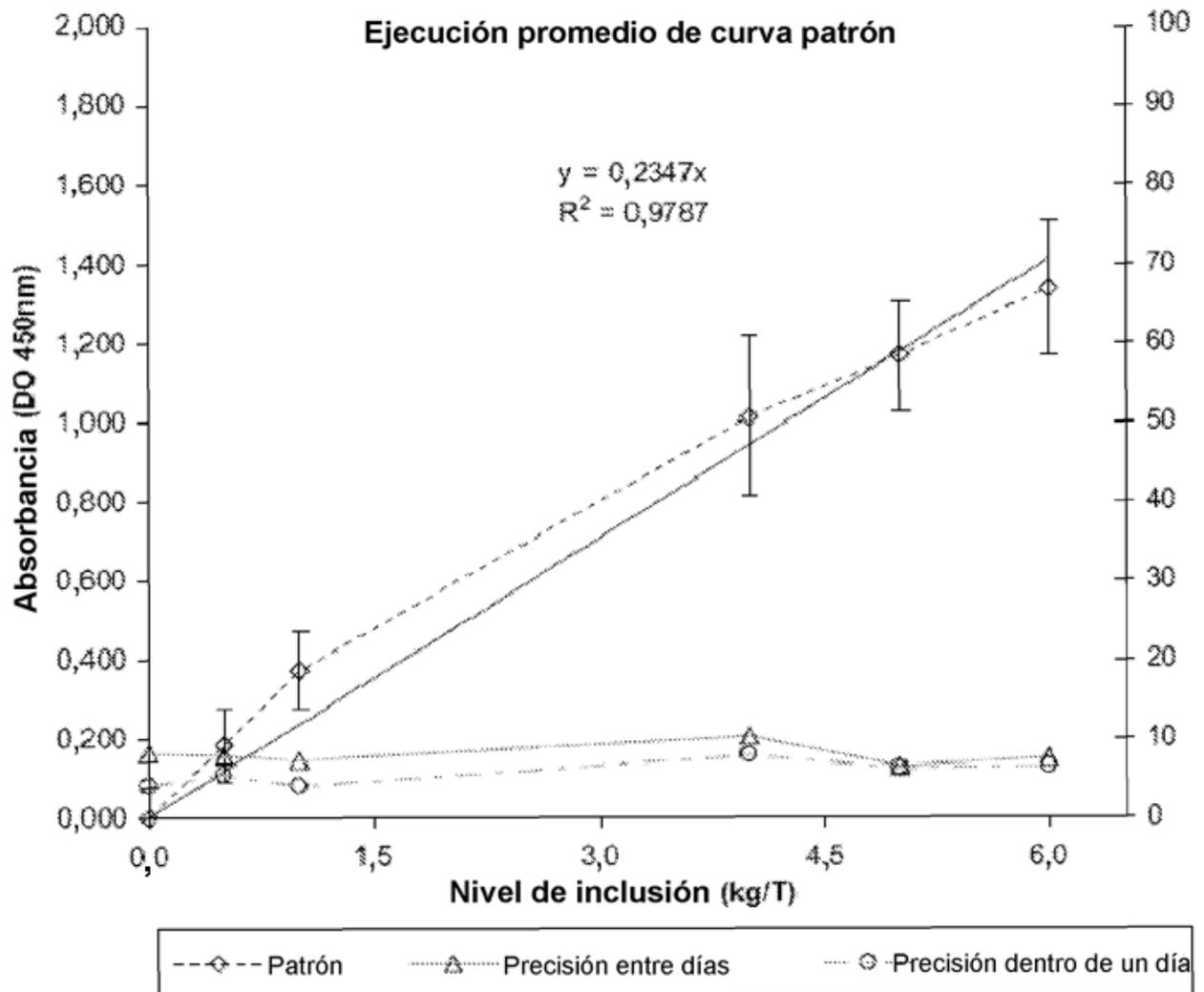


FIGURA 5

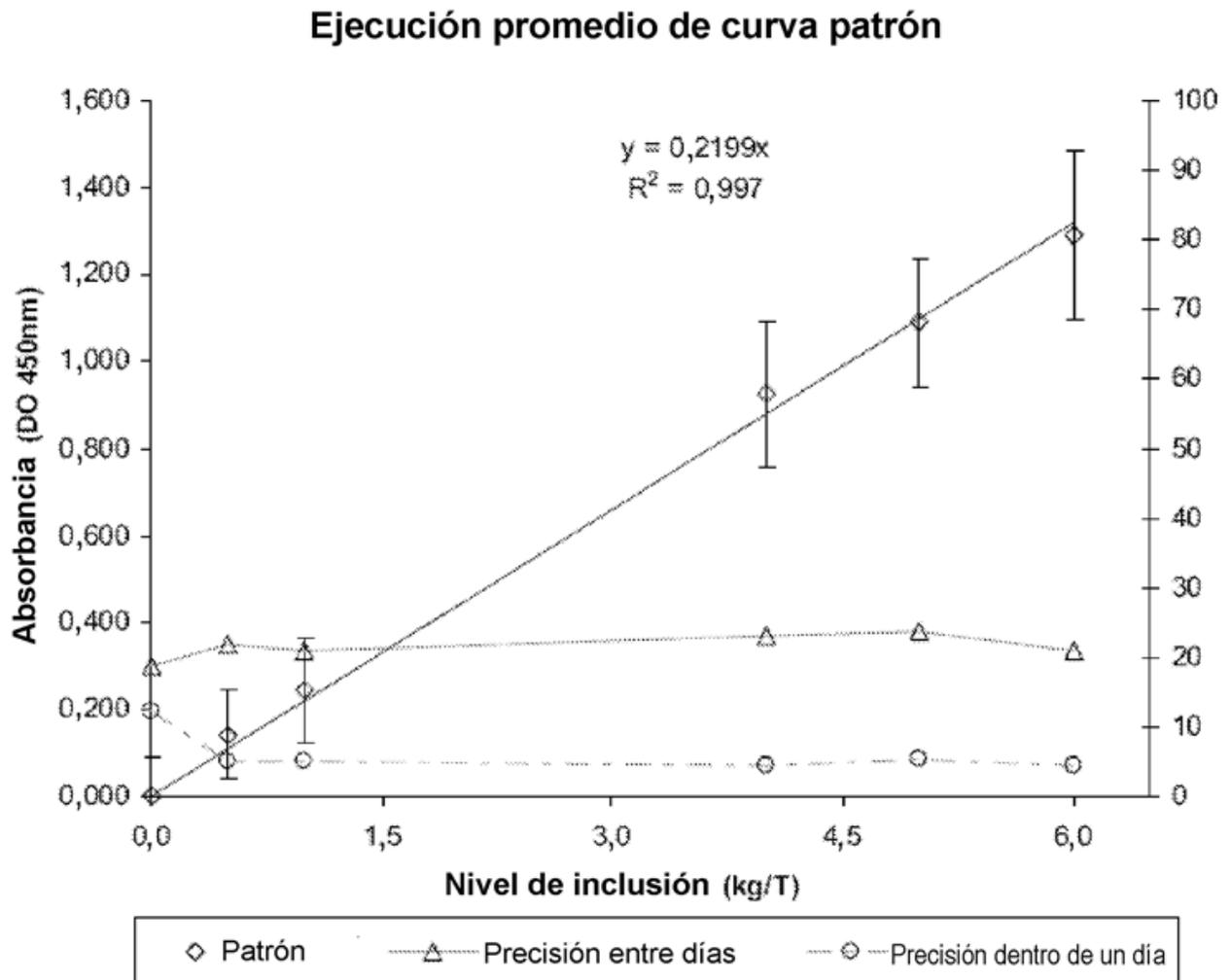


FIGURA 6

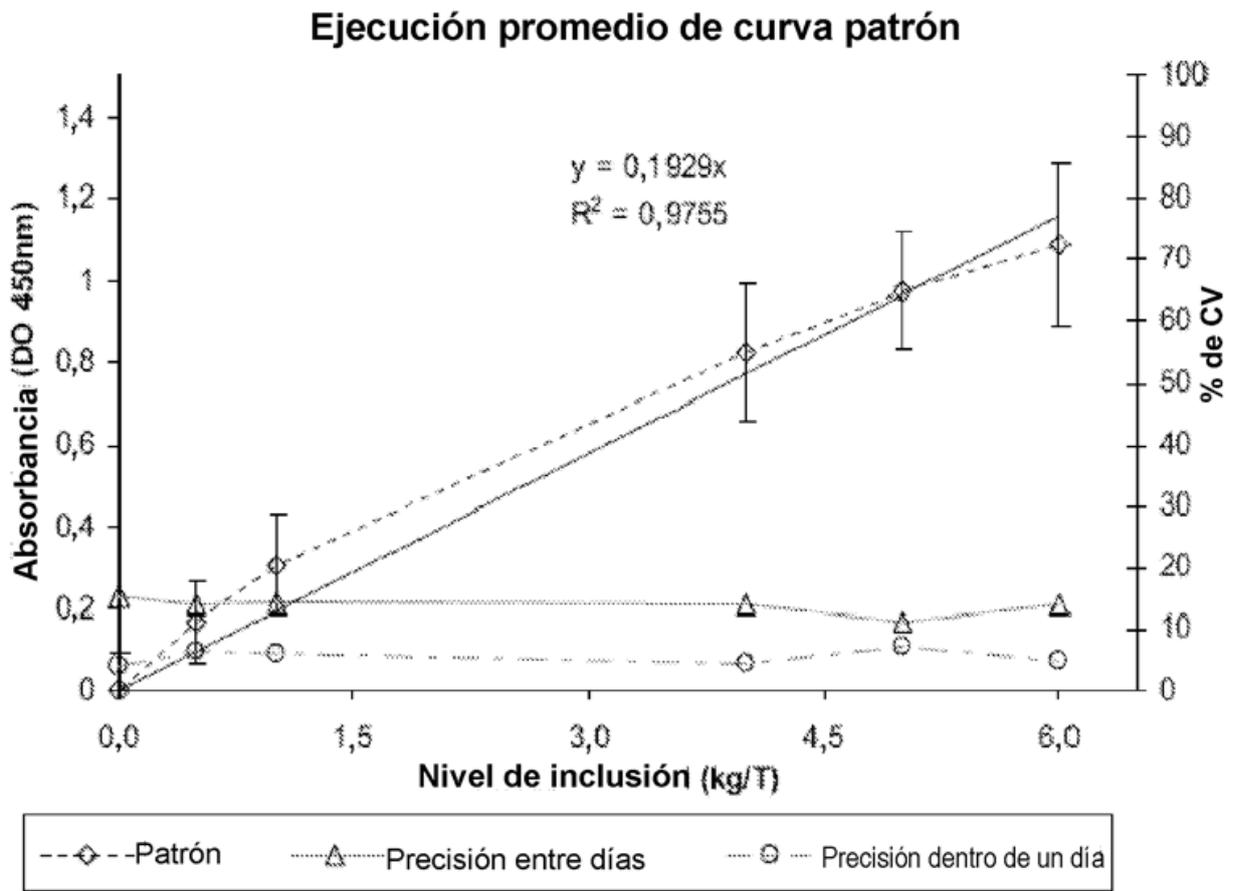


FIGURA 7

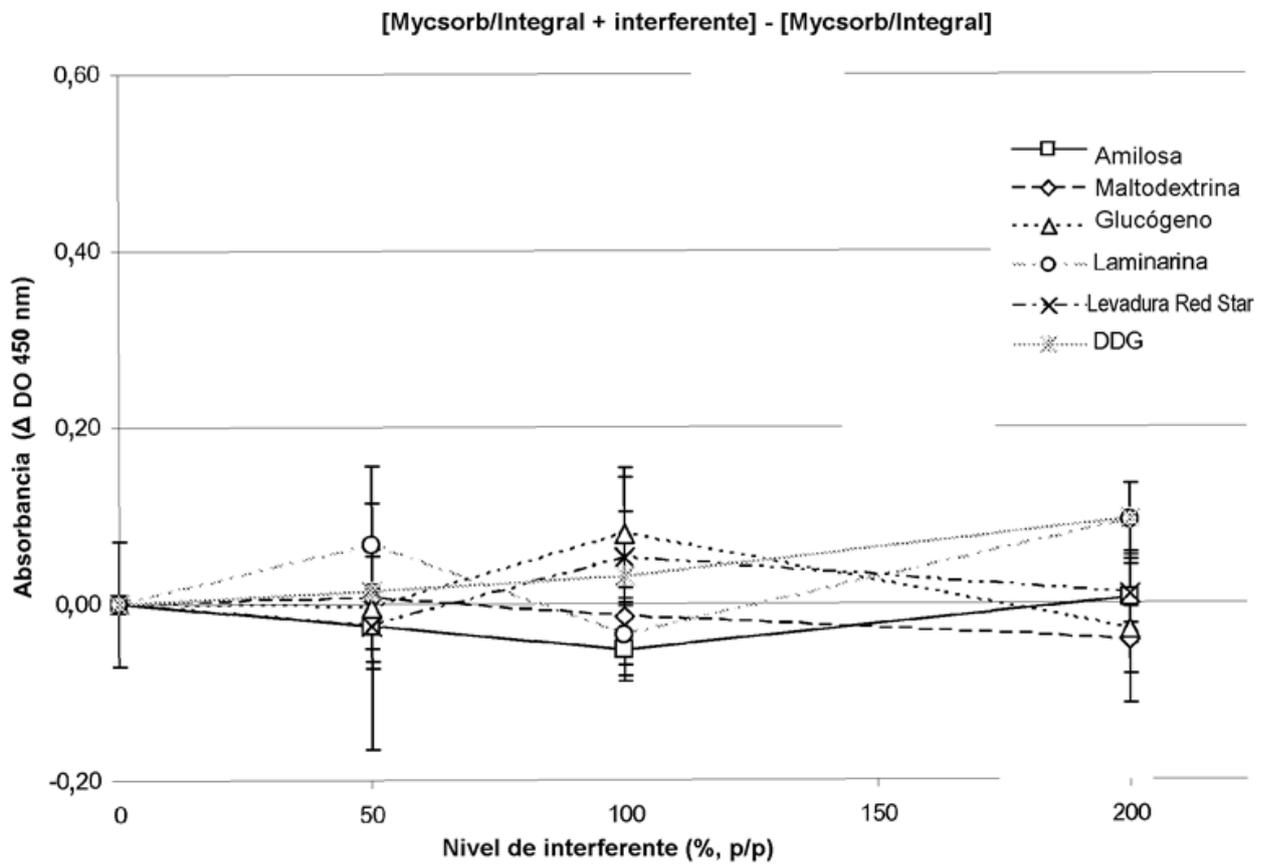


FIGURA 8

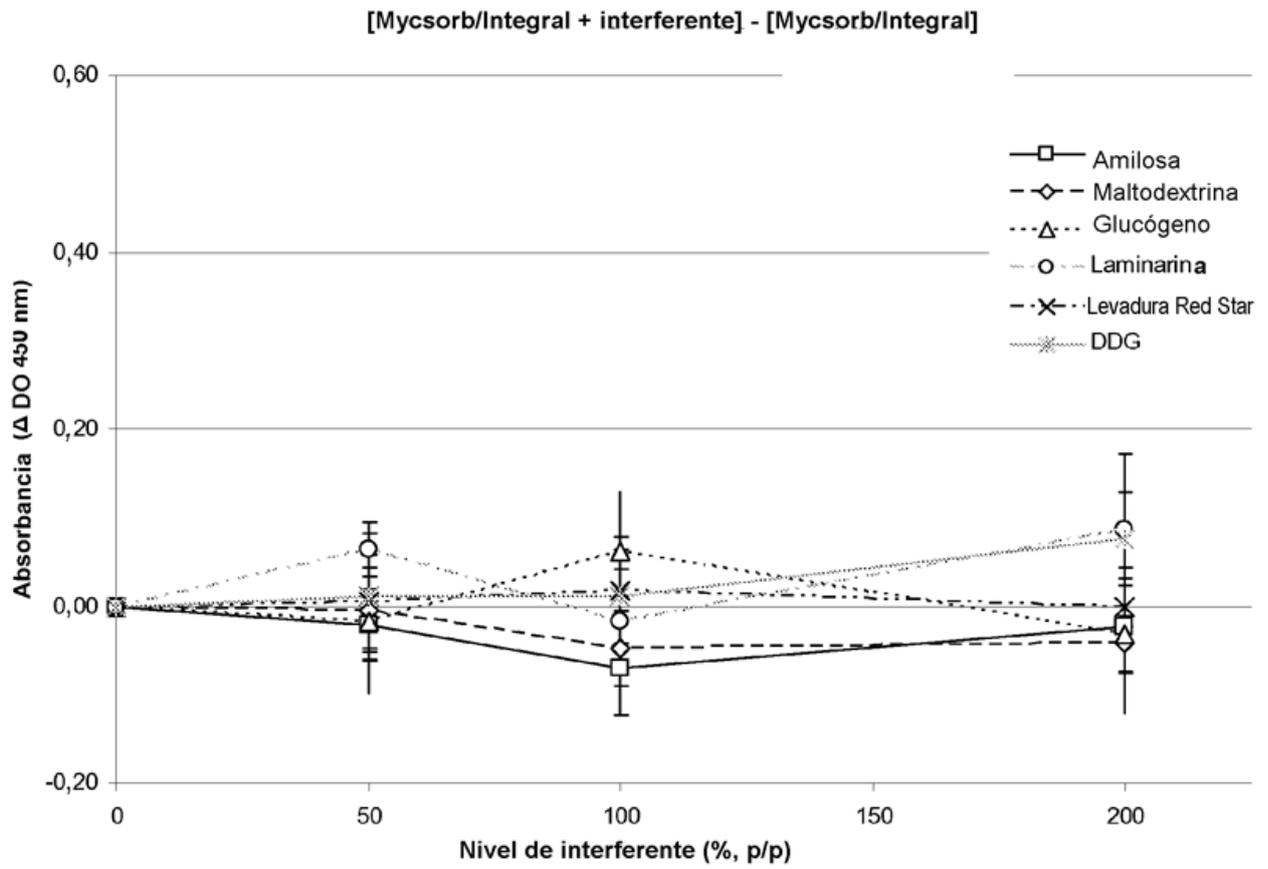
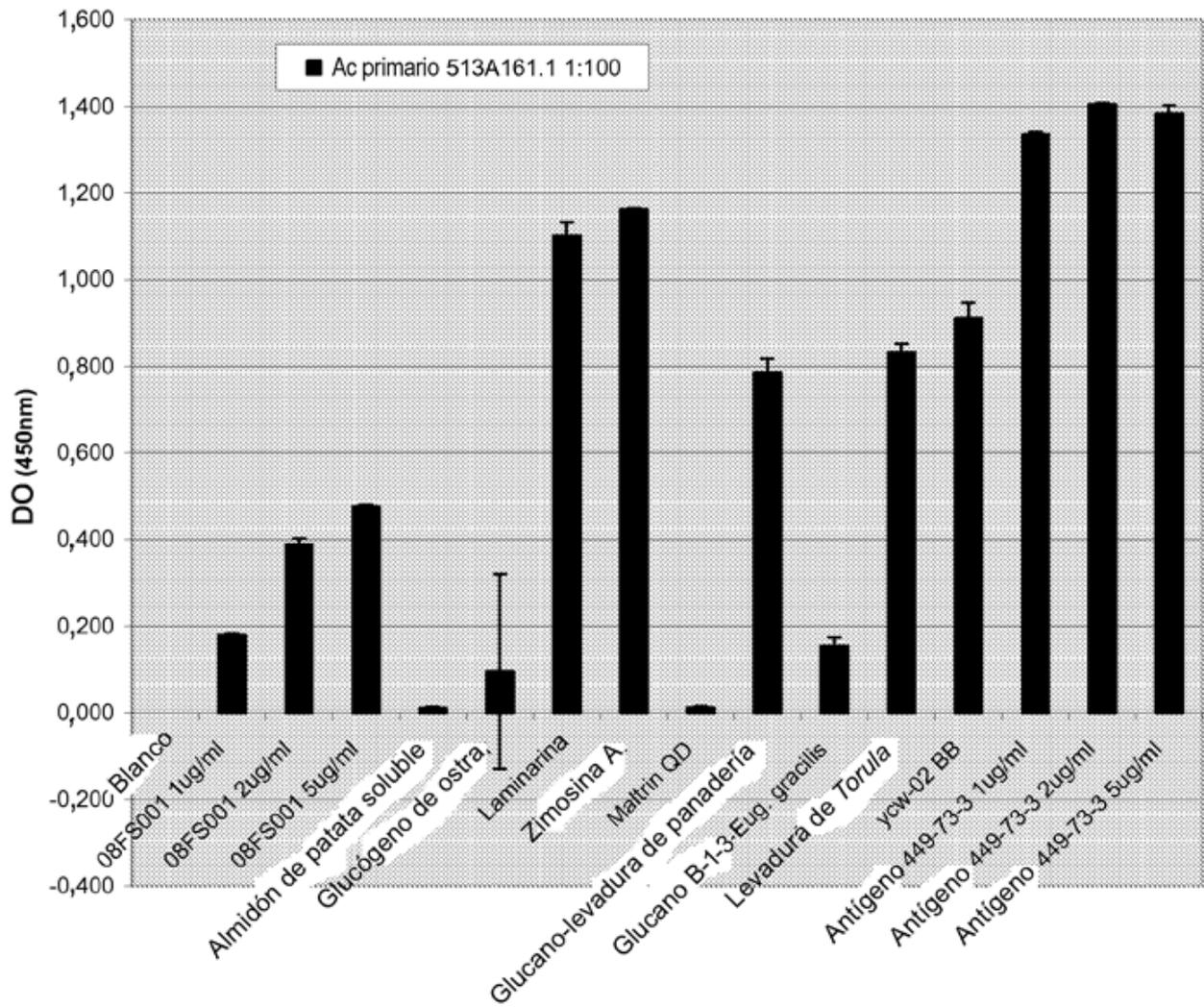
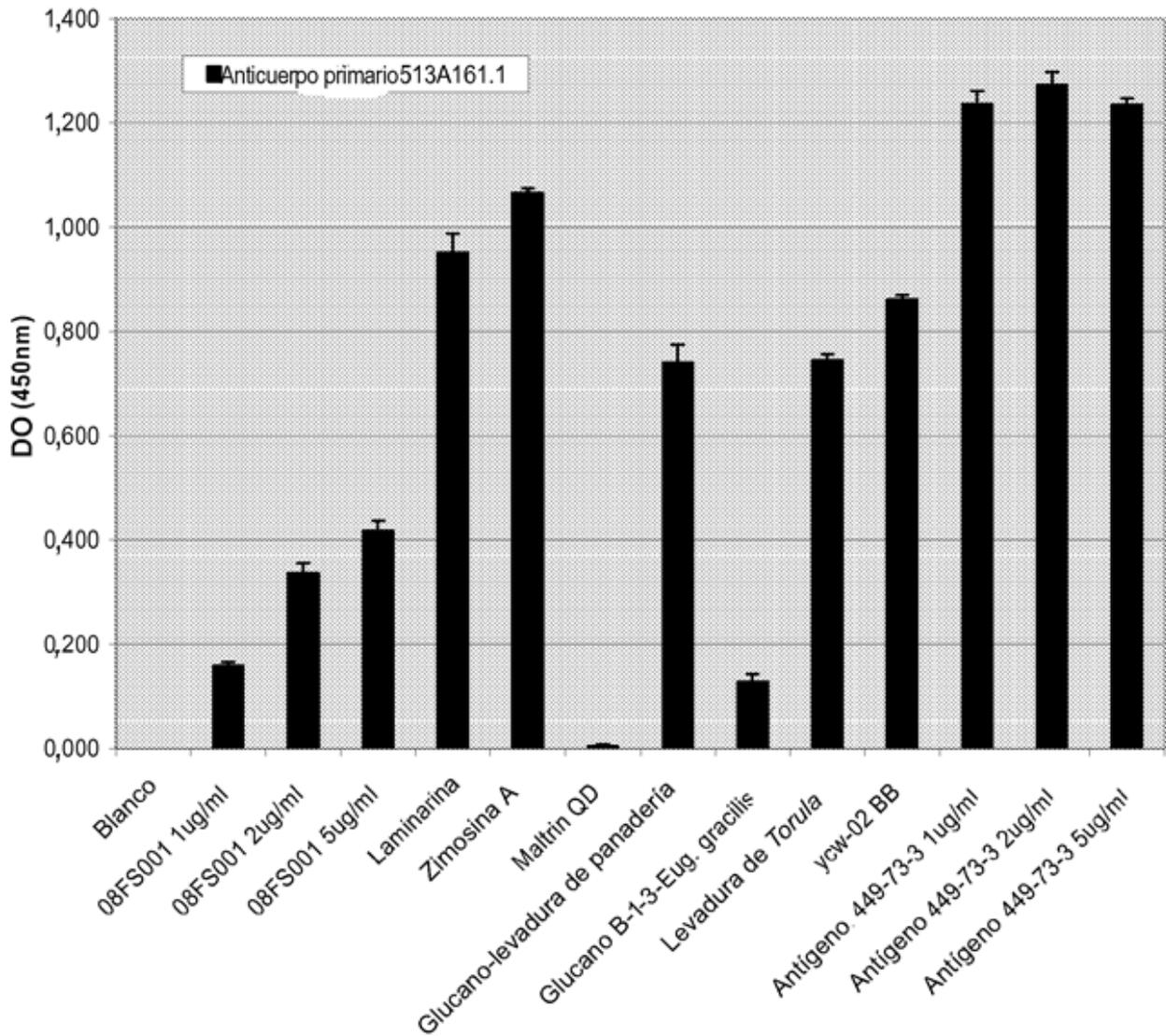


FIGURA 9



1:100

FIGURA 9 CONTINUACIÓN



1:200

FIGURA 10

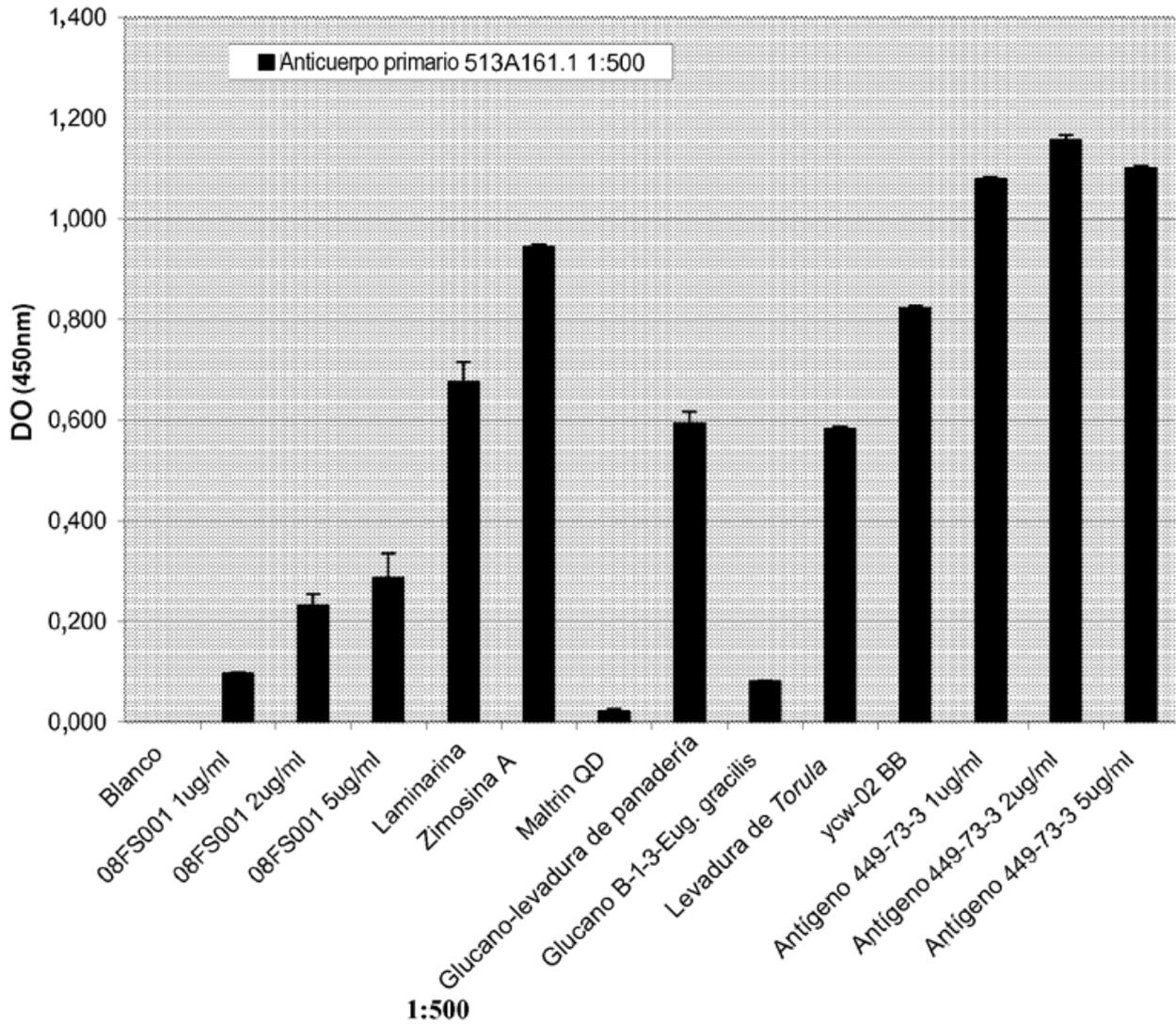


FIGURA 10 CONTINUACIÓN

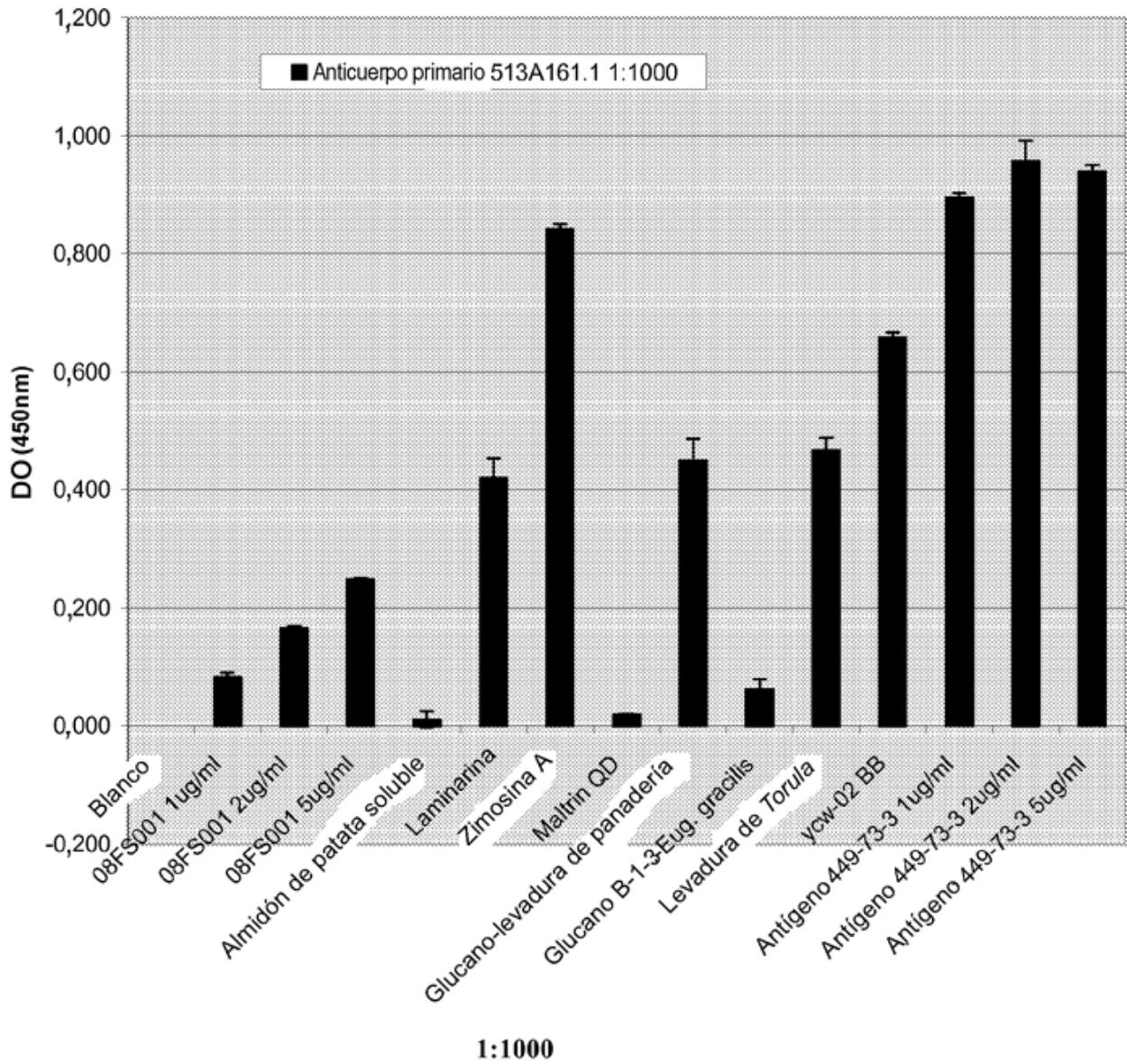
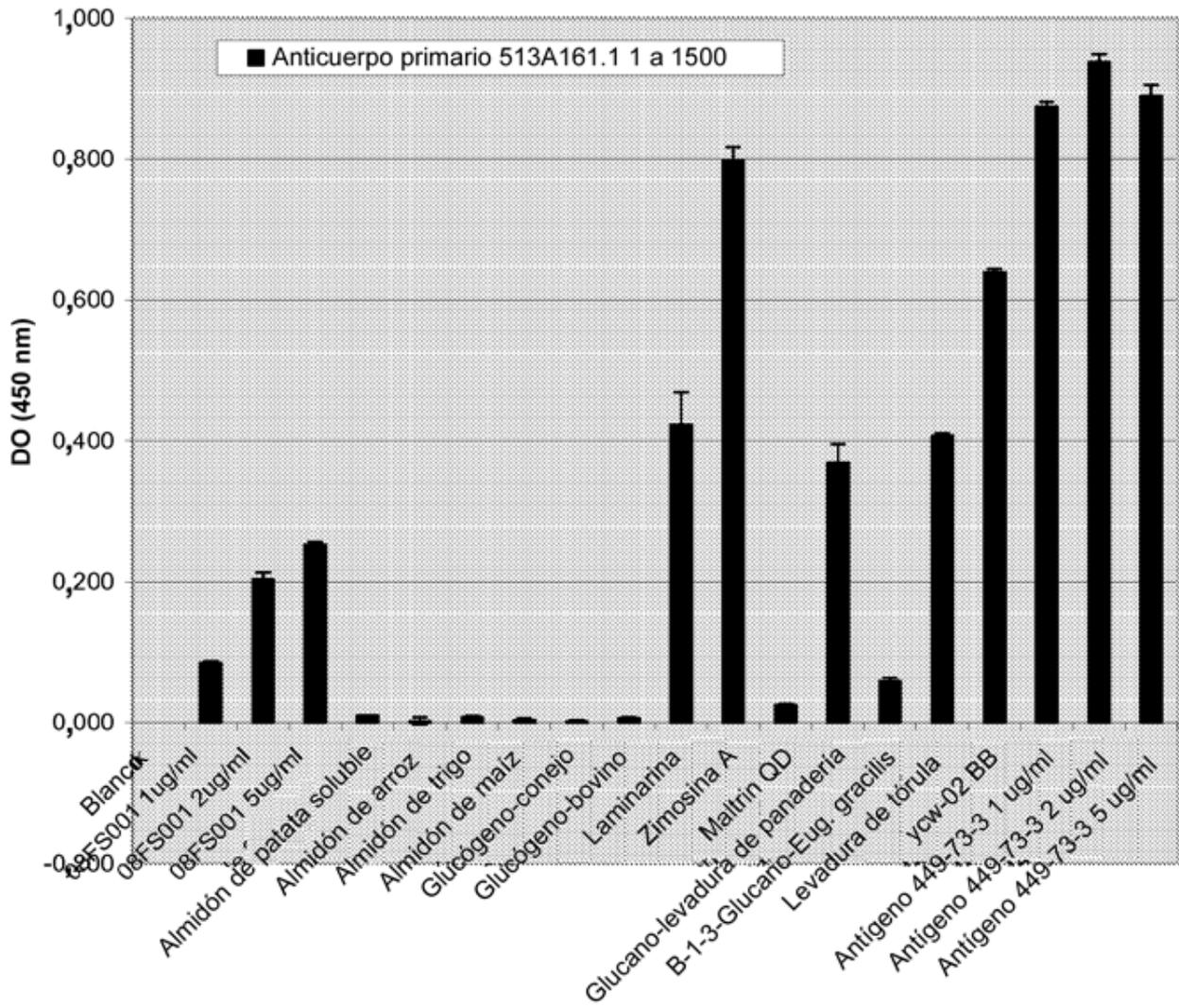


FIGURA 11



1:1500

FIGURA 11 CONTINUACIÓN

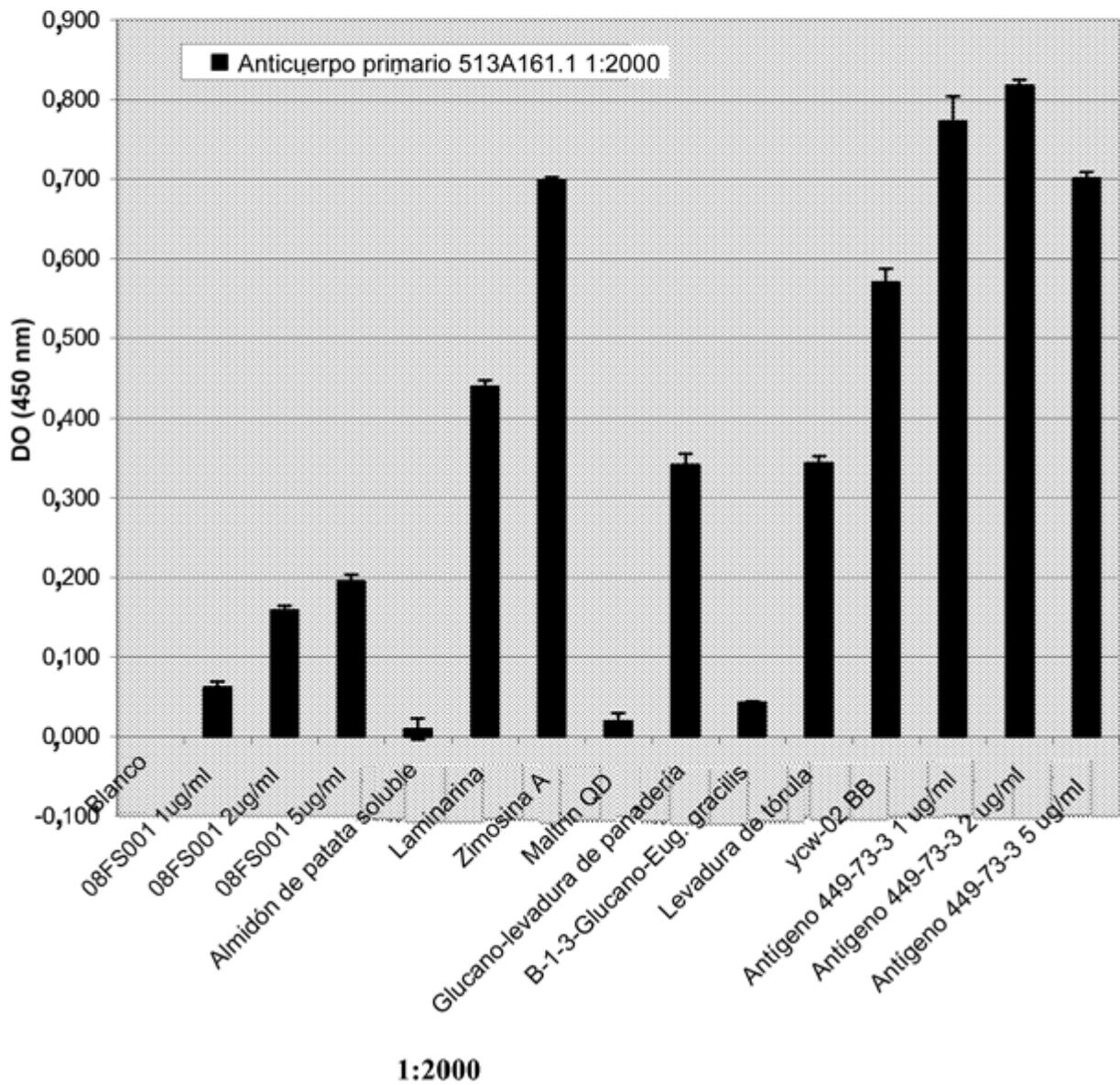


FIGURA 12

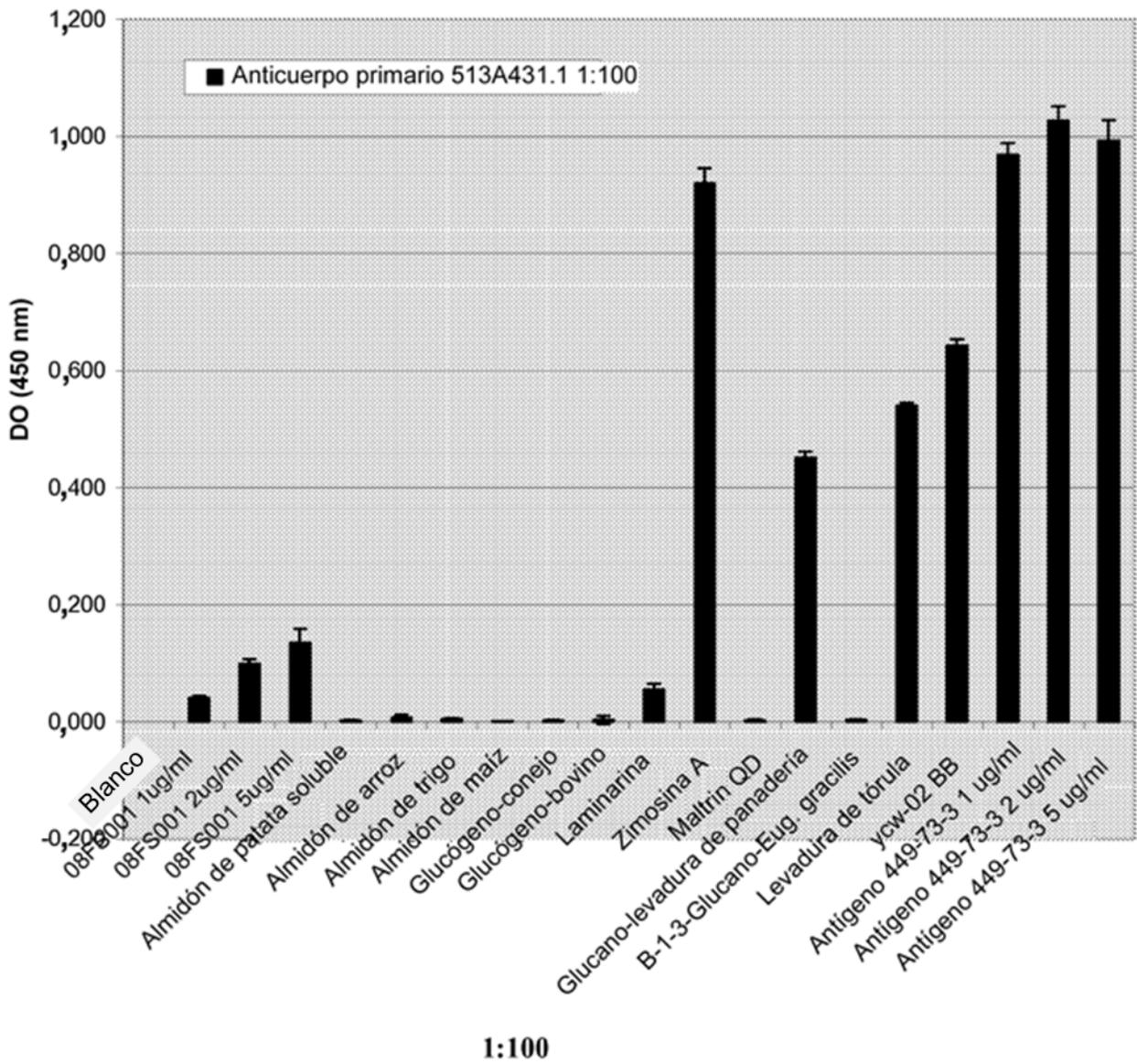


FIGURA 12 CONTINUACIÓN

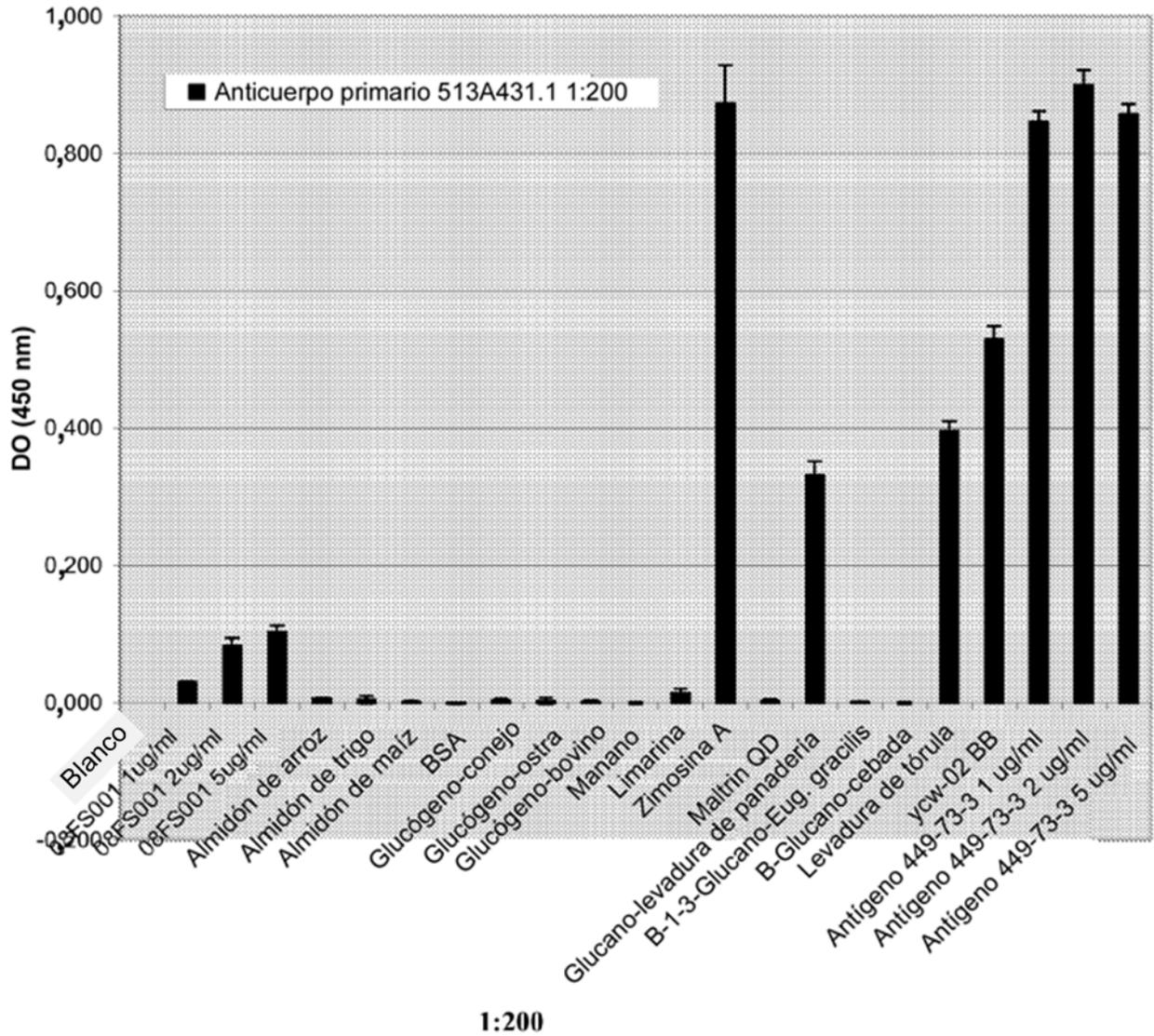


FIGURA 13

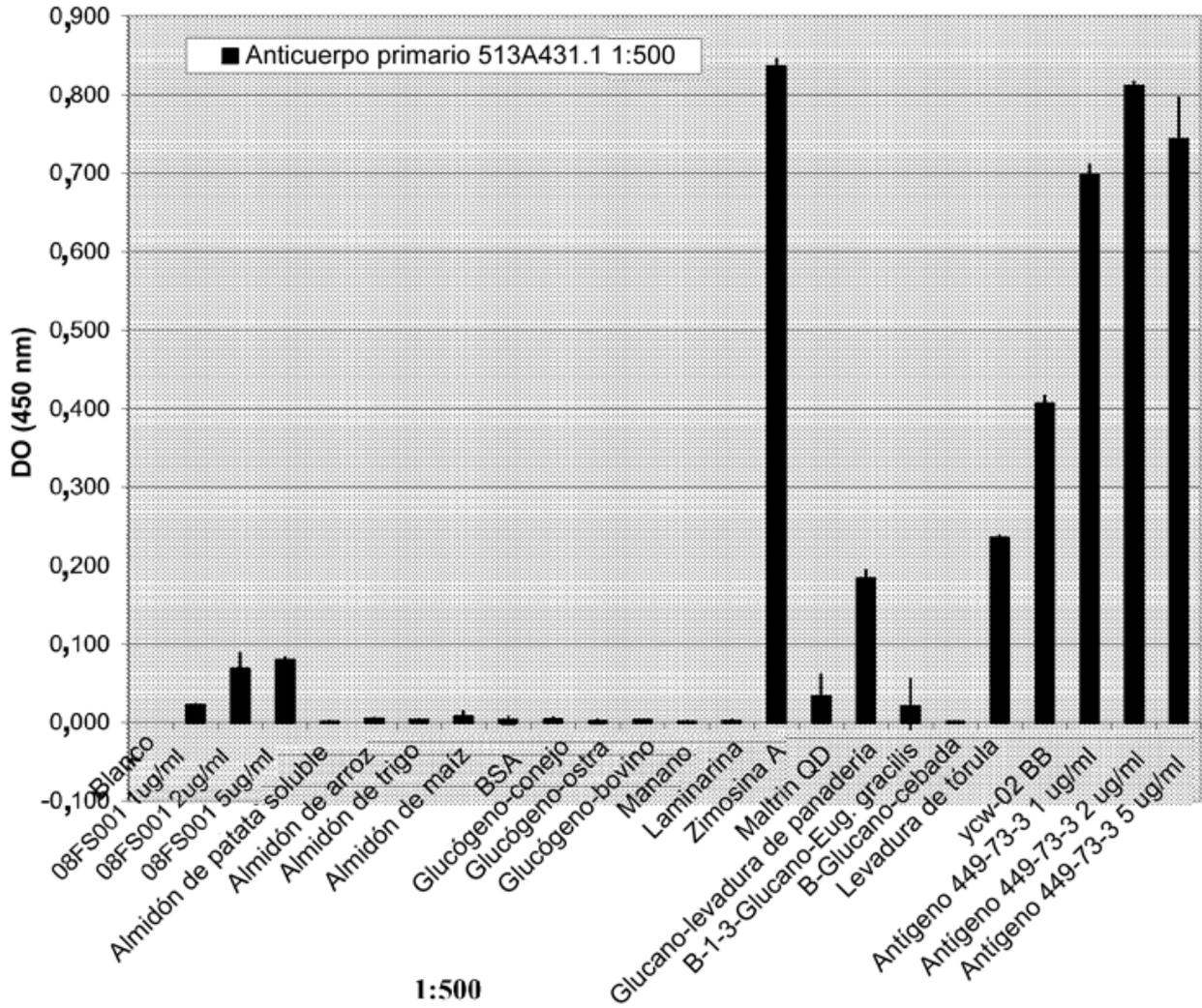


FIGURA 13 CONTINUACIÓN

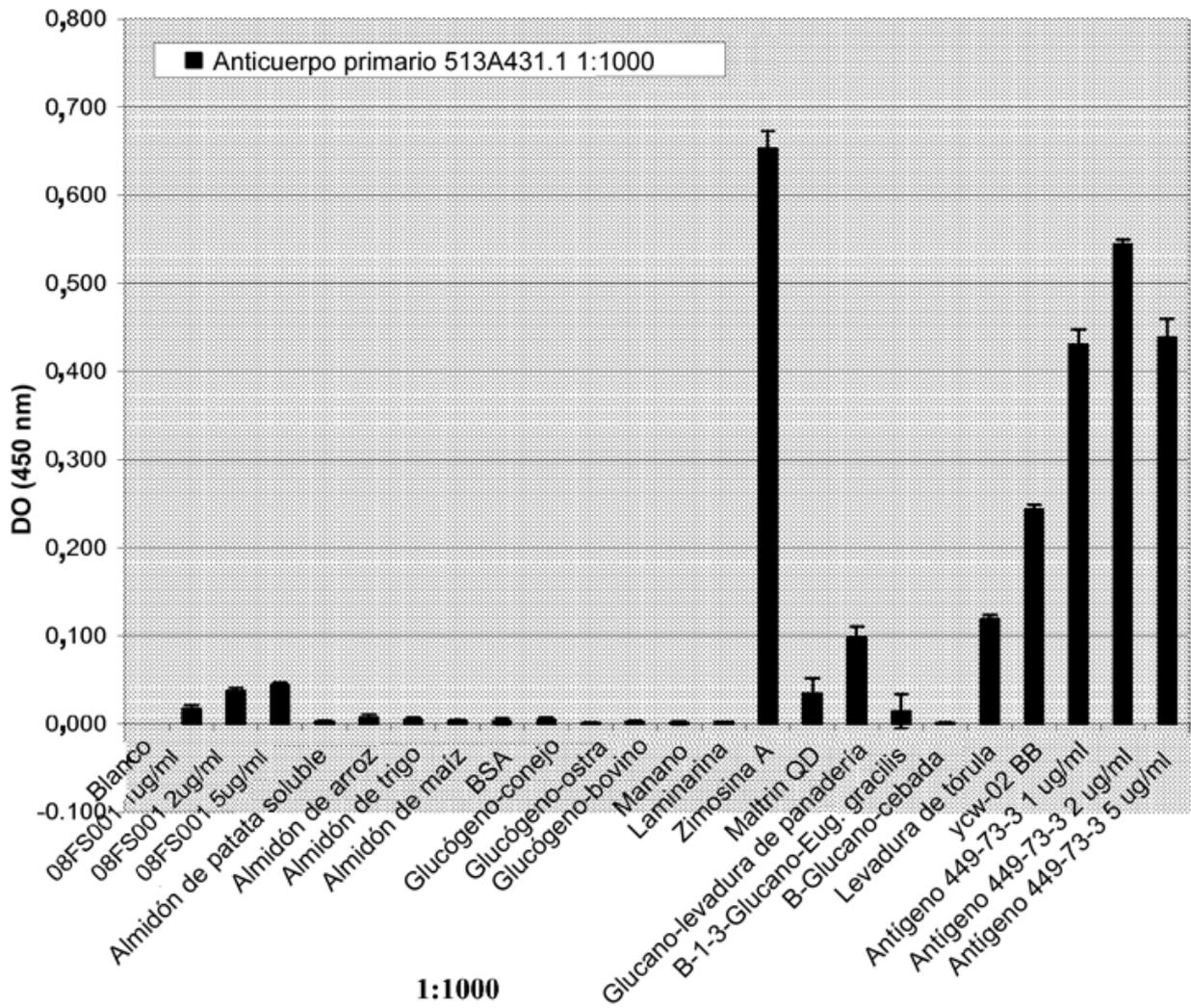


FIGURA 14

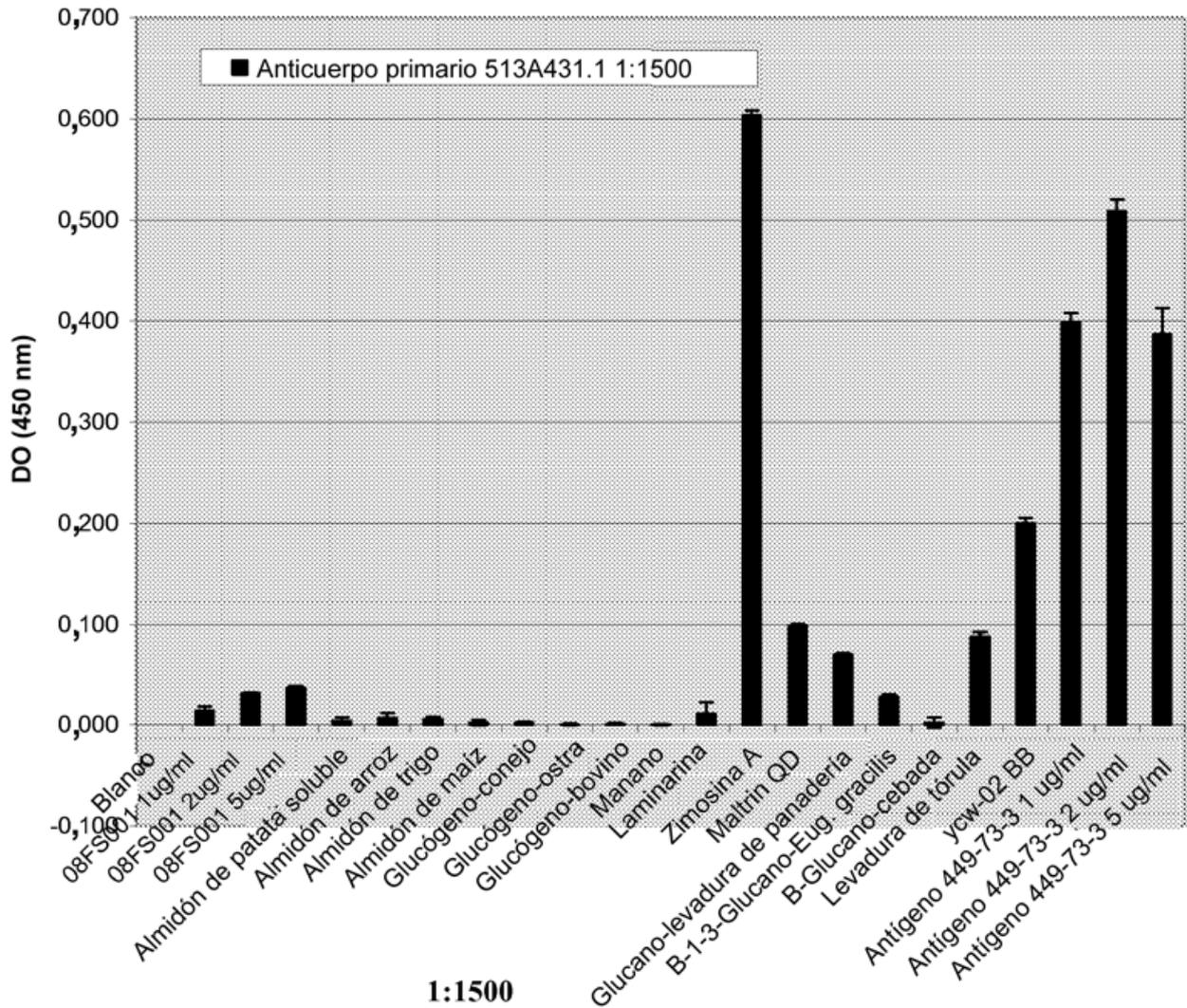


FIGURA 14 CONTINUACIÓN

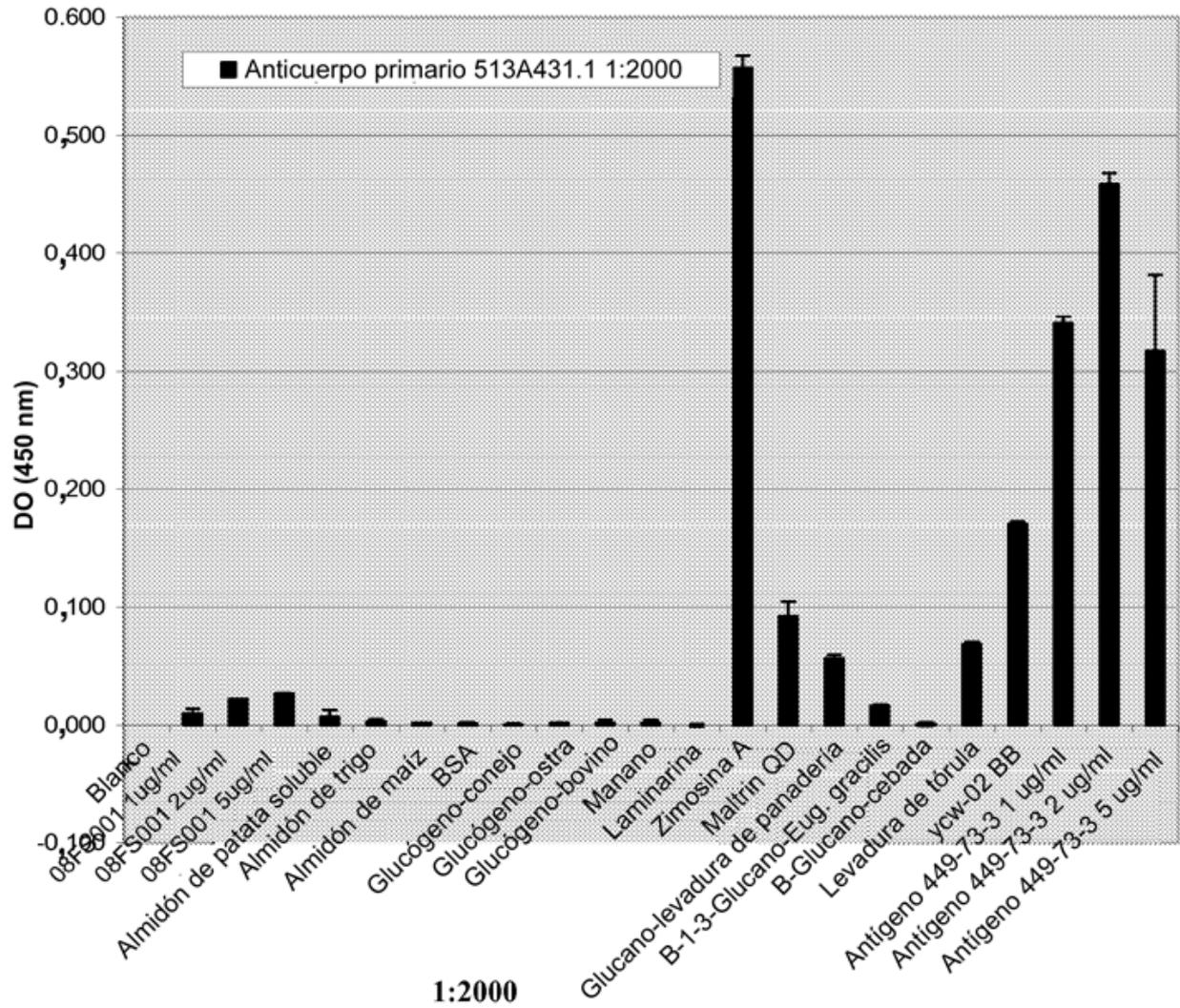


FIGURA 15

Selección de diluyente de anticuerpo y cambios de pH en disolución de extracción

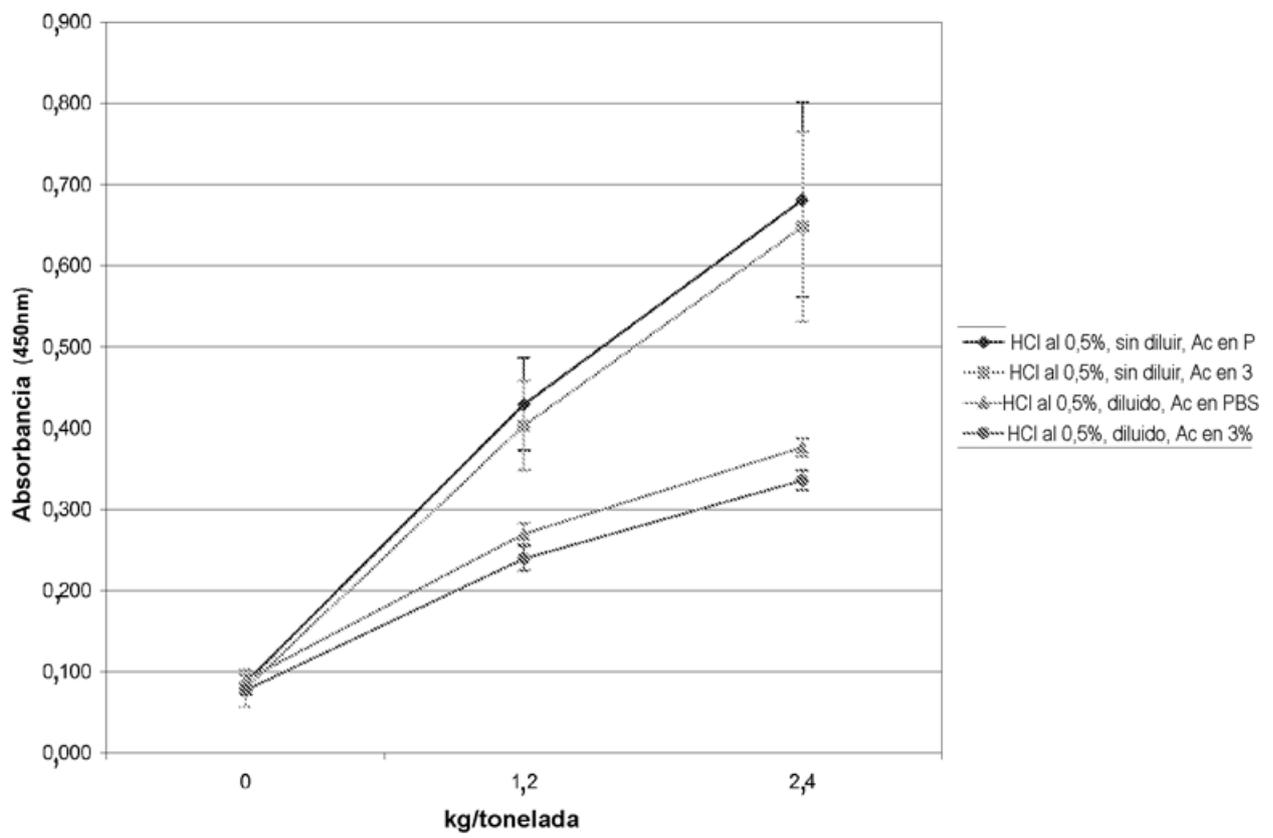


FIGURA 16

Optimización de incubación de temperatura y tiempo de recubrimiento

