

Alérgenos – Alergenos alimentarios

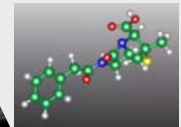
Detección: Cualitativa - Cuantitativa

Legislación Nacional e Internacional

Dra. Cristina D'Aiutolo
R-Biopharm Latinoamérica
c.daiutolo@r-biopharmlat.com.ar

• Alérgenos - Alergias

- Sustancias que causan reacciones alérgicas en ciertas personas pero son inocuas para otras
- NO SON SUSTANCIAS TOXICAS!!!!
- Las alergias son reacciones inmunológicas caracterizadas por la producción de inmunoglobulina E específica hacia el epítipo alérgénico
- Los alérgenos tienen efecto en muy bajas concentraciones (trazas)
- Los más comunes:
 - bacterias, virus, parásitos
 - sustancias químicas, medicamentos
 - polen, humo
 - alimentos: **alergias alimentarias**



- ## Alergias alimentarias

- Reacciones anómalas del organismo secundarias a la ingesta, contacto ó inhalación de alimentos con una causa inmunológica comprobada
- Son generalmente proteínas que desencadena una respuesta inmunitaria exagerada
- En una alergia alimentaria verdadera, el sistema inmunitario produce anticuerpos (IgE) e histamina en respuesta a un alimento específico
- Los síntomas que van de leves (urticaria) a severos (shock anafiláctico – muerte)
- Los alérgenos problemáticos son aquellos ocultos en el producto final – producto de contaminación no intencional (contaminación cruzada)

• Alergias alimentarias

➤ Dependiendo de las incidencias de alergias en cada país, los alérgenos se han clasificado en:

Los grandes 8

Leche

Huevo

90% niños

Maní

Frutos secos

90% adultos

Pescados

Moluscos

Soja

Trigo (gluten)

Los grandes 14

Apio

Mostaza

Sésamo

Crustáceos

Lupines

Sulfitos



- Elección de un método de análisis

- Desafíos que enfrentamos
 - Qué estamos buscando?
 - Cómo lo buscamos?
 - Dónde lo buscamos?
 - Hasta cuánto buscamos?



• Elección de un método de análisis

Qué estamos buscando?

- ✓ Principales alérgenos del Maní (Arachis hypogea)
 - Ara h1 (vicilina)
 - Ara h2 (albúmina)
 - Ara h 3 Araquina (legumina)
 - Ara h4 (profilina)
 - Ara h5 (albúmina)
 - Ara h6, Ara h7, Ara h8



• Elección de un método de análisis

Cómo lo buscamos?

- ✓ Metodología
 - Método debe ser adecuado para cada caso (fit for purpose)
 - Qué alérgeno busco?
 - Necesito cuantificar ó solamente detectar?
- ✓ Se deben conocer las características de rendimiento del método en el laboratorio
 - Materia prima
 - Alimentos procesados
- ✓ Es necesario controlar los ensayos continuamente
 - Controles internos / externos
 - Muestras certificadas
 - Rondas interlaboratorio
- ✓ Analistas competentes
- ✓ Documentar todo lo antes enunciado



• Elección de un método de análisis

Dónde lo buscamos?

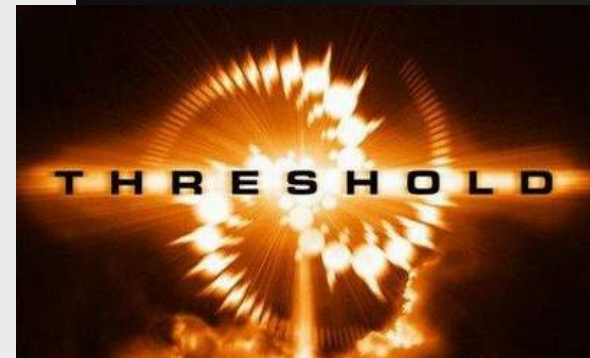
- ✓ Materias primas
- ✓ Alimentos procesados
- ✓ Drante el proceso
- ✓ Producto terminado



- Elección de un método de análisis

Hasta cuanto buscamos?

- ✓ 1000 ppm
- ✓ 100 ppm
- ✓ 10 ppm
- ✓ 1 ppm (podemos?)
- ✓ **NO HAY UMBRALES!!!!**



• Elección de un método de análisis

Métodos estandarizados

- ✓ Estándares (extractos de alérgenos) certificados por organismos internacionales
- ✓ Métodos Validados
 - In-House
 - Certificados por organismos internacionales: AOAC/AFNOR/ISO
- ✓ Bajo límite de detección (LOD)
- ✓ Bajo límite de cuantificación (LOD)



- Validación: Qué es?

Definición:

- ✓ Latín: **validus** (fuerte, eficaz, saludable)
- ✓ La prueba de reproducibilidad de los resultados de un procedimiento descrito con términos definidos. Cuanto más exacto se describe un procedimiento (pocos parámetros desconocidos) sus resultados son más exactos



• Validación: Porqué es importante?

Métodos validados

✓ El productor al igual que el analista y el consumidor necesitan saber si el sistema de análisis es confiable

✓ Ensayos de validación:

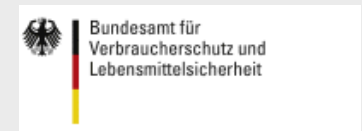
- Precisión
- Exactitud
- Robustez
- Especificidad / selectividad
- Límite de detección / Límite de cuantificación
- Linealidad, sensibilidad
- Reproducibilidad (aún en diferentes laboratorios)
- Adaptabilidad
- Reproducibilidad con otros métodos



• Validación de los ensayos - Certificados

Instituciones

- ✓ AOAC (Association of Analytical Communities) (Asociación de Comunidades Analíticas)
- ✓ AACC (American Association for Clinical Chemistry) (Asociación Americana de Química Clínica)
- ✓ WGPAT (Working group for prolamin analysis and toxicity) (Grupo de trabajo para el análisis y toxicidad de prolaminas)
- ✓ ICC (International Association for Cereal Science and Technology) (Asociación Internacional de Ciencia y Tecnología de Cereales)
- ✓ BVL (German Federal Office of Consumer Protection and Food Safety) (Oficina Federal Alemana para Protección del Consumidor y Seguridad Alimentaria)



- Métodos de análisis de alérgenos

Métodos directos



Basados en la detección de proteínas ó de fragmentos de proteínas alergénicas



Técnicas inmunológicas



Técnicas no inmunológicas

Métodos indirectos



Basados en el reconocimiento específico de fragmentos de ADN que codifican una determinada proteína



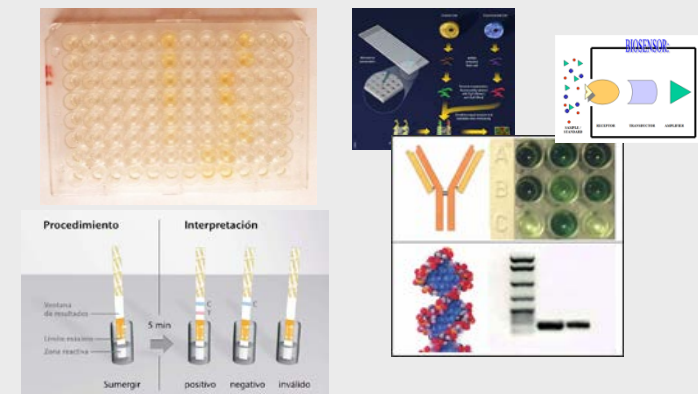
PCR tradicional
RT-PCR



• Métodos de análisis de alérgenos

Métodos directos: Métodos Inmunológicos

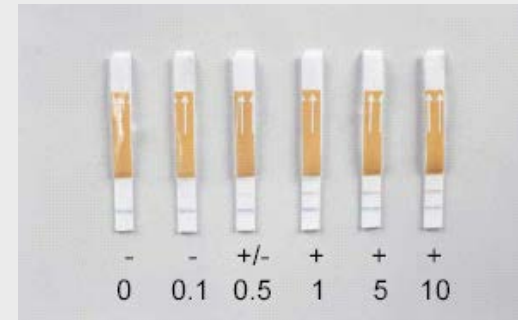
- ✓ Utilizan anticuerpos dirigidos contra las principales proteínas alergénicas
 - Inmunocromatografía de Flujo Lateral – LFD
 - ELISA
 - Microarrays y Biosensores



• Métodos de análisis de alérgenos

Inmunocromatografías de Flujo Lateral LFD

- ✓ Método cualitativo ó semicuantitativo
- ✓ No requiere equipamiento
- ✓ Lectura visual
- ✓ Control de sanitización
- ✓ Control de superficies y de ambientes
- ✓ Se pueden guardar como documento



Para muestras negativas ó $\downarrow\downarrow$ [] alérgeno

Muestras con $\uparrow\uparrow$ [] \rightarrow saturación - Efecto Hook

Muestras altamente positivas \longrightarrow NEGATIVO



• Métodos de análisis de alérgenos

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

- ✓ Método cuantitativo
- ✓ Sandwich ó Competitivo: dependiendo del tipo de antígeno a analizar
- ✓ Análisis de Materias primas
- ✓ Análisis de Productos terminados

Hay que conocer la especificidad de los anticuerpos utilizados.

Validar los ensayos para cada matriz: muestras procesadas pueden tener alterado el alérgeno: hidrolisis, alteración de estructuras secundarias y terciarias

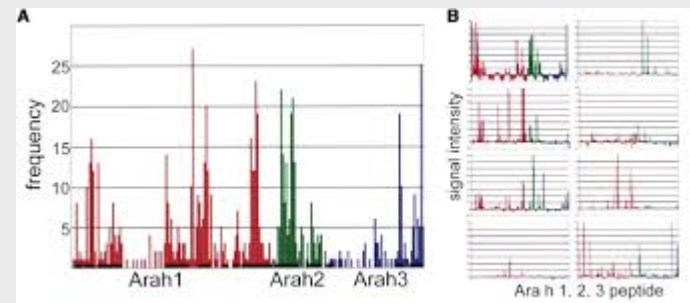


Muestras positivas → NEGATIVO

• Métodos de análisis de alérgenos

Microarrays y Biosensores

- ✓ Método cuantitativo
- ✓ Todavía en desarrollo
- ✓ Análisis de Materias primas
- ✓ Análisis de Productos terminados



• Métodos de análisis de alérgenos

Métodos directos – No inmunológicos

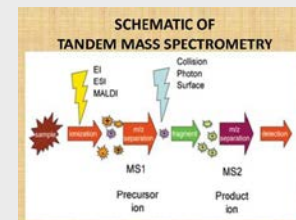
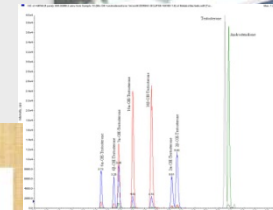
- ✓ Detectan fragmentos polipeptídicos pertenecientes a las proteínas alergénicas
- ✓ Cromatografía líquida – Espectrometría de masas en tandem: LC-MS-MS

Equipamiento costoso

Método cualitativo –secuenciación simultánea de aa

No hay estándares certificados - no puede compararse con otras metodologías

No está validado para diferentes matrices



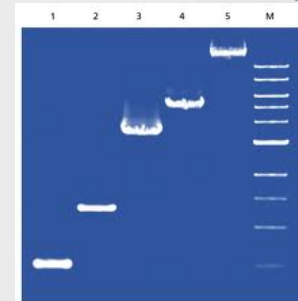
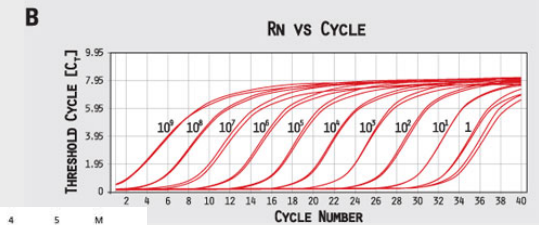
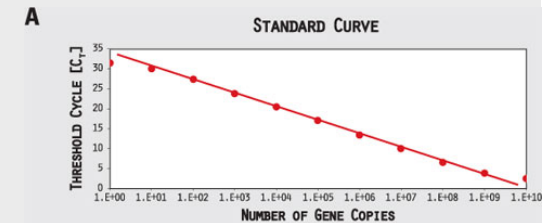
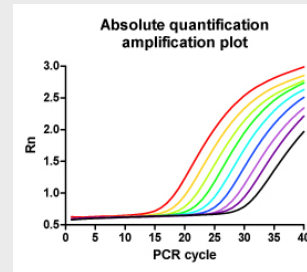
• Métodos de análisis de alérgenos

Métodos indirectos

- ✓ Basados en el reconocimiento específico de fragmentos de ADN que codifican una determinada proteína: PCR Tradicional, RT-PCR

Detecta y cuantifica DNA y no proteínas

No siempre se puede correlacionar con concentraciones de proteínas alergénicas



• Métodos de análisis de alérgenos

Qué metodología elegimos?

- ✓ Para qué lo necesito?
 - Materia Prima ó Producto procesado
 - Sanitización y limpieza
- ✓ Para qué matriz?
 - Simple ó compleja
- ✓ Para qué necesito el resultado?
 - Control intermo ó para dilucidar controversia?
- ✓ Qué proteína/s alergénica/s busco?
 - Policlonales: baja especificidad / alta sensibilidad
 - Monoclonales: alta especificidad /baja? Sensibilidad

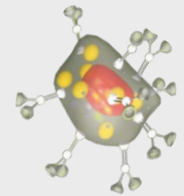


- **Métodos de análisis de alérgenos**

LDF: superficies, ambiente, productos libres de alérgenos

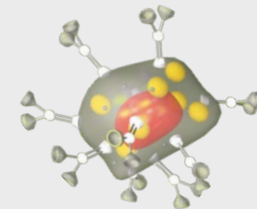
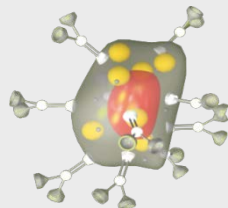
- ✓ **Ventajas**

- Económicos
- Simples de fácil manejo
- No requieren equipamiento
- No requieren personal altamente especializado



- ✓ **Desventajas**

- Cualitativo o semicuantitativo
- Efecto Hook (falsos negativos)

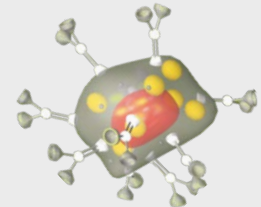
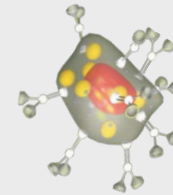


• Métodos de análisis de alérgenos

ELISA: materias primas, productos procesados

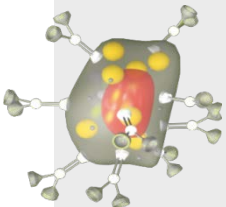
✓ **Ventajas**

- Cuantitativos
- Ensayos muy validados
- Alta especificidad y sensibilidad
- Rápidos
- No muy costosos
- No requiere personal altamente especializado



✓ **Desventajas**

- Puede no detectar proteínas alteradas por procesos de elaboración (falsos negativos)
- Un sólo alérgeno por largada
- Necesidad de largar curva de calibración en cada ensayo



• Métodos de análisis de alérgenos

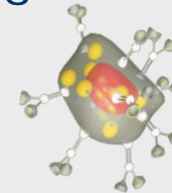
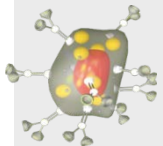
LC-MS/MS: Metodología nueva para alérgenos que se está poniendo a punto actualmente. Principalmente para investigación

✓ **Ventajas**

- Método de referencia – Gold Standard EuroPrevall – MoniQa – iFAAM
- Muy sensible
- Varios alérgenos por largada

✓ **Desventajas**

- Equipamiento muy costoso
- Requiere personal altamente capacitado
- Cualitativo (secuenciación de aa de los fragmentos)
- No hay estándares
- Método no validado



- **Métodos de análisis de alérgenos**

RT-PCR: Materias primas, Productos procesados, Adulteración



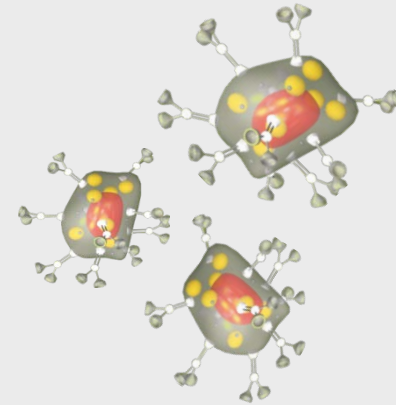
Ventajas

- Específico
- Muy sensible



Desventajas

- Equipamiento costoso
- Requiere configuraciones edilicias específicas
- Requiere personal altamente capacitado
- Difícil correlación con concentración de proteínas alergénicas
- Sensible a los bajos pH



• Métodos Validados

- ✓ **Elaboradores de kits**
 - Demuestra adecuación
 - Procedimiento analítico probado
- ✓ **Analista**
 - Asegura fiabilidad
 - Precisión de los resultados
- ✓ **Productor de alimentos**
 - Asegura calidad
 - Soporte legal de los resultados
- ✓ **Consumidor**
 - Asegura calidad
 - Soporte legal de los resultados





Muchas gracias!!!!

