

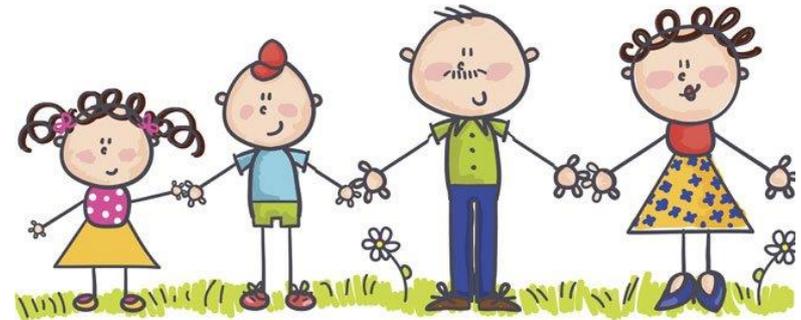
# Detección de proteínas alergénicas Control en Plantas elaboradoras

Dra. Cristina D'Aiutolo  
R-Biopharm Latinoamérica  
[c.daiutolo@r-biopharmlat.com.ar](mailto:c.daiutolo@r-biopharmlat.com.ar)



## Alérgenos y Alergias alimentarias – algunos datos

Prevalencia 2 – 4 % adultos\*  
5 – 8 % niños\*\*



“La dieta de exclusión es la única solución para los consumidores alérgicos”

\* Young et al., 1994; A population study of food intolerance. Lancet 343,  
\*\* Sampson H.A., 2005; Food allergy – accurately identifying clinical reactivity  
Allergy, 60 (Suppl 79), 19-24

## Alérgenos y Alergias alimentarias – algunos datos

### Tendencias ..

- ✓ Aumento del número de pacientes alérgicos
- ✓ Los consumidores tienden a elegir dietas libres de alérgenos aunque no sean alérgicos ni intolerantes
- ✓ Boom de las dietas “Gluten Free”
- ✓ El consumidor quiere estar informado en tiempo real (en el negocio o en el restorán)
- ✓ La industria alimentaria ... tiene que responder a dicha necesidad



## Gestión de Alérgenos

No hay dudas: es necesario un Plan de Manejo de Alérgenos!!!!

- ✓ Para informar y proteger al consumidor alérgico correcta y efectivamente



## Gestión de Alérgenos

### Protección al consumidor alérgico



Urticaria



Dermatitis atópica

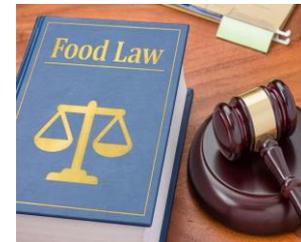


Anafilaxis

## Gestión de Alérgenos

No hay dudas: es necesario un Plan de Manejo de Alérgenos!!!!

- ✓ Para informar y proteger al consumidor alérgico correcta y efectivamente
- ✓ Para cumplir con la legislación (nacional e internacional – comercio)



## Legislación Internacional

	Codex Alimentarius (1999)	Australia (The Code 2000)	Canada (Health Canada 2008)	China (Food & Environmental Hygiene Dept. 2005)	EU (EU directives 2000-2007)	Japan (Ministry of Health 2001) **	South Africa (Foodstuffs, Cosmetics & Disinfectants Act 1972)	United States (FALCPA 2004)
Gluten (Cereales)	X	X	X	X	X	X	X	X
Crustáceos	X	X	X	X	X	X	X	X
Moluscos					X	X	X	
Huevo	X	X	X	X	X	X	X	X
Pescado	X	X	X	X	X		X	X
Bivalvos			X					
Maní	X	X	X	X	X	X	X	X
Soja	X	X	X	X	X	X	X	X
Leche	X	X	X	X	X	X	X	X
Frutos secos*	X	X	X	X	X	X	X	X
Sulfitos	X	X		X	X			
Sésamo		X	X		X			
Apio					X			
Mostaza			X		X			
Lupinos		X			X			
Trigo Sarraceno						X		

\* Almendra, nueces de Brasil, castañas de Cajú, avellanas, nueces de Macadamia, pecanas, piñones, pistachos y nuez común (nogal)

\*\* Abalone, calamar, huevas de salmón, camarones, gambas, naranjas, cangrejos, kiwis, carne de res, nueces de árbol, salmón, caballa, soja, pollo (aves), cerdo, champiñones, melocotones, ñames, manzanas y gelatina

## Legislación Latinoamérica

	Codex Alimentarius -1999	Brasil RDC 26/2015	Colombia RES 005109 / 2005	Costa Rica, Nicaragua, Guatemala, Honduras, El Salvador RTCA 67.01.07: 10 ANNEX de la RES. 280-2012 (COMIECO-LXII)	Chile RES 427/2010	Méjico NOM-051-SCFI/SSA1:2 010	Argentina Res Conj 10-E/2017	Venezuela COVENIN 2952:2001 1st Rev
Gluten (Cereales)	X	X	X	X	X	X	X	X
Crustáceos	X	X	X	X	X	X	X	X
Moluscos								
Huevo	X	X	X	X	X	X	X	X
Pescado	X	X	X	X	X	X	X	X
Latex		X						
Maní	X	X	X	X	X	X	X	X
Soja	X	X	X	X	X	X	X	X
Leche	X	X	X	X	X	X	X	X
Frutos secos*	X	X	X	X	X	X	X	X
Sulfitos	X		X	X	X	X	X	X

## Legislación Latinoamérica

Países que no cuentan con legislación:

- ✓ República Dominicana
- ✓ Haití
- ✓ Panamá
- ✓ Paraguay
- ✓ Perú
- ✓ Uruguay



## Gestión de Alérgenos

No hay dudas: es necesario un Plan de Manejo de Alérgenos!!!!

- ✓ Para informar y proteger al consumidor alérgico correcta y efectivamente
- ✓ Para cumplir con la legislación (nacional e internacional – comercio)
- ✓ Para prevenir daños colaterales (financieros? morales?)



## Gestión de Alérgenos

Evitar daños colaterales



## Gestión de Alérgenos

Idealmente el manejo de alérgenos debería ser **fácil...**

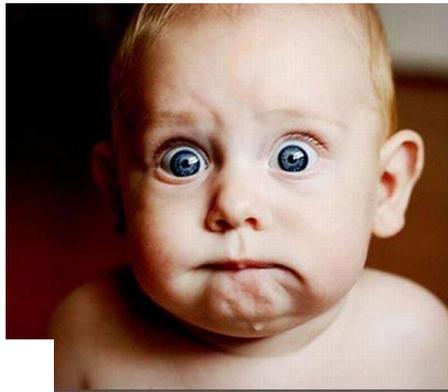
- ✓ Porque conozco los ingredientes y ...
- ✓ Las materias primas son 100% puras
- ✓ Los ingredientes no contienen alérgenos ocultos
- ✓ No ocurre el Contacto cruzado.....



En el mundo real el manejo de alérgenos es... **un desafío**

- ✓ Hay contacto cruzado con frecuencia (pero lo puedes prevenir!)
- ✓ Las materias primas no son 100% puras (pero las puedes controlar!)
- ✓ Los ingredientes pueden contener alérgenos ocultos (...!)

## Gestión de Alérgenos



# Gestión de Alérgenos



## Elementos de un Plan de Manejo de Alérgenos

- ✓ Evaluación del Riesgo
- ✓ Gestión de materias primas / Garantía del proveedor
- ✓ Validación y Verificación de limpieza
- ✓ Formación del personal
- ✓ Etiquetado
- ✓ Segregación / Programación de la producción
- ✓ Verificación (producto final)
- ✓ ... **Análisis**

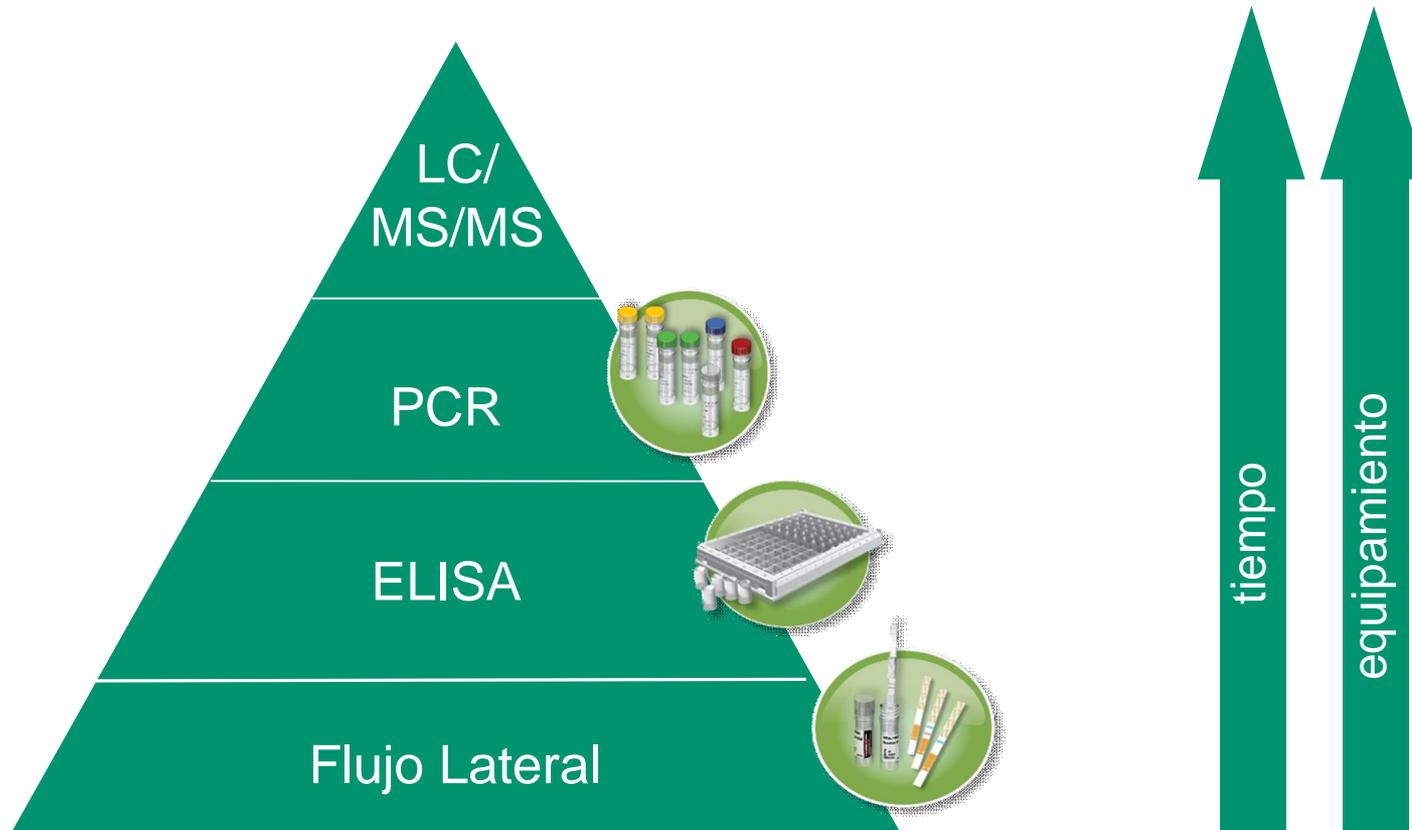
## Alérgenos alimentarios: análisis

El mayor desafío es el ... Análisis de Alérgenos!

- ✓ El análisis de **materias primas** de una porción de torta es muy fácil
- ✓ Pero el análisis de la misma **porción de torta** no lo es...
  - El procesamiento puede cambiar la estructura molecular (los alérgenos son proteínas...)
  - Los alérgenos pueden:
    - estar distribuidos en forma no homogénea
    - ocurrir en muy bajas concentraciones (ppm / ppb)
    - ser difíciles de extraer
    - y ... se pueden obtener resultados erróneos



## Análisis de Alérgenos: Tecnologías disponibles

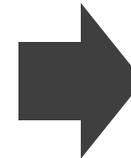


## Análisis de Alérgenos: Tecnologías disponibles

Tecnologías



LC – MS/MS



Tecnología en desarrollo



Para investigación,  
no para control

# Análisis de Alérgenos: Tecnologías disponibles en plantas elaboradoras

Tecnologías



LFD

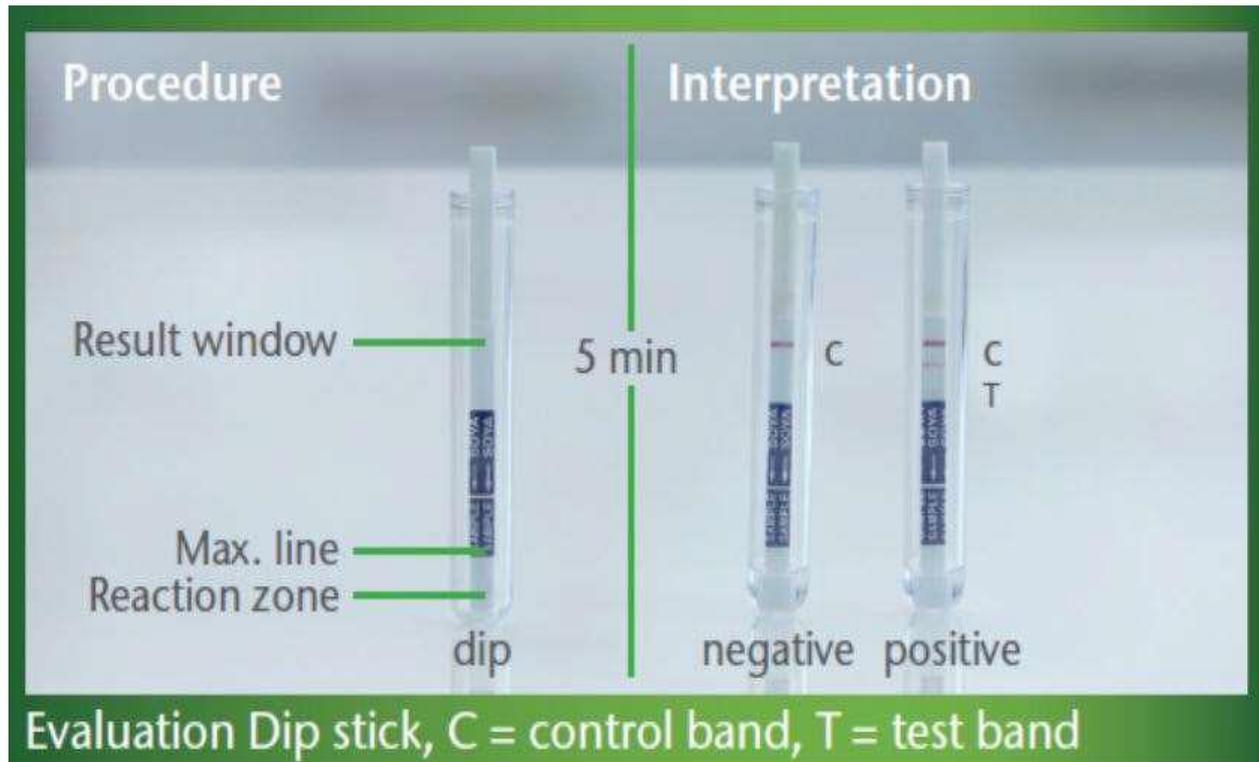


ELISA



PCR

## Tecnologías disponibles: LFD



## Tecnologías disponibles: LFD



Ventajas:

análisis in-situ, resultados rápidos, fáciles de utilizar  
poco entrenamiento, sensible

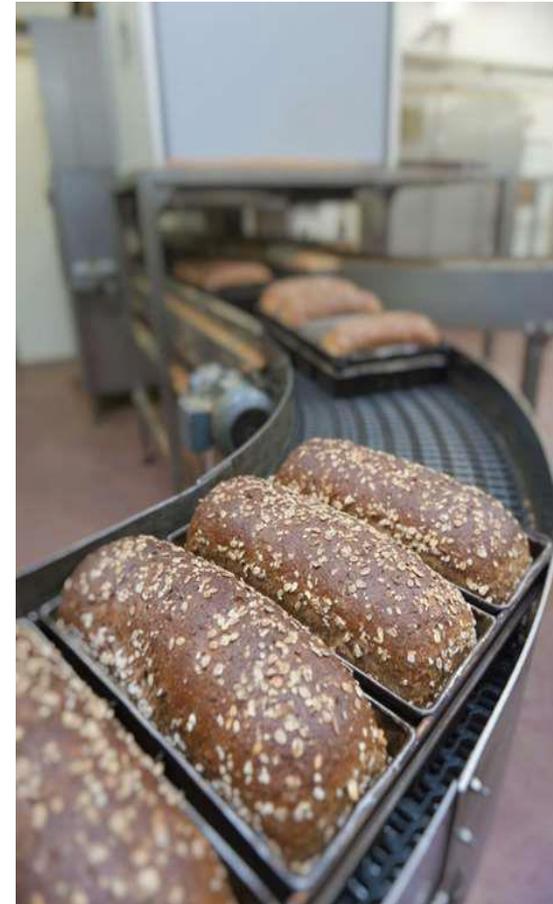
Desventajas:

efectos de matriz, reacción cruzada, dificultades con  
alimentos altamente procesados, resultados cualitativos

## Tecnologías disponibles: LFD

### Verificación de limpieza

- ✓ Luego de cambiar lotes (los previos con alérgeno específico)
  - Tener especial cuidado con los "bolsillos ocultos" de productos (anteriores) en su línea de producción
  - Tomar la ubicación de su hisopado en cuenta: ¿Está analizando "materias primas" o "productos terminados"?
- ✓ Comprobar el agua de enjuague después de la limpieza
  - Pero tenga en cuenta que su resultado puede estar influenciado por detergentes

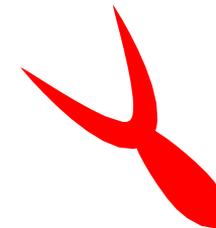


## Tecnologías disponibles: ELISA

Llave  
(antígeno/analito =  
proteína alergénica)



Epítotope  
(sitio de unión)



Cerradura  
(anticuerpo)

## Tecnologías disponibles: ELISA



### Ventajas:

resultados cuantitativos, detección directa del antígeno, ideal para muchas muestras (automatizable), fácil, altamente específico, sensible

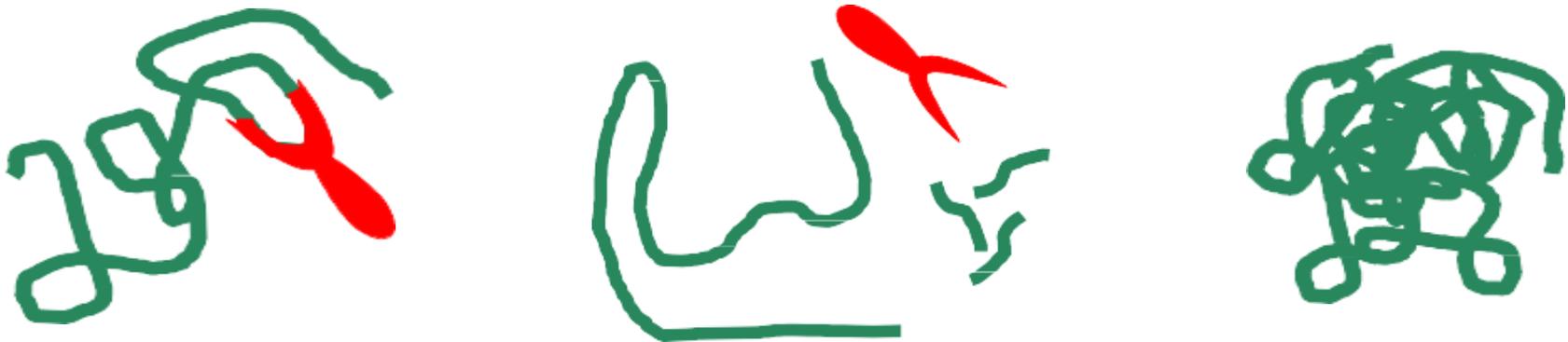
### Desventajas:

efectos de matriz, reacción cruzada, dificultades con alimentos altamente procesados

## Tecnologías disponibles: ELISA

ELISA: posibles peligros a tener en cuenta

- ✓ Sustancias interferentes: ej. Polifenoles (especias, cacao, etc.)
- ✓ Procesos térmicos / químicos (cocción, hidrólisis, etc.)

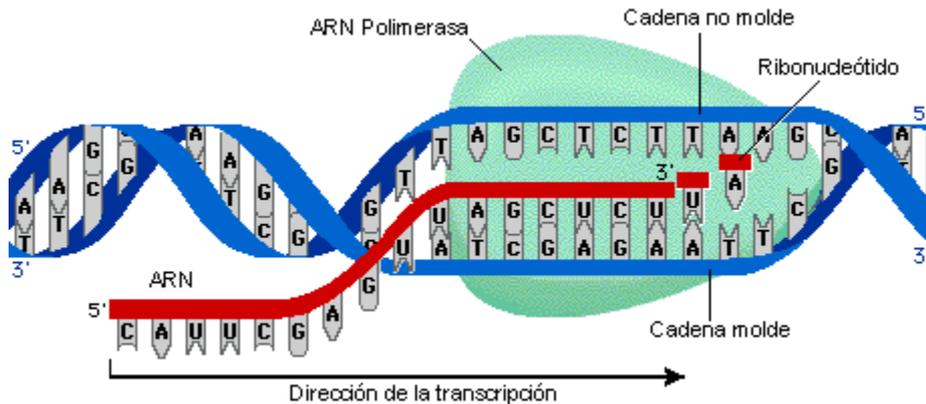
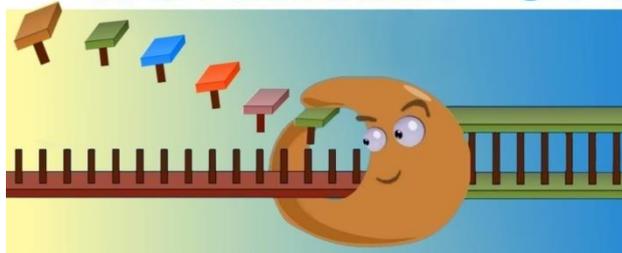


Proteína nativa → Procesada

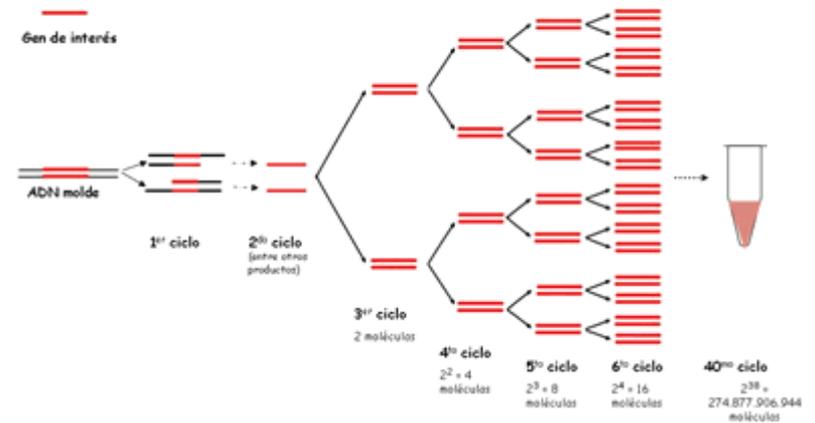
- Cambios en la forma de la proteína
- Fragmentación o agregación
- Reacciones químicas (ej. Maillard)

# Tecnologías disponibles: PCR

## Reacción en cadena de la Polimerasa PCR



### Amplificación exponencial de la PCR



## Tecnologías disponibles: PCR



Ventajas:

altamente específico, se puede utilizar en productos altamente procesados, resultados cuantitativos, muy sensible, posibilidad de multiplexing

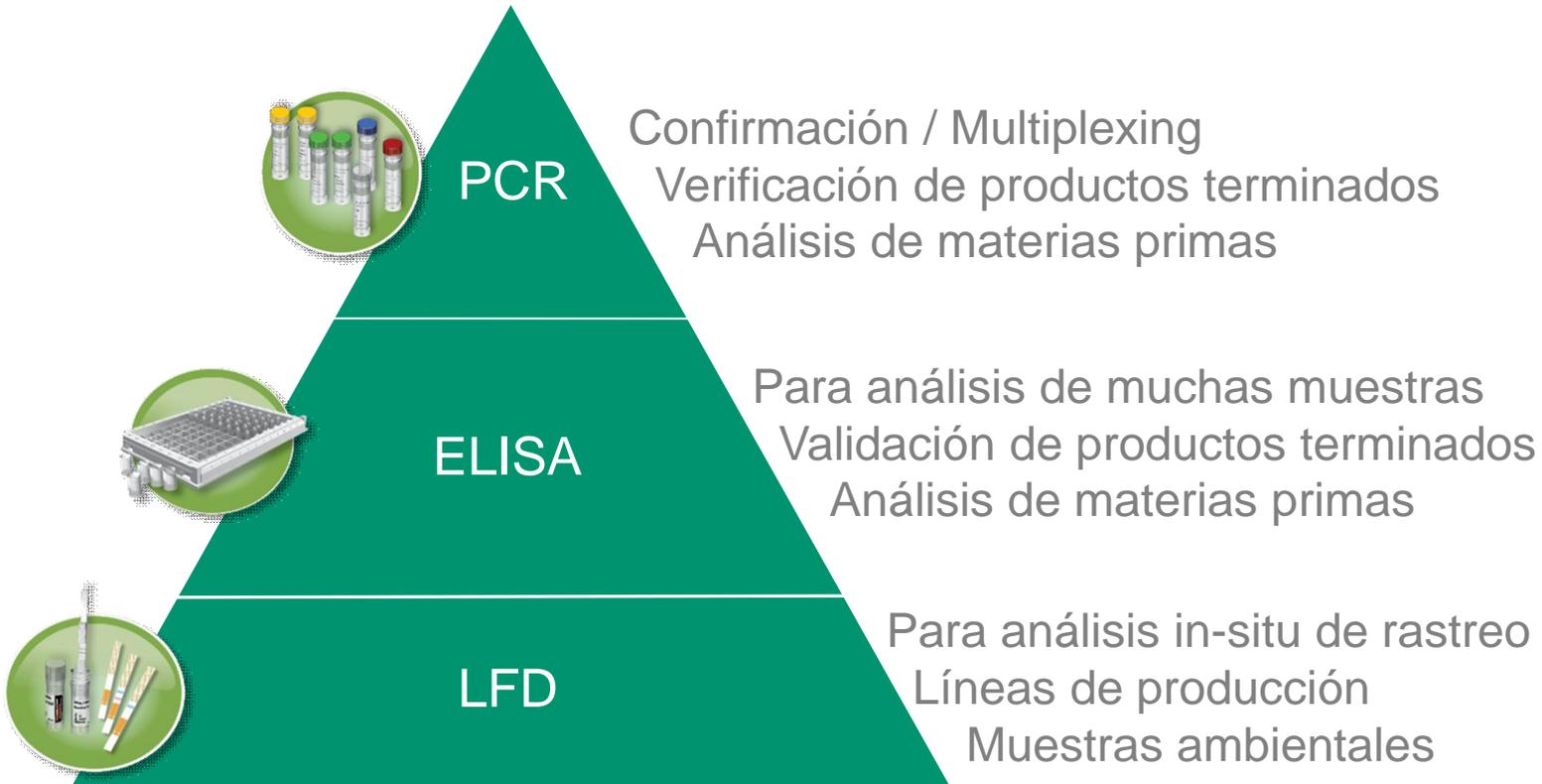
Desventajas:

Detección indirecta (ADN), más laborioso, personal muy entrenado, puede haber inhibidores de la PCR

## Análisis de Alérgenos Alimentarios

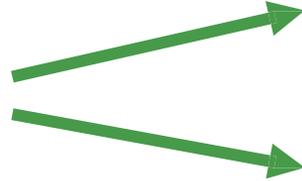
Qué método elegir?

✓ Elija el método que cumpla con sus necesidades!!!



## Necesidades del análisis en planta

Tipo de ensayo

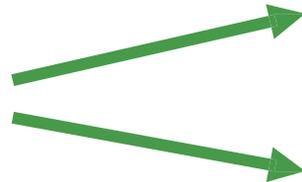


Eficiencia de limpieza en líneas de producción

Análisis de producto



Tipo de resultado

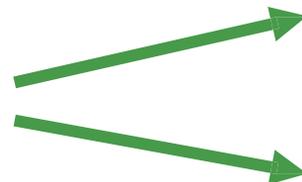


Cuantitativo

Cualitativo



Sensibilidad



Lo más sensible posible

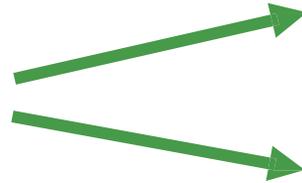
Valor de cut-off

Analice diferentes proveedores



## ¿Número de muestras y laboratorio?

Número de muestras



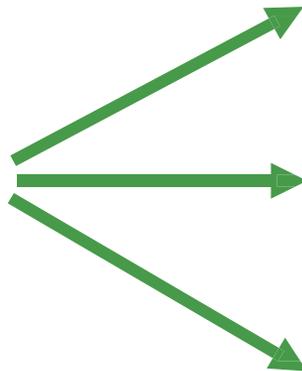
Una o muy pocas



Rastreo de muchas muestras



Estructura del laboratorio



Altamente equipado



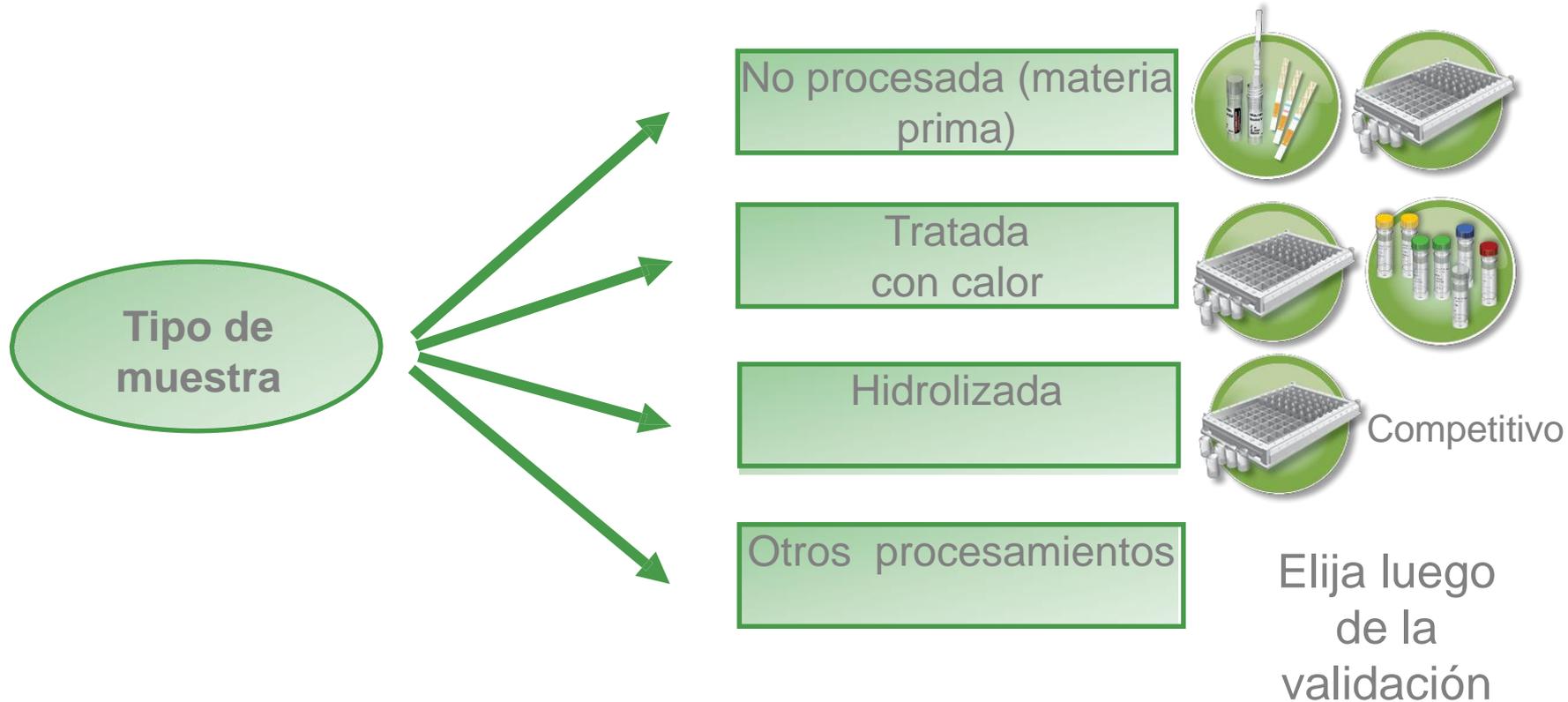
Medianamente equipado



Ningún equipamiento en el laboratorio



## ¿Qué tipo de muestra?



## Análisis de Alérgenos Alimentarios

Qué método elegir?

✓ Puede elegir un método validado y certificado por un tercero...



RIDASCREEN® Gliadin , RIDASCREEN® Gliadin competitive and RIDA® QUICK Gliadin son AOAC OMA (2012.01, 2015.05 and 2015.16)

✓ Pero siempre tiene que validar que el método es adecuado para su laboratorio (analito, matriz, especificidad requerida)

➔ Validar el método elegido!!!

## Validación: Preparación de muestra

La validación de un método incluye la **Preparación de muestra**

- ✓ Usar Clean-up apropiado a la muestra
  - Determinar sustancias interferentes, inhibitorias
    - Ej. Polifenoles, inhibidores de la PCR, etc.
  - Determinar si el alérgeno (proteína) está asociado a otras sustancias
    - Ej. Hidratos de carbono, otras proteínas, etc.
    - Utilizar solución de extracción apropiada



# Validación: Recuperación

## La validación de un método incluye **Recuperación del analito**

### ✓ Importancia de los Materiales de referencia

442 ABBOTT ET AL.: JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL VOL. 93, NO. 2, 2010

**SPECIAL SECTION ON FOOD ALLERGEN TESTING**

### Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices

MICHAEL ABBOTT, STEPHEN HAYWARD, WILLIAM ROSS, and SAMUEL BENREJEB GODEFROY  
 Health Canada, Food Directorate, Health Products and Food Branch, PL 2201C, Ottawa, ON, Canada, K1A 0L2  
 FRANZ ULBERTH and ARJON J. VAN HENGEL  
 European Commission, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements, Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgium  
 JAMES ROBERTS  
 National Measurement Institute, Department of Innovation, Industry, Science and Research, 1 Suakin St, Pymble  
 HIROSHI AKIYAMA  
 National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan  
 BERT POPPING  
 Eurofins Scientific, 69a Kilnwick Rd, Pocklington Yorkshire, YO42 2JY, United Kingdom  
 JUPITER M. YEUNG<sup>1</sup>  
 Nestlé Nutrition, Product Technology Center—Fremont, 445 State St, Fremont, MI 49413-0001  
 PAUL WEHLING  
 General Mills, Inc., 330 University Ave SE, Minneapolis, MN 55414  
 STEVE L. TAYLOR  
 Food Allergy Research and Resource Program, University of Nebraska, Lincoln, NE  
 ROLAND ERNEST POMS  
 ICC—International Association for Cereal Science and Technology, Vienna, Austria  
 PHILIPPE DELAHAUT  
 CER Groupe—Laboratoire d’Hormonologie, Rue du Point du Jour, 8, B-6-900 Marloie, Belgium

448 ABBOTT ET AL.: JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL VOL. 93, NO. 2, 2010

**Table 6. Example of (S<sub>R</sub>) modeling**

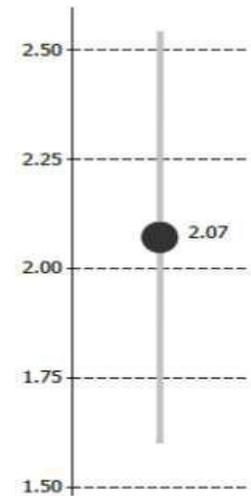
Level	Mean	S <sub>R</sub>
0	0.039553	0.26918
0.5	0.612395	0.350308
1.0	0.882414	0.535725
2.5	2.395355	0.580356
5.0	4.693936	0.913203

**Reference materials.**—Choosing a reference material for use in an allergen method validation can be extremely challenging. A perfect representative material rarely exists. Different species of the same food commodity may have different protein profiles. Processing methods can also drastically affect protein content, conformation, solubility, and reactivity. In general, a reference material is representative of

samples can be difficult and costly to obtain, particularly in larger quantities required for a validation study.

Because of these limitations, validation studies using samples with food allergens added to them after manufacturing (spiked samples) are still considered an acceptable way to generate information about the performance of a method in specific matrixes. However, spiked samples may result in an artificially higher recovery than would be obtained from incurred samples; hence, some regulatory bodies may be unwilling to consider approval of validation data without the inclusion of data generated with incurred samples prepared with known and controlled amounts of the reference material for the allergen being targeted.

There are several ways to prepare spiked samples. One way involves the preparation of a large batch of a food sample that contains a specific food allergen, then gradual dilution of the allergen by mixing with more of the food sample that does not contain the allergen. This kind of sample preparation works best for samples that can be mixed well in an attempt to reach



## Validación: Materiales de Referencia

### Materiales de Referencia para Alérgenos Alimentarios de MoniQA

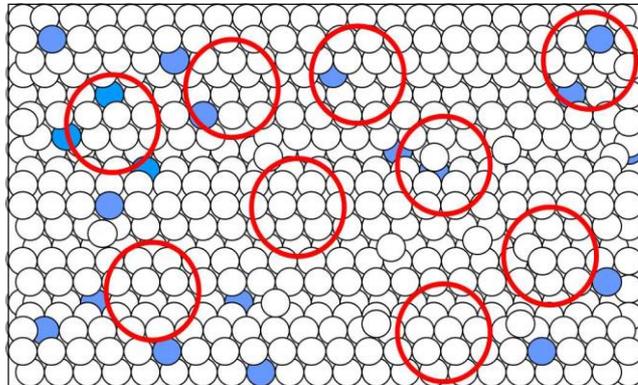
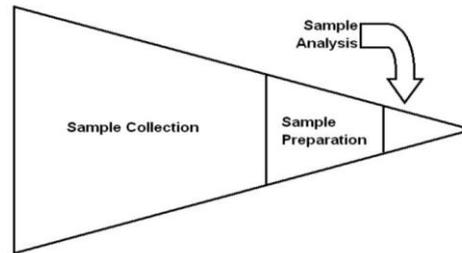
- ✓ Disponibles actualmente:
  - **Control positivo:** leche en polvo descremada, caracterizada. Se puede utilizar para fortificación (spiking)
  - **Material Blanco:** Galleta molida, libre de Gluten, leche, huevo, soja, maní, frutos secos. Se puede utilizar de Blanco
  - **Material de Baja concentración:** Galleta molida, libre de Gluten, fortificada con 5 ppm de leche en polvo descremada
  - **Material de Alta concentración:** Galleta molida, libre de Gluten, fortificada con 50 ppm de leche en polvo descremada



## Validación: Toma de muestra

Mucho más importante: **Toma de muestra!!**

- ✓ Los alérgenos pueden estar distribuidos en forma no homogénea
- ✓ Pueden estar en muy bajas concentraciones (ppm)



## Toma de muestra

Pensando en la toma de muestra:

✓ ¿Es una buena idea que los consumidores analicen alimentos?



✓ No es aconsejable que los consumidores analicen alimentos para presencia de alérgenos.....

## Conclusiones

- Diferentes técnicas en el mercado
- El usuario necesita decidir que tipo de técnica es apropiada para sus muestras (pregunte al proveedor de los kits)
- Controle por validación externa (ej. AOAC)
- Es necesario validar la dupla analito-matriz en el propio laboratorio
- La elección del método depende del tipo y número de muestras y del ambiente de ensayo



