

Alérgenos en Alimentos Detección y Cuantificación

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



Alérgenos

- Sustancias **inocuas** que causan reacciones alérgicas en ciertas personas
- NOS SON SUSTANCIAS TOXICAS!!!!
- Reacciones inmunológicas caracterizadas por la producción de Inmunoglobulina E específica hacia el epítotope alérgénico
- Los más comunes comprenden:
 - bacterias, virus, parásitos
 - sustancias químicas, medicamentos
 - polen, humo
 - alimentos: **alergias alimentarias**
- Tienen efecto en bajas concentraciones (trazas)
- Los alérgenos problemáticos son aquellos ocultos en el producto final – producto de contaminación no intencional (contacto cruzado)



Elección de un Método de Análisis

Desafíos que enfrentamos

- Qué estamos buscando?
- Cómo los buscamos?
- Dónde los buscamos?
- Hasta cuánto buscamos?



Elección de un Método de Análisis

- Qué estamos buscando?
 - ✓ Leche: 30 a 35 g/l de proteínas - alérgenos de la leche:
 - Caseínas:
 - ❖ α -s1-caseína
 - ❖ α -s2-caseína
 - ❖ β -caseína
 - ❖ κ -caseína
 - β -Lactoglobulina (BLG)
 - α -Lactoglobulina (ALA)
 - Lactoferrina, Seroalbúmina bovina, etc.....



Elección de un Método de Análisis

- Cómo lo buscamos?
 - ✓ Metodología
 - Método debe ser adecuado para cada caso (fit to purpose)
 - Qué alérgeno busco
 - Necesito cuantificar ó solamente detectar
 - ✓ Conocer las características de rendimiento del método en el laboratorio
 - Materias primas
 - Productos procesados
 - ✓ Controlar los ensayos continuamente
 - Controles internos / externos
 - Muestras certificadas
 - ✓ Analistas competentes
 - ✓ Documentar todo lo antes enunciado



Elección de un Método de Análisis

- Dónde lo buscamos?
 - ✓ Materias primas
 - ✓ Durante el proceso
 - Material de arrastre
 - Hisopado de superficies
 - Soluciones de lavado (CIP)
 - Aire
 - ✓ Producto terminado



Elección de un Método de Análisis

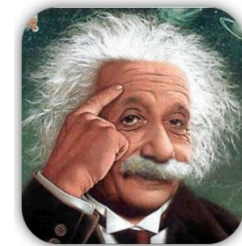
- Hasta cuanto buscamos?
 - ✓ 1000 ppm
 - ✓ 100 ppm
 - ✓ 10 ppm
 - ✓ 1 ppm (podemos?)
- **NO HAY UMBRALES**
 - ✓ Gluten, sulfitos

@Umbrales

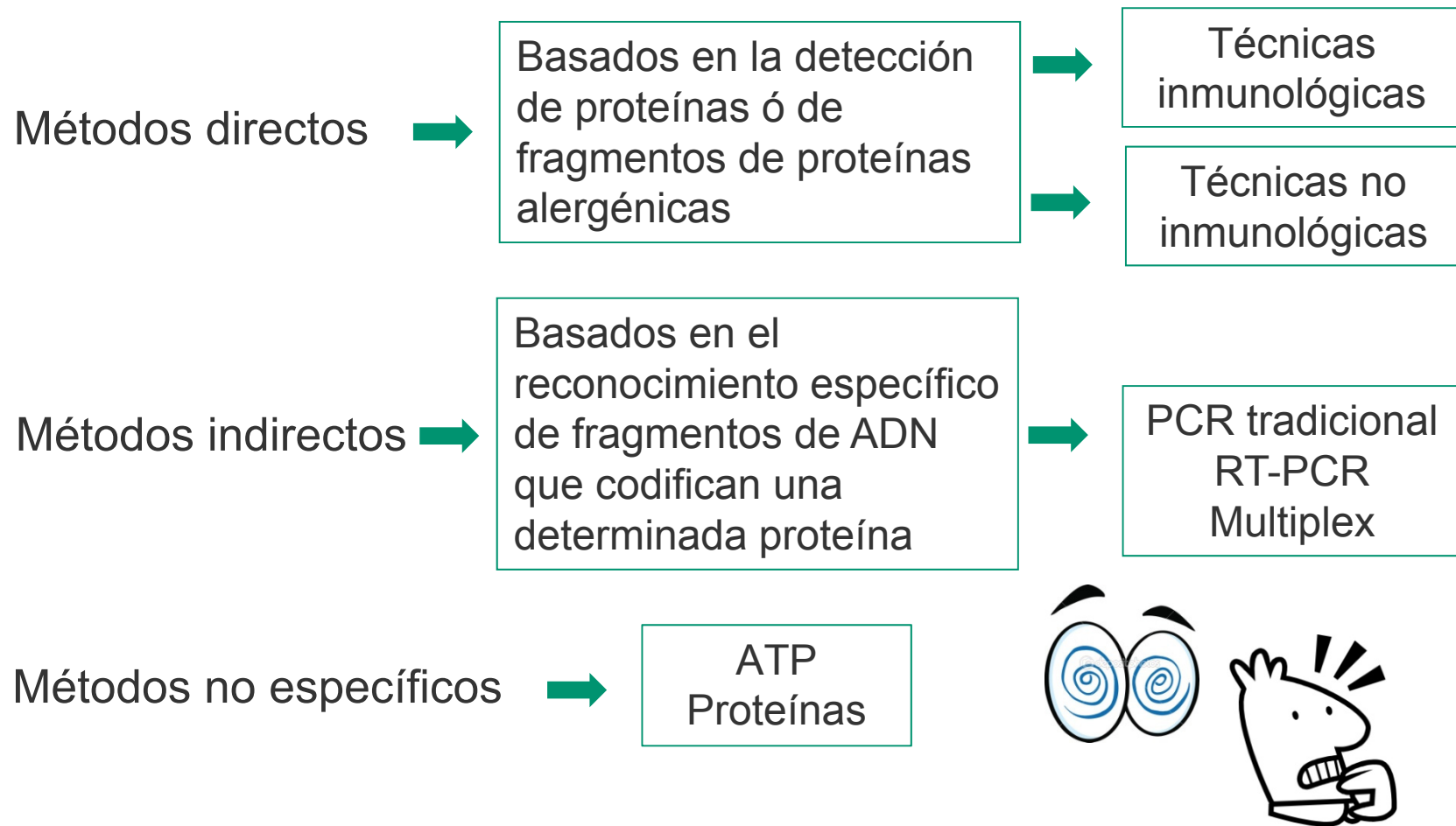


Elección de un Método de Análisis

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

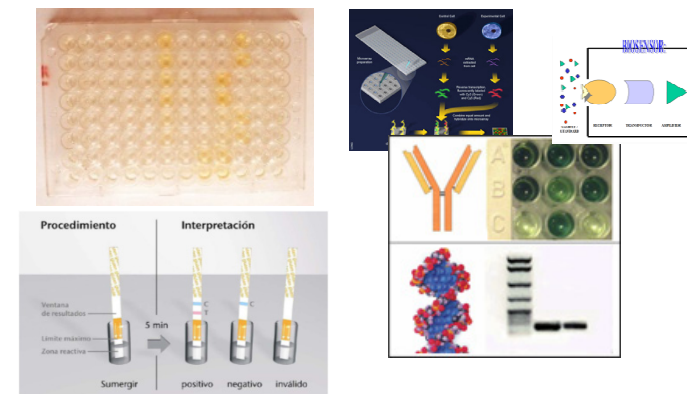


Métodos de Análisis para Alérgenos



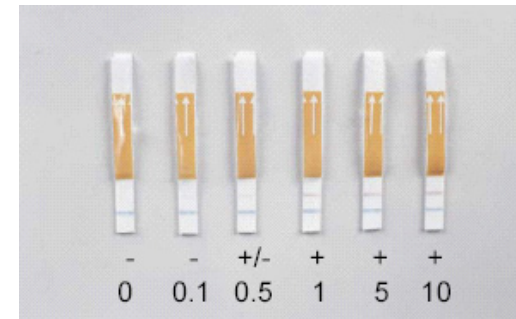
Métodos de Análisis para Alérgenos

- Métodos directos: Métodos Inmunológicos:
 - ✓ Utilizan anticuerpos dirigidos contra las principales proteínas alergénicas o fragmentos de las mismas
 - Inmunocromatografía de Flujo Lateral – LFD
 - ELISA
 - Biosensores



Métodos de Análisis para Alérgenos

- Inmunocromatografías de Flujo Lateral - LFD
 - ✓ Método cualitativo, semicuantitativo ó cualitativo (uso de Scan ó lector)
 - ✓ No requiere equipamiento
 - ✓ Lectura visual
 - ✓ Control de sanitización - verificación
 - ✓ Control de superficies y de ambientes
 - ✓ Se puede guardar como documento

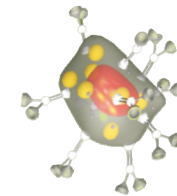


Métodos de Análisis para Alérgenos

- LFD: superficies, ambiente, productos libres de alérgenos

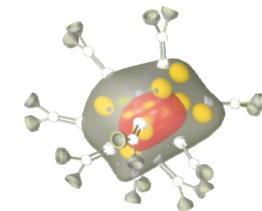
Ventajas

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



Desventajas

- ✓ Cualitativo o semicuantitativo
- ✓ Efecto Hook
 - Muestras altamente positivas → NEGATIVO (falsos negativos)



Métodos de Análisis para 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
- ✓ Validación de limpieza



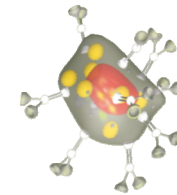
- Detecta proteínas de la fuente alérgica de interés
- Sensible para asegurar inocuidad en paciente alérgico
- Se puede utilizar dentro de las plantas procesadoras de alimentos, resultados rápidos
- Conocer la especificidad de los anticuerpos utilizados (reacciones cruzadas)
- Validar los ensayos para cada matriz: muestras procesadas – determinante antigénico alterado
- Método de rastreo que necesita confirmación de las muestras positivas

Métodos de Análisis para Alérgenos

- ELISA: Materias primas, productos procesados

Ventajas

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



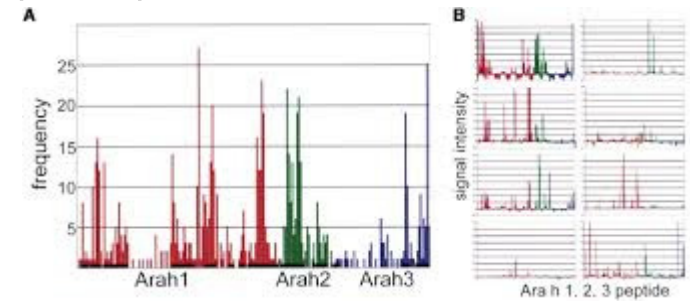
Desventajas

- ✓ Pueden 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 para Alérgenos

- Biosensores – Surface Plasmon Resonance (SPR)

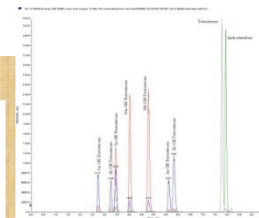
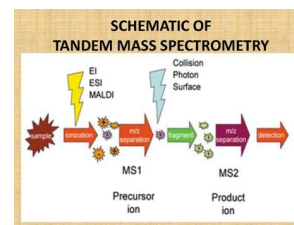
- ✓ Metodología reciente - todavía en desarrollo
- ✓ Métodos Cuantitativos (también en línea)
- ✓ Análisis de Materias Primas
- ✓ Análisis de Productos Terminados



- Ab específico inmovilizado en un chip de vidrio coated con oro y un transductor que convierte la señal en una señal medible por un sensor acoplado a un prisma
- Al incidir luz polarizada sobre el prisma, se obtiene un índice y un ángulo de reflexión característico
- Cuando el alérgeno se une al Ab cambia el índice y el ángulo. Este cambio es proporcional a la masa del alérgeno
- El chip se puede regenerar muchas veces (más de 100), se puede utilizar en línea
- Disminuye costo y tiempo del ensayo

Métodos de Análisis para Alérgenos

- Métodos directos – No Inmunológicos
 - ✓ Espectrometría de masa: LC-MS/MS
 - Análisis cualitativos (cuantitativos si se adiciona un secuenciador de aa)
 - Materia Prima ó Alimentos Procesados
 - Detectan fragmentos polipeptídicos de las proteínas alergénicas
 - No dependen de la interacción Ag-Ab (el Ag se puede alterar debido a cambios por el procesamiento de los alimentos)



Métodos de Análisis para Alérgenos

- Espectrometría de masa: LC-MS/MS
- ✓ Digestión de proteínas alergénicas con proteasas (tripsina ó quimotripsina)
- ✓ Separación de péptidos de varios tamaños Cromatografía Líquida (LC)
- ✓ Ionización de los péptidos por:
 - Ionización electrónica
 - Bombardeo iónico
 - **MALDI**: Matrix-assisted-laser-desorption ionization
 - Ionización por electrospray
- ✓ Medición de la relación masa/carga por medio de espectrómetro de masas:
 - Cuádruple (Q)
 - Trampa iónica (Ion-trap)
 - Tiempo de vuelo (time-of-flight **TOF**)
 - Transformación de Fourier
- ✓ Comúnmente se hace en tandem: aumenta sensibilidad, resolución y exactitud
 - QQQ, Q/TOF; TOF/TOF; MALDI/TOF

Métodos de Análisis para Alérgenos

- LC-MS/MS: Metodología nueva para alérgenos. 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



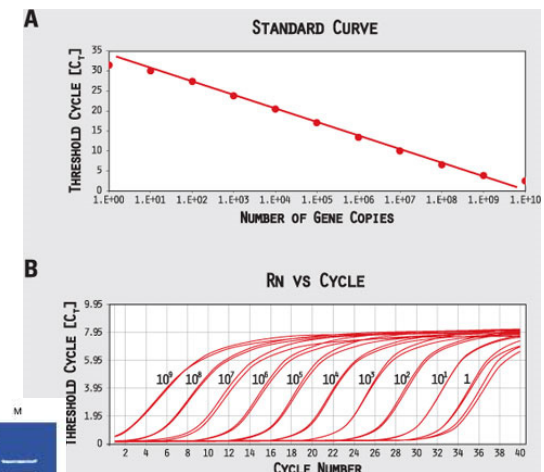
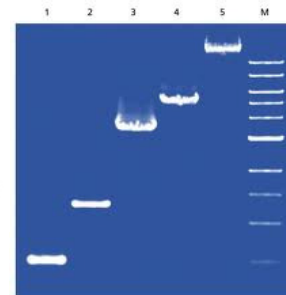
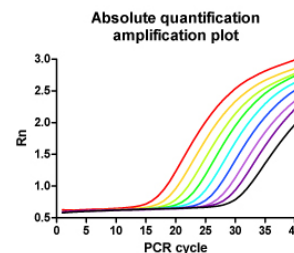
Métodos de Análisis para Alérgenos

- Métodos indirectos

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

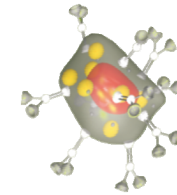
- ✓ PCR: 3 pasos

- ✓ Extracción y purificación del ADN
- ✓ Amplificación de secuencia/s específica/s de ADN
- ✓ Detección del ADN amplificado



Métodos de Análisis para Alérgenos

- RT-PCR: Materias primas, Productos procesados, Adulteración

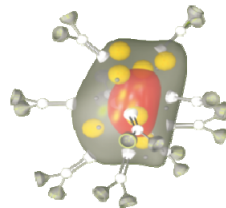
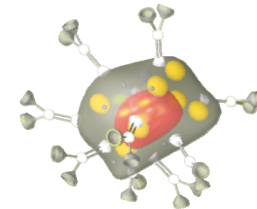


Ventajas

- ✓ 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 de Análisis para Alérgenos

- Métodos no específicos

- ✓ ATP/AMP

- Detecta ATP de fuentes biológicas
- Efectividad de la sanitización
- Rápido y económico
- Se realiza “in-situ”

- ✓ Desventajas

- Aplicaciones limitadas
- ATP de agua
- Mide ATP y no alérgeno



Métodos de Análisis para Alérgenos

- Métodos no específicos
 - ✓ Proteínas totales
 - Detecta Proteínas
 - Efectividad de la sanitización
 - Rápido y económico
 - Se realiza “in-situ”
 - ✓ Desventajas
 - Detecta todas las proteínas no sólo las alergénicas
 - No tiene buen nivel de detección



Métodos de Análisis para Alérgenos

- Qué metodología elegimos?
 - ✓ Para qué la 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



Conclusión

- ✓ Muchas herramientas disponibles para la detección de alergenios en alimentos
- ✓ Los métodos más comunes son los inmunoenzimáticos
- ✓ La elección del método depende de su uso específico, tipo de matriz y demás factores
- ✓ Necesidad de validación “in-house“
- ✓ Generalmente se necesita más de un método
- ✓ Es necesario tener mayor conocimiento de las propiedades químicas del alergenio: mejor extracción y detección
- ✓ Es necesario contar con estándares de referencia para evaluación y comparación de métodos
- ✓ Importante el uso de métodos validados



Temas a considerar

- ✓ Complejidad del Plan de Muestreo de Alérgenos: no está estandarizado
- ✓ No está armonizado el uso de Etiquetado Precautorio (PAL): pérdida de confianza del consumidor
- ✓ No hay umbrales reconocidos: no se puede alcanzar el cero (relevante?)
- ✓ Análisis de alérgenos:
 - Resultados no comparables entre distintos kits
 - No hay estándares de referencia reconocidos
 - No hay método de referencia (excepto gluten)
 - No hay unidades de reporte estandarizadas



Trabajo conjunto

Trabajo conjunto de todos los actores

- Pacientes
- Profesionales de la salud
- Industria:
 - Productora de alimentos
 - Productora de kits
- Investigación: grupos nacionales e internacionales
- Agencias oficiales regulatorias
- Centros educativos: difusión



