

Diseños factoriales completos de experimentos para optimizar un ELISA que detecta anticuerpos anti-RBD del SARS-CoV-2 en leche materna

Full factorial designs of experiments to optimize an ELISA that detects SARS-CoV-2 anti-RBD antibodies in breast milk

Maylin Pérez-Bernal^{1*}, Carlos A. Hernández¹, Rafael Ibargollín¹, Midalis Martínez², Migdiala Soria², Magali Delgado¹, Enrique Pérez¹, José M. Sánchez-Ríos¹

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spíritus, Circunvalante Norte, Olivos 3, Sancti Spíritus, Cuba.

² Servicio de Neonatología, Hospital General "Camilo Cienfuegos", Bartolomé Masó 128, Sancti Spíritus, Cuba.

RESUMEN

En este trabajo se optimizó un ELISA, mediante la aplicación de diseños factoriales completos de experimentos, para detectar anticuerpos IgA anti-RBD del SARS-CoV-2 en leche materna de púerperas que recibieron durante el embarazo tres dosis de la vacuna anti-COVID-19 Abdala, basada en la plataforma de subunidades proteicas. A partir de un protocolo preliminar no optimizado, se evaluaron las interacciones entre los factores y niveles en el paso de recubrimiento de la placa con el antígeno RBD y en el paso de reacción del antígeno con los anticuerpos de la leche; se determinó además el factor dilución para aplicar el conjugado enzimático en el ensayo. Se estableció la combinación óptima de factores y niveles para conformar el protocolo optimizado del ELISA, con el que se logró incrementar 4,67 veces la relación señal/ruido del ensayo respecto al no optimizado. El nuevo protocolo garantizará la detección de anticuerpos IgA anti-RBD del SARS-CoV-2 en las muestras de leche materna con bajo contenido de estos anticuerpos y que probablemente tuvieran una señal de absorbancia cercana al blanco del ensayo si se aplicara el ELISA no optimizado.

Palabras clave: diseño experimental, eta-cuadrado parcial, tamaño del efecto, vacuna Abdala

ABSTRACT

In this work, an ELISA was optimized through the application of full factorial designs of experiments, to detect IgA anti-RBD antibodies to SARS-CoV-2 in breast milk of puerperal women who received, during pregnancy, three doses of the Abdala anti-COVID-19 vaccine, created on the protein subunit platform. Based on a preliminary non-optimized protocol, the interactions between the factors and levels, at the step of RBD antigen coating of the plate and in the reaction of the antigen with the breast milk antibodies, were evaluated; the dilution factor to apply the enzyme conjugate in the assay was also determined. The optimized ELISA protocol was established with the best combination of factors and levels, with which it was possible to increase the signal to noise ratio of the assay by 4.67 times compared to the non-optimized one. The new protocol will guarantee the detection of SARS-CoV-2 IgA anti-RBD antibodies in breast milk samples with a low content of these antibodies and that would probably

have an absorbance signal close to the assay blank if the non-optimized ELISA were applied.

Keywords: Abdala vaccine; effect size; experimental design; partial eta-square

INTRODUCCIÓN

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) es un método analítico de uso común basado en la unión específica antígeno-anticuerpo. Este ensayo ha sido de importancia trascendental en la medicina humana, para detectar tanto antígenos como anticuerpos, y ha tenido gran aplicación en el diagnóstico *in vitro* debido a su alta especificidad y sensibilidad (Peng *et al.*, 2022). El ELISA jugó un rol crucial en la reciente pandemia causada por el coronavirus SARS-CoV-2, tanto para el estudio de la respuesta inmune a la enfermedad COVID-19, como para la evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas que se generaron para proteger a las personas de la enfermedad grave y la muerte (Ashmawy *et al.*, 2022; Ramírez-Reveco *et al.*, 2023).

En la actualidad, los investigadores que trabajan en proyectos relacionados con este coronavirus tienen acceso a una amplia gama de kits ELISA listos para usar. Sin embargo, cuando un kit no está disponible para el objetivo específico de interés, los laboratorios deben desarrollar y optimizar su propio ELISA. Dado que es un inmunoensayo que consta de varios pasos, numerosos factores deben ser probados durante la optimización, como el tipo de placa, la concentración de antígeno o anticuerpo para el recubrimiento, la temperatura y el tiempo de incubación en cada paso, los tampones utilizados, entre otros (Minic y Zivkovic, 2020).

Estos experimentos de optimización requieren mucho tiempo y son difíciles de realizar si se aplica la estrategia tradicional de evaluar un factor a la vez, mientras los demás factores permanecen sin cambios (OFAT, One-Factor-At-a-Time, por sus siglas en inglés). Sin embargo, el Diseño de Experimentos (DOE, por sus siglas en inglés) es un método útil para identificar y optimizar los factores significativos y lograr resultados adecuados utilizando la mínima cantidad posible de ensayos experimentales (Ahmed *et al.*, 2022). Es un enfoque sistemático y basado en estadísticas donde se evalúan diferentes factores simultáneamente (Ray *et al.*, 2009; Tsoi *et al.*, 2014; Augustine *et al.*, 2015; Rodríguez

*Autor para correspondencia: Maylin Pérez Bernal
 Correo-e: maylin.perez@cigb.edu.cu

Recibido: 30 de marzo de 2023

Aceptado: 5 de junio de 2023

Publicado: 21 de septiembre de 2023

et al., 2022). La efectividad de este diseño radica en que, a diferencia de la práctica estándar de variar solo un factor a la vez, tanto los efectos principales de cada factor como las interacciones entre ellos pueden ser interpretados realizando menos experimentos en menos tiempo que el que requeriría el OFAT (Papaneophytou, 2019).

Por lo general, el método DOE se puede dividir en diseño factorial completo y diseño factorial fraccionado, conocido también como Diseño Experimental de Taguchi. Este último solo utiliza un subconjunto seleccionado de los niveles, considerando que algunas interacciones no son tan significativas como los efectos principales, pero esto puede llevar a que los resultados sean únicamente relativos y no identifiquen exactamente qué nivel tiene el mayor efecto (Arias-Nava *et al.*, 2015). En cambio, en el DOE factorial completo se prueban todas las combinaciones de los factores y niveles y todas sus interacciones, lo que conduce a una interpretación más completa de los resultados. Como se incluyen todas las combinaciones posibles, proveen un número elevado de grados de libertad para el error experimental, con la consiguiente ventaja que esto representa (Tsoi, 2014; Kechagias *et al.*, 2020). Pero, a pesar de sus ventajas y resultados confiables, el DOE factorial completo se ha utilizado con poca frecuencia para optimizar los inmunoensayos. Es una deficiencia que fue planteada por Ray y colaboradores en el 2009, y que persiste hasta la actualidad.

El objetivo de este trabajo fue optimizar un ELISA indirecto para detectar anticuerpos anti-RBD (RBD: sitio de unión al receptor de la proteína espícula del SARS-CoV-2), de isotipo IgA, en muestras de leche materna de puérperas que recibieron, durante el embarazo, tres dosis de la vacuna anti-COVID-19 Abdala, basada en la plataforma de subunidades proteicas. Como son muy escasas las publicaciones científicas que han descrito los niveles de anticuerpos que genera este tipo de vacuna en leche materna, y que podrían conferir inmunidad pasiva contra la COVID-19 a la población vulnerable de neonatos y lactantes, es imprescindible contar con un ensayo eficaz que detecte estos anticuerpos. Por esta razón, la optimización se realizó aplicando DOEs factoriales completos en varias etapas del ELISA. Se evaluaron las interacciones entre los factores y niveles en cada etapa para determinar, en el menor tiempo posible, la mejor combinación de estos para conformar el protocolo optimizado del ELISA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Las muestras de leche materna se colectaron de 103 puérperas vacunadas durante el embarazo con tres dosis de la vacuna anti-COVID-19 Abdala. Se obtuvo por escrito el consentimiento informado de todas las participantes antes de colectar la leche materna. Las muestras se obtuvieron en el Servicio de Neonatología del Hospital General "Camilo Cienfuegos", Sancti Spiritus, Cuba, entre septiembre y noviembre de 2021. La colecta se realizó mediante extracción manual directamente a un recipiente estéril, descartando las prime-

ras 4 - 5 gotas. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su análisis. Como controles negativos se utilizaron muestras de leche materna de puérperas no vacunadas y que refirieron no haberse infectado con COVID-19.

Para recubrir las placas ELISA se utilizó como antígeno la RBD recombinante del SARS-CoV-2, suministrada por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba, con una pureza mayor al 98 %. La secuencia de esta RBD fue igual a la de la cepa SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (NCBI Acc. No.YP_009724390) (Limonta-Fernández *et al.*, 2022).

Optimización del ELISA

Se utilizaron dos mezclas de las muestras de leche materna, de quince puérperas cada una, identificadas con bajo (BAC) y alto (AAC) contenido de anticuerpos IgA anti-RBD del SARS-CoV-2, de acuerdo a los valores de la señal de absorbancia (A 492 nm) obtenidos con un ELISA preliminar no optimizado. Para hacer la mezcla BAC se seleccionaron muestras con $A_{492\text{ nm}} \leq 0.300$; las muestras que conformaron la mezcla AAC tenían valores de $A_{492\text{ nm}} \geq 1.500$.

El ELISA preliminar (no optimizado) se realizó de la siguiente forma: se utilizaron placas multipocillos de alta unión (Costar® 3590, Estados Unidos) que fueron recubiertas con 100 μL /pocillo de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RBD diluida en tampón carbonato-bicarbonato (ThermoFisher, Alemania) 100 mM (pH 9.6) y se colocó 3 h en una incubadora a 37°C (RETOMED, Cuba). A continuación, las placas pasaron por un lavador MW-2001 PROWASH (Tecnosuma Internacional, Cuba), donde se aplicaron tres lavados con 380 μL /pocillo de solución salina tamponada con fosfato (PBS; pH 7.4) con 0.05 % de Tween 20 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Este tampón se utilizó para los pasos de lavado de todos los ELISAs realizados en este trabajo. Luego, los pocillos se bloquearon con 380 μL de la solución de PBS con albúmina de suero bovino (BSA, Applichem, Alemania) al 3 % (p/v) durante 1 h a 37°C . Después de un lavado se agregaron 100 μL /pocillo de las mezclas de leche materna, diluidas 1:100 en tampón de dilución, que consistió en PBS con BSA al 2 % (p/v). Los ensayos fueron realizados por triplicado. La placa se incubó 2 h a temperatura ambiente (TA) y al cabo de ese tiempo se lavó tres veces. Se aplicaron 100 μL /pocillo del conjugado anti-IgA humana CBSSIgAH-HRP (CIGB, Sancti Spiritus, Cuba) diluido 1:8000 con tampón de dilución y se dejó la placa 1 h a 37°C . Después de tres lavados, la placa se incubó en la oscuridad con 100 μL /pocillo de ortofenilendiamina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) (0.5 mg/mL) disuelta en ácido cítrico (Merck, Alemania) 0.0243 M, hidrógeno fosfato disódico (Merck, Alemania) 0.0514 M y peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) al 0.015 % (p/v), durante 20 min a TA. La reacción colorimétrica fue interrumpida agregando 100 μL /pocillo de ácido sulfúrico (EMSURE, Estados Unidos) 2 M y se midió la A492nm en un lector de placas (Labsystems Multiskan Plus, Estados Unidos).

A partir de este protocolo inicial se realizó la optimización de varios pasos del ELISA mediante experimentos factoriales completos, que serán descritos a seguidas.

Recubrimiento de la placa ELISA

En esta primera etapa del ELISA se utilizó un diseño factorial completo 3x2x2x2, donde se probaron los siguientes factores y niveles: concentración del antígeno de recubrimiento, RBD: 3.0; 5.0 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; tampón de recubrimiento: carbonato-bicarbonato (50 mM; pH 9,6) y PBS (pH 7,4); temperatura de incubación: TA y 37 °C; tiempo de incubación: 2 h y 3 h; tipo de placas multipocillos de alta unión: Costar® 3590 y Nunc MaxiSorp® (Estados Unidos).

El diseño utilizado para las placas, teniendo en cuenta estos factores y niveles, fue el siguiente: se recubrieron cuatro placas de cada tipo, una para cada combinación de tiempo/temperatura: 2 h/TA; 3 h/TA; 2 h/37 °C; 3 h/37 °C. La mitad de cada placa se recubrió usando PBS y la otra mitad usando tampón carbonato-bicarbonato. En ambas mitades se colocaron dos columnas por cada concentración de RBD. Se prepararon tres réplicas de las mezclas de leche materna y se añadieron a las placas por duplicado para cada tratamiento ensayado. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces, y luego continuaron los pasos sucesivos según el ELISA preliminar.

Paso de unión del antígeno RBD a los anticuerpos IgA específicos de las mezclas de leche materna

Para esta evaluación se aplicaron las condiciones óptimas obtenidas para el recubrimiento. En esta etapa se usó un diseño factorial completo 3x2x2, con los siguientes factores y niveles: concentración de BSA en el tampón de dilución: 1 %, 2 % y 3 %; temperatura de incubación: TA y 37 °C; tiempo de incubación: 1 h y 2 h. Las dos mezclas de leche materna fueron diluidas 1:100 con tampón de dilución, consistente en PBS con BSA a la concentración evaluada en cada tratamiento.

Atendiendo a estos factores y niveles, se preparó la siguiente distribución en las placas: se utilizaron cuatro placas, una para cada combinación de tiempo-temperatura: 1h/TA; 2h/TA; 1h/37 °C; 2h/37 °C. Las placas se dividieron en tres secciones, una para cada concentración de BSA. Se prepararon seis réplicas de las mezclas de leche materna y se añadieron por duplicado por cada tratamiento evaluado. Transcurrido el tiempo de incubación, las placas se lavaron tres veces y el ELISA continuó según el protocolo preliminar.

Determinación de la dilución del conjugado CBSIgAH-HRP

En esta evaluación se aplicaron las condiciones óptimas definidas en las dos etapas anteriores y se utilizó solamente la mezcla de leche materna AAC IgA anti-RBD. Para diluir el conjugado se usó el tampón de dilución con el porcentaje de BSA de mejores resultados en el paso anterior. Se ensayaron ocho diluciones seriadas 1:2 (1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000, 1:64000, 1:128000) a razón de 100 μL / pocillo. Se colocaron tres repeticiones de cada dilución en la placa, y se incubó 1 h a 37 °C. Pasado ese tiempo se lavó tres veces. Las condiciones para la reacción enzima-sustrato y para detener esta reacción se mantuvieron iguales a las del ELISA preliminar.

Análisis estadístico

El procesamiento de los datos se realizó con el Paquete Estadístico para Ciencias Sociales, versión 21.0 (SPSS, por sus siglas en inglés). La variable de respuesta utilizada para la optimización del ELISA, con las mezclas de leche materna AAC y BAC IgA anti-RBD, fue la relación señal/ruido (S/R), que es el cociente entre la señal A 492 nm de las mezclas, corregida con el blanco del ensayo, y la señal del blanco. La solución de PBS con la correspondiente concentración (%) de BSA se utilizó como blanco en los ensayos. Las medias de S/R se obtuvieron de la salida del programa SPSS. La mejor combinación de factores para cada paso del ELISA se definió como aquella con el mayor valor de la media de S/R.

Un ANOVA factorial completo se aplicó para evaluar la significancia estadística ($p \leq 0.05$) de los efectos principales de cada factor y de la interacción entre los factores. Los tamaños del efecto se determinaron utilizando el estadístico Eta-cuadrado parcial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde el inicio del estudio, con la aplicación del ELISA preliminar no optimizado para identificar las muestras de leche materna AAC y BAC anti-RBD, se comprobó que los controles negativos, que fueron las muestras colectadas de puérperas no vacunadas con Abdala y que refirieron no haberse enfermado de COVID-19, dieron lecturas de A 492 nm similares al blanco del ensayo. Lo que confirmó que eran muestras negativas y que no existieron señales inespecíficas que podrían dar lugar a falsos positivos. Estos controles se mantuvieron en todas las placas ELISA a lo largo del proceso de optimización y se observó siempre la misma señal de A 492 nm cercana al blanco.

La figura 1 muestra el tamaño del efecto de las 26 interacciones entre los cinco factores evaluados en la etapa de recubrimiento, tanto para la mezcla BAC como para la AAC. Solo tres de estas interacciones, las de menor tamaño de efecto, fueron no significativas para ambas mezclas y los valores de p de cada una se indican en la figura 1. La interacción de segundo orden entre tampón de recubrimiento–concentración del antígeno de recubrimiento–tipo de placa fue la más importante, con el mayor valor de Eta-cuadrado parcial, que fue coincidentemente 0.996 en BAC y AAC.

Las interacciones temperatura–tipo de placa, tampón de recubrimiento–temperatura–tipo de placa y concentración del antígeno de recubrimiento–temperatura–tipo de placa, fueron las que siguieron en orden descendente de magnitud del tamaño del efecto, tanto para bajo como alto contenido de anticuerpos. Los valores de Eta-cuadrado parcial se mantuvieron muy altos, por encima de 0.90 en estas tres interacciones; en la última de ellas fueron de 0.934 para BAC (Figura 1A) y 0.958 para AAC (Figura 1B).

Recientemente Hernández *et al.* (2023) optimizaron un ELISA sándwich cuantitativo mediante un diseño factorial completo similar al que se presenta en este trabajo. Es el único que se ha publicado hasta la fecha con un diseño que concibe la optimización paso a paso para incorporar suce-

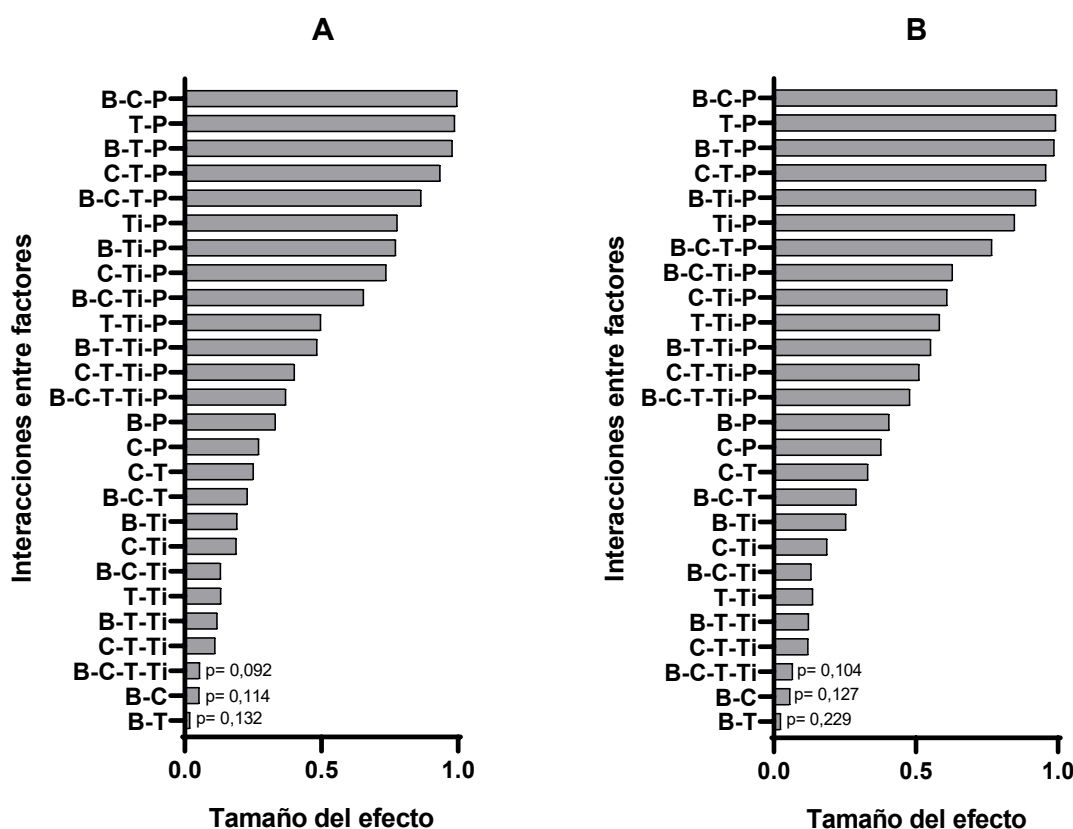


Figura 1. Tamaños del efecto de las interacciones entre los factores evaluados en el recubrimiento de la placa ELISA. C: concentración del antígeno de recubrimiento, RBD; B: tampón de recubrimiento; T: temperatura de incubación; Ti: tiempo de incubación; P: tipo de placa. (A) Mezcla de leche materna con bajo contenido de anticuerpos IgA anti-RBD (B) Mezcla de leche materna con alto contenido de anticuerpos IgA anti-RBD. La variable de respuesta fue la relación señal/ruido, que es el cociente entre la señal A492nm de las mezclas de leche corregida con el blanco y la señal del blanco. El tamaño del efecto de las interacciones factoriales se midió según el Eta-cuadrado parcial de un ANOVA factorial completo 3x2x2x2x2. La significancia estadística se fijó en 0.05.

Figure 1. Effect sizes of the interactions between the factors evaluated in the coating of the ELISA plate. C: coating antigen concentration, RBD; B: coating buffer; T: incubation temperature; Ti: incubation time; Q: plate type. (A) Mixture of breast milk with low IgA anti-RBD antibodies content (B) Mixture of breast milk with high IgA anti-RBD antibodies content. The response variable was the signal to noise ratio, which is the ratio between the A492nm signal of the blank-corrected milk mixtures and the blank signal. The effect size of factorial interactions was measured by partial Eta-square of a 3x2x2x2x2 full factorial ANOVA. Statistical significance was set at 0.05.

sivamente al protocolo la mejor combinación de factores y niveles como se ha hecho en nuestro estudio. Estos autores afirmaron que las interacciones más importantes en el paso de recubrimiento se establecieron entre tampón–concentración de recubrimiento, concentración de recubrimiento–tipo de placa y concentración de recubrimiento–temperatura. Los valores de Eta-cuadrado parcial de estas interacciones estaban en el rango de 0.50 a 0.87 y de 0.61 a 0.92 para bajas y altas concentraciones de antígeno, respectivamente.

El Eta-cuadrado parcial es una forma de medir el tamaño del efecto de diferentes factores en modelos ANOVA y su valor siempre está comprendido entre 0 y 1 (Ben-Shachar *et al.*, 2020). Se considera que un Eta-cuadrado parcial superior a 0.14 significa un efecto grande (Cohen, 1988). En la mayoría de las interacciones evaluadas en nuestro trabajo, el tamaño del efecto estuvo por encima de ese valor (Figura 1). Los valores cercanos a 1 indican que hay gran relación entre los factores (Ben-Shachar *et al.*, 2020), por lo que en las cuatro

primeras interacciones con mayor tamaño de efecto existe una estrecha relación entre los factores que las integran. A diferencia del trabajo de Hernández *et al.* (2023), donde la concentración de recubrimiento fue el factor que estuvo presente en las interacciones más importantes en ese paso del ELISA, en nuestro estudio fue el tipo de placa el factor que se mantuvo en las quince primeras interacciones con mayor tamaño del efecto. Esto significa que, para este ELISA, es preciso garantizar la disponibilidad del tipo de placa con mejores resultados para asegurar un paso de recubrimiento óptimo.

En la Tabla 1 se presentan los valores de S/R para todas las combinaciones de factores y niveles que fueron ensayados en esta etapa. Con estos datos fue posible definir la mejor combinación a aplicar para muestras con AAC y BAC anti-RBD: usar la placa Costar 3590, el antígeno de recubrimiento a 10 µg/mL disuelto en tampón carbonato/bicarbonato (50 mM; pH 9.6) y hacer la incubación durante 2 h a 37 °C. Con estas

Tabla 1. Relaciones señal/ruido calculadas para las mezclas de leche materna con bajo y alto contenido de anticuerpos IgA anti-RBD del SARS-CoV-2, aplicando un diseño factorial completo 3x2x2x2 en la etapa de recubrimiento de la placa ELISA.

Table 1. Signal to noise ratios calculated for breast milk mixtures with low and high content of SARS-CoV-2 IgA anti-RBD antibodies, applying a 3x2x2x2 full factorial design in the ELISA plate coating step.

Mezcla de bajo contenido de anticuerpos IgA anti-RBD del SARS-CoV-2							
Placa	Tiempo/ Temperatura	Carbonato/Bicarbonato			PBS		
		RBD 3 µg/mL	RBD 5 µg/mL	RBD 10 µg/mL	RBD 3 µg/mL	RBD 5 µg/mL	RBD 10 µg/mL
Costar	2 h/TA	1.84	2.31	5.64	1.30	2.21	3.19
	3 h/TA	1.85	2.76	5.69	1.57	3.54	4.28
	2 h/37 °C	2.30	4.95	9.96	4.00	5.36	7.73
	3 h/37 °C	2.29	2.89	5.87	1.49	2.26	4.30
Nunc	2 h/TA	1.73	2.76	3.68	1.21	2.11	3.25
	3 h/TA	2.11	3.14	5.82	1.71	2.24	4.19
	2 h/37 °C	1.98	3.20	4.13	2.32	2.79	3.47
	3 h/37 °C	2.14	3.35	5.97	1.59	2.25	4.16

Mezcla de alto contenido de anticuerpos IgA anti-RBD del SARS-CoV-2							
Placa	Tiempo/ Temperatura	Carbonato/Bicarbonato			PBS		
		RBD 3 µg/mL	RBD 5 µg/mL	RBD 10 µg/mL	RBD 3 µg/mL	RBD 5 µg/mL	RBD 10 µg/mL
Costar	2 h/TA	5.40	6.15	12.93	4.33	7.97	11.58
	3 h/TA	5.70	9.70	20.73	4.58	14.46	21.25
	2 h/37 °C	5.87	9.50	30.07	8.62	15.07	22.26
	3 h/37 °C	5.41	7.80	20.80	4.58	14.60	21.21
Nunc	2 h/TA	4.36	7.07	10.23	4.29	6.22	10.62
	3 h/TA	9.36	11.48	10.27	5.71	8.27	11.22
	2 h/37 °C	6.47	9.86	10.55	7.41	8.94	11.38
	3 h/37 °C	5.02	7.77	11.68	5.37	12.34	14.92

condiciones se lograron los valores más altos de S/R: 9.96 para BAC y 30,07 para AAC. La tabla 1 también muestra que con las condiciones de recubrimiento del ELISA preliminar se obtuvo una S/R = 2.89 para BAC y S/R = 7.80 para AAC. O sea, que después de la optimización mediante el DOE factorial completo, el valor de S/R se incrementó 3.45 veces para BAC y casi 4 veces para AAC. El tipo de placa y el tampón con mejores resultados coincidieron con los utilizados en el protocolo preliminar, pero en los otros tres factores evaluados los niveles óptimos fueron diferentes. Por tanto, la evaluación simultánea de múltiples factores y niveles, con el DOE aplicado, fue válida para detectar en el menor tiempo posible cuáles debían cambiarse y cuáles no en esta primera etapa del ELISA.

La optimización del paso de unión del antígeno RBD a los anticuerpos IgA específicos de las mezclas de leche materna ya tuvo incorporadas las mejores condiciones determinadas previamente para el recubrimiento. Se comprobó que tanto el tamaño del efecto de cada factor individual como de sus interacciones fueron significativos, excepto la interacción entre el tiempo y la temperatura, con $p = 0.196$ para BAC y $p = 0.158$ para AAC (Figura 2). El factor con el valor más alto

de Eta-cuadrado parcial fue la concentración de BSA en el tampón de dilución, y todas las interacciones donde se involucró este factor con los demás factores evaluados fueron las de mayor tamaño de efecto. El comportamiento fue el mismo para las dos mezclas de leche materna evaluadas en el trabajo. Estos resultados coinciden con los de Hernández *et al.* (2023), que también encontraron como un factor clave la concentración de agente bloqueador usado en el tampón de dilución, la leche descremada en ese caso, en interacción con otros factores.

El hallazgo de que la concentración de BSA en el tampón de dilución fue el factor con mayor tamaño de efecto, se corresponde directamente con los resultados expuestos la Tabla 2. Cuando se usó 1 % de BSA los valores de la relación S/R fueron los más altos, independientemente de cuáles eran la temperatura o el tiempo de incubación utilizados. Ya se había comprobado que no fue significativa la interacción entre estos dos factores (Figura 2). Nótese que la S/R máxima, tanto para la mezcla BAC como para la AAC, se logró con 1 % de BSA en el tampón de dilución e incubando la placa durante 1h a 37 °C (Tabla 2). En estas condiciones se duplicó el valor de S/R respecto al ELISA preliminar, por tanto, esa fue

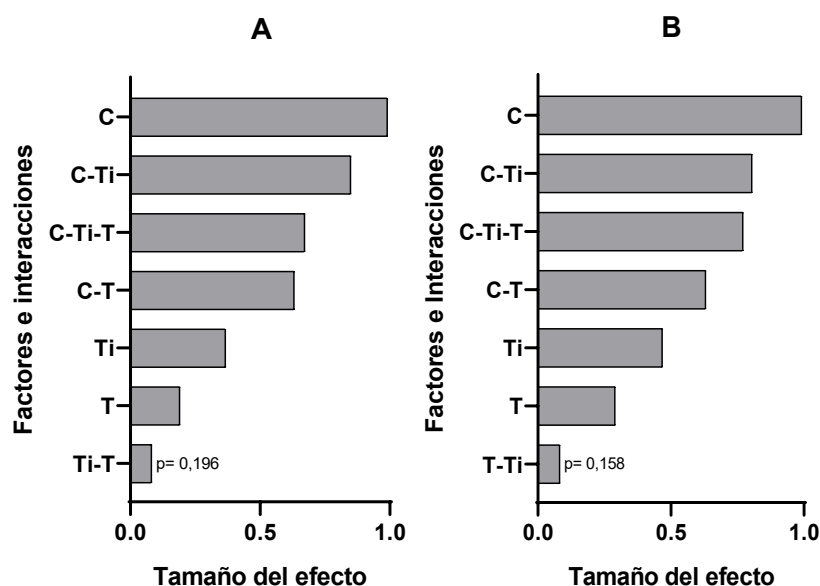


Figura 2. Tamaños del efecto de los factores y sus interacciones en el paso de unión del antígeno RBD a los anticuerpos IgA anti-RBD de las mezclas de leche materna. C: Concentración de albúmina de suero bovino en el tampón de dilución; T: temperatura de incubación; Ti: tiempo de incubación. (A) Mezcla de leche materna con bajo contenido de anticuerpos IgA anti-RBD (B) Mezcla de leche materna con alto contenido de anticuerpos IgA anti-RBD. La variable de respuesta fue la relación señal/ruido, que es el cociente entre la señal A492nm de las mezclas de leche corregida con el blanco y la señal del blanco. El tamaño del efecto de las interacciones factoriales se midió según el Eta-cuadrado parcial de un ANOVA factorial completo 3x2x2. La significancia estadística se fijó en 0.05.

Figure 2. Effect sizes of the factors and their interactions in the RBD antigen binding step to anti-RBD IgA antibodies from breast milk mixtures. C: Bovine serum albumin concentration in the dilution buffer; T: incubation temperature; Ti: incubation time. (A) Mixture of breast milk with low IgA anti-RBD antibodies content (B) Mixture of breast milk with high IgA anti-RBD antibodies content. The response variable was the signal to noise ratio, which is the ratio between the A492nm signal of the blank-corrected milk mixtures and the blank signal. The effect size of factorial interactions was measured as the partial Eta-square of a 3x2x2 full factorial ANOVA. Statistical significance was set at 0.05.

Tabla 2. Relaciones señal/ruido calculadas para las mezclas de leche materna con bajo y alto contenido de anticuerpos IgA anti-RBD del SARS-CoV-2, aplicando un diseño factorial completo 3x2x2 en el paso de unión del antígeno RBD a los anticuerpos específicos de las mezclas.

Table 2. Signal to noise ratios calculated for breast milk mixtures with low and high content of SARS-CoV-2 IgA anti-RBD antibodies, applying a 3x2x2 full factorial design in the RBD antigen binding step to specific antibodies of the mixtures.

Mezcla de leche materna	Tiempo/ Temperatura	Concentración de BSA en el tampón de dilución		
		1 %	2 %	3 %
Con bajo contenido de anticuerpos IgA anti-RBD	1 h/TA	8.18	8.08	7.87
	2 h/TA	8.77	7.14	8.86
	1 h/37 °C	15.86	7.22	8.73
	2 h/37 °C	8.13	7.08	9.50
Con alto contenido de anticuerpos IgA anti-RBD	1 h/TA	26.22	14.97	14.58
	2 h/TA	25.72	17.56	16.19
	1 h/37 °C	35.11	16.49	16.18
	2 h/37 °C	20.34	15.93	14.07

la combinación óptima de factores y niveles establecida para este paso del ensayo.

La optimización de los dos primeros pasos del ELISA logró, además del incremento de la relación S/R, la disminución de los tiempos de incubación en 1 h cada uno. Con esto se reduce 2 h el tiempo total que requerirá el ELISA optimizado, lo que constituye una ventaja desde el punto de vista práctico.

Según Crowther y Smith (1992) uno de los parámetros cruciales en el proceso de optimización de un ELISA es definir la concentración del conjugado enzimático. La cantidad de enzima que se une influye directamente en la señal de absorbancia que se genera. Muy poca enzima origina una débil señal y, por ende, se afecta la relación S/R. Demasiada enzima puede causar un fondo muy alto, dando como resultado también una desfavorable relación S/R. En este trabajo, para determinar el factor de dilución apropiado, el conjugado CBSSlgAH- HRP fue diluido en ocho diluciones seriadas 1:2

usando PBS con 1 % de BSA, por ser el porcentaje con que se logró el mejor resultado en el paso anterior. El factor de dilución óptimo para el conjugado fue 4000 en este ELISA (Tabla 3). Con esta dilución, que fue determinada aplicando todos los factores optimizados en los pasos anteriores del ELISA, se logró una relación S/R 4.67 veces superior a la obtenida con la dilución 1:8000 aplicada en el ELISA preliminar.

Debido a las limitaciones experimentales que puedan presentarse, Altekar *et al.* (2007) han recomendado para los DOEs factoriales completos no evaluar más de seis factores simultáneamente. En este trabajo se evaluó un máximo de cinco factores a la vez, únicamente en la etapa de recubrimiento, sin que ello implicara una alta complejidad experimental. Además, con este tipo de DOE se requieren menos recursos materiales y menos tiempo para la gran cantidad de información que se obtiene. Augustine *et al.* (2015) afirmaron que en un diseño factorial se utilizan muchas observaciones

Tabla 3. Evaluación de los factores de dilución aplicados al conjugado CBSSlgAH- HRP.**Table 3.** Evaluation of the dilution factors applied to the CBSSlgAH-HRP conjugate.

Factor de dilución	A 492 nm del blanco	A 492 nm de la mezcla de leche materna	Señal/ Ruido
1000	0.070	1.580	22.56
2000	0.054	1.515	28.05
4000	0.048	1.750	36.45
8000	0.063	1.227	19.47
16000	0.046	1.000	21.74
32000	0.043	0.621	14.44
64000	0.042	0.382	9.10
128000	0.045	0.206	4.57

A492nm: Absorbancia medida a 492 nm

Los valores de la segunda y tercera columnas representan la media de los valores de absorbancia de tres repeticiones en cada dilución del conjugado. El coeficiente de variación estuvo en el rango entre 0,23 % y 2,96 %. La relación señal/ruido es el cociente entre la A 492 nm de la mezcla de leche materna, corregida con el blanco, y la A 492 nm del blanco.

para estimar el efecto de cada factor de forma más precisa y cada interacción se evalúa de manera sistemática. Cuando no se utiliza el DOE factorial completo se puede presentar una secuencia dispersa de éxito y error en los experimentos, lo que no hace confiables los resultados. Por esta razón consideramos que la optimización del ELISA mediante este diseño experimental ha asegurado la identificación de la mejor combinación de factores y niveles en cada paso del ensayo, y que es acertada la estrategia de incorporarlos sucesivamente al ELISA mientras transcurre el proceso de optimización (Hernández *et al.*, 2023). Además, coincidimos con estos autores en que este tipo de diseño experimental es aplicable para optimizar varios tipos de ELISA: en ese trabajo, los autores lograron aumentar la sensibilidad analítica de un ELISA sándwich cuantitativo; y en el nuestro, que ha trabajado la optimización de un ELISA indirecto, se ha incrementado 4.67 veces la relación S/R respecto al ELISA preliminar no optimizado.

Dado que este ELISA se aplicará para verificar la presencia de anticuerpos anti-RBD del SARS-CoV-2 generados por la vacuna Abdala en la leche materna, el ensayo optimizado garantizará la detección en aquellas muestras con bajo contenido de anticuerpos, que probablemente tuvieran una señal de A 492 nm cercana al blanco del ensayo si se aplicara el protocolo no optimizado. La presencia de estos anticuerpos en la leche materna será el punto de partida para realizar otro tipo de ensayos, como los que evalúan la actividad neutralizante o la respuesta a la RBD de la variante Ómicron del SARS-CoV-2, considerando que más del 98 % de las secuencias genéticas públicamente disponibles desde febrero de 2022 corresponden a virus Ómicron, y estos constituyen el fondo genético a partir del cual es más probable que surjan nuevas variantes del SARS-CoV-2 (OMS, 2023).

CONCLUSIONES

La práctica de un DOE factorial completo para optimizar un ELISA indirecto, y la aplicación de las condiciones óptimas definidas en una etapa para la optimización de la siguiente, es una estrategia efectiva para lograr un incremento de la relación S/R del ensayo.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses en el trabajo informado en este documento.

REFERENCIAS

- Ahmed, R.K., Saad, E.M., Fahmy, H.M. y El Nashar, R. M. 2022. Multivariate experimental design: towards more reliable electrochemical detection. *Current Opinion in Electrochemistry*. 31: 100880.
- Altekar, M., Homon, C.A., Kashem, M.A., Mason, S.W., Nelson, R.M., Patnaude, L.A., Yingling, J. y Taylor, P. B. 2007. Assay optimization: a statistical design of experiments approach. *Clinics in Laboratory Medicine*. 27(1): 139-154.
- Arias-Nava, E.H., Ríos-Lira, A.J., Vázquez-López, J.A. y Pérez-González, R. 2015. Estudio comparativo entre los enfoques de diseño experimental robusto de Taguchi y tradicional en presencia de interacciones de control por control. *Ingeniería Investigación y Tecnología*. 16(1): 131-142.
- Ashmawy, R., Hamdy, N., Elhadi, Y., Alqutub, S., Esmail, O., Abdou, M., Reyad, O., El-Ganainy, S., Gad, B., Nour El-Deen, A., Kamal, A., ElSaieh, H., Elrewiny, E., Shaaban, R. y Ghazy, R. 2022. A Meta-Analysis on the Safety and Immunogenicity of COVID-19 Vaccines. *Journal of Primary Care & Community Health*. 13:21501319221089255.
- Augustine, S.A., Simmons, K.J., Eason, T.N., Griffin, S.M., Curioso, C.L., Wymer, L.J., Shay Fout, G., Grimm, A.C., Oshima, K.H. y Dufour, A. 2015. Statistical approaches to developing a multiplex immunoassay for determining human exposure to environmental pathogens. *Journal of Immunological Methods*. 425: 1-9.

- Ben-Shachar, M.S., Lüdtke, D. y Makowski, D. 2020. Effect size: Estimation of effect size indices and standardized parameters. *Journal of Open Source Software*. 5(56): 2815.
- Cohen, J. 1988. The concepts of power analysis. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. 2: 1-17.
- Crowther, J.R. y Smith, H. 1992. *ELISA Manual* U.K. p.2-21.
- Hernández, C.A., Pérez-Bernal, M., Abreu, D., Valdivia, O., Delgado, M., Dorta, D., Domínguez, A.G., Pérez, E.R. y Sánchez-Ríos, J.M. 2023. Step-by-step full factorial design to optimize a quantitative sandwich ELISA. *Analytical Biochemistry*. 674: 115195.
- Kechagias, J.D., Aslani, K.E., Fountas, N.A., Vaxevanidis, N.M. y Manolagos, D.E. 2020. A comparative investigation of Taguchi and full factorial design for machinability prediction in turning of a titanium alloy. *Measurement*. 151: 107213.
- Limonta-Fernández, M., Chinea-Santiago, G., Martín-Dunn, A.M., Gonzalez-Roche, D., Bequet-Romero, M., Márquez-Perera, G., González-Moya, I., Canaan-Haden-Ayala, C., Cabrales-Rico, A., Espinosa-Rodríguez, L.A., Ramos-Gómez, Y., Andujar-Martínez, I., González-López, L.J., de la Iglesia, M.P., Zamora-Sanchez, J., Cruz-Sui, O., Lemos-Pérez, G., Cabrera-Herrera, G., Valdés-Hernández, J., Martínez-Díaz, E., Pimentel-Vázquez, E., Ayala-Avila, M., y Guillén-Nieto, G. 2022. An engineered SARS-CoV-2 receptor-binding domain produced in *Pichia pastoris* as a candidate vaccine antigen. *Nature Biotechnology*. 72:11-21.
- Minic, R. y Zivkovic, I. 2020. Optimization, validation and standardization of ELISA. *Norovirus*. 9-28.
- OMS. 2023. Declaración sobre la actualización de las definiciones de trabajo y del sistema de seguimiento de las variantes preocupantes y las variantes de interés del SARS-CoV-2- 16 de marzo de 2023. [Consultado Junio-5-2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/16-03-2023-statement-on-the-update-of-who-s-working-definitions-and-tracking-system-for-sars-cov-2-variants-of-concern-and-variants-of-interest>
- Papaneophytou, C. 2019. Design of experiments as a tool for optimization in recombinant protein biotechnology: from constructs to crystals. *Molecular Biotechnology*. 61(12): 873-891.
- Peng, P., Liu, C., Li, Z., Xue, Z., Mao, P., Hu, J., Xu, F., Yao, C. y You, M. 2022. Emerging ELISA derived technologies for *in vitro* diagnostics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 116605.
- Ramírez-Reveco, A., Velásquez, G., Aros, C., Navarrete, G., Villarroel-Espíndola, F., Navarrete, M., Fica, A., Plaza, A., Castro, N., Verdugo, C., Acosta-Jamett, G. y Verdugo, C. 2023. Performance estimation of two in-house ELISA assays for COVID-19 surveillance through the combined detection of anti-SARS-CoV-2 IgA, IgM, and IgG immunoglobulin isotypes. *PLoS ONE*. 18(2): e0270388.
- Ray, C.A., Patel, V., Shih, J., Macaraeg, C., Wu, Y., Thway, M., Lee, J.W. y DeSilva, B. 2009. Application of multi-factorial design of experiments to successfully optimize immunoassays for robust measurements of therapeutic proteins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 49(2): 311-318.
- Rodríguez, M.C., Ceaglio, N., Gugliotta, A., Villaraza, J., Garay, E., Fuselli, A., Gastaldi, V., Tardivo, M.B., Antuña, S., Fontana, D. y Prieto, C. 2022. Design and optimization of an IgG human ELISA assay reactive to recombinant RBD SARSCoV-2 protein. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 106(23): 7933-7948.
- Tsoi, J., Patel, V. y Shih, J. 2014. A practical approach to automate randomized design of experiments for ligand-binding assays. *Bioanalysis*. 6(5): 705-713.