

DETERMINACION DE ALERGENOS EN ALIMENTOS

INTRODUCCION

¿Qué es un ALERGENO ALIMENTARIO? Son proteínas o glicoproteínas presentes de forma natural en los alimentos tanto de origen animal como vegetal.

No hay que confundir ALERGENO ALIMENTARIO con INTOLERANCIA ALIMENTARIA.

Las proteínas alérgicas más conocidas son las siguientes presentes en las siguientes matrices:

ALIMENTO/MATRIZ	PROTEINAS TOTALES	PROTEINA ALERGICA
Leche	20% proteína del suero	β-lactoglobulinas α-lactoglobulinas
	80% caseína	α, β, κ, δ-caseínas
Huevo	11-13%	Ovomucoide Ovoalbumina Ovotransferrina Lisozima
Trigo (Gluten)	10-15%	α,β,δ,ω Gliadinas y Gluteninas
Soja	70%	Glicina β-Conglicina
Crustáceos	10 – 25%	Tropomiosina
Pescado	20-25%	Pervalbumina

Tabla 1.: Presencia de proteínas en alimentos que causan reacciones alérgicas.

Actualmente, hay cada vez más población con síntomas de alergia o intolerancia al gluten, es por ello que se legisla en forma de Reglamento Europeo, el etiquetado de los alimentos envasados o no en la cual se indique en la lista de ingredientes los alérgenos que contienen. Recientemente, aplicable a partir de junio de 2016, se reglamenta la información cuantitativa del contenido de gluten (20 – 100 mg/Kg).

Por todo ello, es importante el análisis de los alimentos en alérgenos y más allá de detectarlos sino cuantificarlos. Es un tema muy controvertido y hoy en día que no se tienen muy claro la cantidad de exposición de estas proteínas al ser humano que provocan dichas reacciones alérgicas.

Se necesitan equipos muy sensibles, de gran especificidad y reproducibles. En la actualidad en los laboratorios rutinarios de análisis de alimentos se utilizan dos tipos de técnicas: PCR y ELISA. Este artículo se basara en la técnica ELISA y la validación del método para el análisis de alérgenos y gluten en diversidad de matrices.

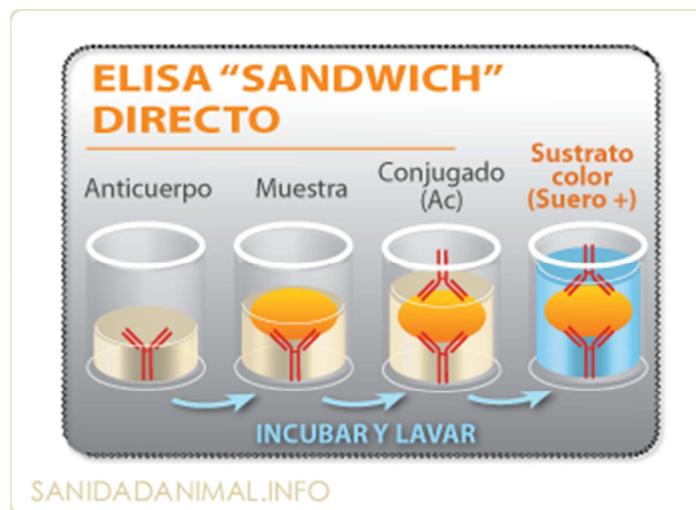
DETERMINACION DE ALERGENOS EN ALIMENTOS

ELISA (Enzyme – linked ImmunoSorbent Assay)

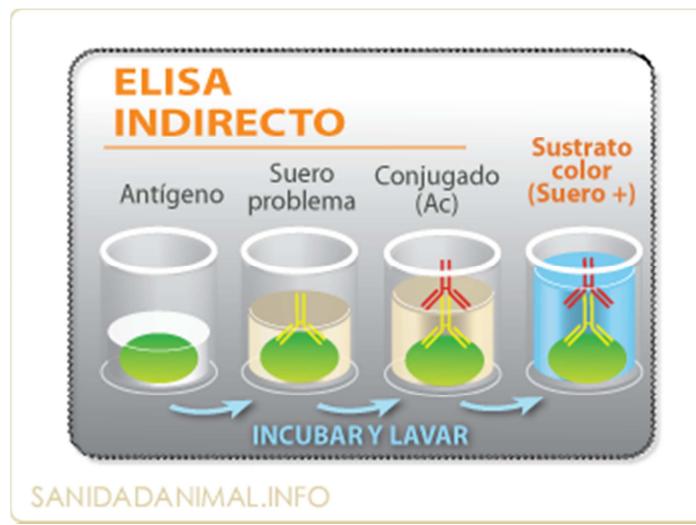
La técnica ELISA se basa en una reacción inmunoenzimática. Hay distintos tipos de ELISA pero lo que se está utilizando y comercializando es una reacción inmunoenzimática con adición de sustrato y determinación cuantitativa colorimétrica.

Entre todos los métodos ELISA concretamos dos determinaciones:

CASO A.: ANALISIS DE ANTIGENOS: ELISA – SANDWICH



CASO B.: ANALISIS DE ANTICUERPOS: ELISA-INDIRECTO



La selección del Kit Elisa es primordial, es por ello, que hay que comprobar antes, la validación del proveedor y estudiar su certificado en base a las siguientes variables:

- Matrices comprobadas.
- Método de Extracción
- Proteína detectada.
- Límite de detección.
- Límite de cuantificación.

DETERMINACION DE ALERGENOS EN ALIMENTOS

- Posibles Interferencias
- Rango de cuantificación.
- Función respuesta.
- Expresión de resultados

Una vez que se ha estudiado los certificados de validación del proveedor se deberá de realizar en el laboratorio una puesta en marcha, que conlleva a optimizar en el laboratorio el método, siguiendo estrictamente las pautas descritas en las instrucciones del fabricante.

FASE DE PREVALIDACION

La fase de prevalidación debe realizarse caso por caso en función de las necesidades. La validación previa debe garantizar que un método tiene un rendimiento que permite que llegue a una conclusión exitosa del estudio de validación, debe proporcionar pruebas de que el método resulta adecuado para la finalidad prevista.

ESTUDIO DE CUANTIFICACION DEL METODO

Se genera la curva típica trazando la densidad óptica (OD) en el eje y y la concentración de los estándares en el eje x, lo que da como resultado una curva de la respuesta cuadrática u otro modelo.

Para obtener un valor cuantitativo preciso, la DO de las soluciones de muestra debe corresponder a la porción lineal de la curva de calibración. Si la DO es demasiado alta la solución de muestra debe ser diluida hasta que la densidad óptica esté dentro del rango de cuantificación del ensayo. El resultado será corregido:

- Peso inicial de la muestra.
- Volumen de extracción.
- Factor de dilución.

APLICABILIDAD DEL ENSAYO

La elaboración de los alimentos llevará generalmente al deterioro o desnaturalización de la proteína diana, lo que puede dar lugar a un cambio sustancial en la inmunorreactividad. Se debe por tanto, probar las matrices más comunes que se analizan para observar su respuesta. Una solución sería dopar la muestra con la proteína diana en el rango de concentración objeto de estudio, por supuesto, antes de la extracción.

Los inmunoanálisis, los anticuerpos pueden presentar reacción cruzada con otras proteínas presentes en la matriz, por tanto, es necesario demostrar la selectividad. Se propone que al alimento, antes de aplicar la extracción, se dope con distintas proteínas (de leche, de trigo, etc) y se estudien las OD respuesta. Se deberán de variar las concentraciones.

ESTUDIO DE DOCUMENTACION VIGENTE

Es importante que incluso antes de la Fase de Prevalidación se tenga en cuenta toda la documentación que concierne a la determinación del alérgeno en las matrices objeto de estudio. Para ello, podemos mencionar diferentes fuentes de publicación interesantes:

- Legislación: AESAN
- Normas Internacionales: CODEX ALIMENTARIUS
- Normas Nacionales: AENOR, publicadas recientemente UNE EN 15842:2010, UNE-CEN/TS 15633-3:2013 EX.
- Instrucciones fabricante Kit Elisa
- Etc...

DETERMINACION DE ALERGENOS EN ALIMENTOS

FASE DE VALIDACION

ENSAYO CUANTITATIVO

El método Elisa común para proteínas, se mide la cantidad de la sustancia reportera procedente de una reacción enzimática. Se genera una curva típica trazando la densidad óptica (OD) en el eje y y la concentración de los estándares en el eje x. Para obtener un valor cuantitativo preciso, la DO de las soluciones de muestra debe corresponder a la porción lineal de la curva de calibración. Si la DO es demasiado alta, la solución de la muestra debe ser diluida hasta que la DO se encuentre en el rango de cuantificación.

Se puede utilizar diferentes controles para demostrar el rendimiento del ensayo:

- Introducirse en paralelo una muestra testigo.
- Pozo vacío.
- Solución tamponada

De esta forma se determina la respuesta inicial que se obtendrá de la muestra y la respuesta de calibración.

- Control negativo: introducir una muestra de extracción de la matriz de la que se sabe que no contiene analito

Con esto se demostrará las respuestas no específicas o los efectos de interferencia de la matriz que se producen en el ensayo.

- Control positivo o una extracción de la matriz incrementada con una cantidad conocida del analito.

Con esto se podrá demostrar la exactitud del método.

- Aplicar estándares y muestras en un número (no menor de 10).

Se evaluará con los resultados la precisión del método, además de introducir variaciones como distintas placas.

MATERIALES DE REFERENCIA

El material de referencia es la misma matriz que la muestra de análisis que va a ser objeto de ensayo. Se debe de utilizar materiales de referencia de control negativo y control positivo.

El material de referencia es imprescindible utilizarlo para evaluar si nuestro método cumple los reglamentos y los requisitos del ensayo.

En los casos en que los alimentos o los ingredientes de los alimentos están disponibles con o sin el analito, se puede preparar de una forma sencilla una muestra control con una proporción conocida del material diana. En otros casos puede ser complicado ya que la estabilidad y uniformidad son cuestiones importantes. Por ejemplo, si la matriz es una mezcla de materiales, se necesitará saber la mezcla y realizar un material con las mismas proporciones que la muestra inicial de ensayo, para poder dopar una cantidad conocida de proteína. La estabilidad de estos materiales debe ser evaluada en condiciones de almacenamiento y de ensayo.

VALIDACION

Son de aplicación para los ensayos de ELISA, los principios de validación del método definidos en la norma armonizada ISO/UIQPA/AOAC Los parámetros de validación de métodos cuantitativos comprenden:

DETERMINACION DE ALERGENOS EN ALIMENTOS

- Exactitud
- Selectividad
- Eficiencia de la extracción.
- Sensibilidad.
- Rango de cuantificación
- Precisión
- Aplicabilidad

✓ EXACTITUD:

Se mide la recuperación del analito procedente de muestras complementadas y se expresa como la recuperación media en varios niveles del rango cuantitativo.

La recuperación se determina comparando el valor conocido con el asignado. La recuperación debe situarse en el rango: 70 – 120%.

La eficiencia de la extracción se podría poner de manifiesto con la recuperación del analito de la proteína diana a partir de cada tipo de fracción del alimento mediante extracción exhaustiva, es decir, la extracción repetida de la muestra hasta que no se detecta más proteína.

✓ PRECISION INTERMEDIA:

La precisión describe el grado de variación que se produce en el mismo. Se puede determinar evaluando la variación entre replicas (%CV) en varias concentraciones de la curva típica y en la variación derivada de los valores de absorción en estándares de ensayos independientes realizados en fechas diferentes (RSDr). La precisión entre ensayos describe la variación que tiene lugar entre ensayos diferentes y que se puede medir analizando las muestras de control de calidad de cada microplaca. Las muestras de control de calidad necesarias se componen de dos conjuntos de extracciones, una extracción de muestras que contiene el analito diana y una de las muestras de control. Si la proteína es estable en el extracto, puede almacenarse congelada. Posteriormente, se descongelaría una porción y se sometería a ensayo en cada microplaca.

La precisión del ensayo se puede evaluar a lo largo del tiempo y se expresa como porcentaje del coeficiente de variación.

La desviación típica de repetibilidad relativa (RSDr) debería ser <25%.

La desviación típica de la reproducibilidad relativa (RSDR) deberá ser <35%

La concentración de la disolución o linealidad se utiliza para evaluar que el ensayo pueda dar resultados equivalentes independientemente del punto en el que la densidad óptica de las muestra se interpola en el rango cuantitativo de la curva típica. A fin de realizar estos experimentos en condiciones ideales las muestras que den positivo para la proteína diana se diluyen de tal manera que en por lo menos tres disoluciones se obtengan valores que cubran el rango cuantitativo de la curva.

El coeficiente de variación de los resultados ajustados de varias disoluciones de un solo extracto de la muestra debería ser ≤ 20% en condiciones ideales.

✓ LIMITE DE DETECCION Y LIMITE DE CUANTIFICACION:

Límite de Detección (LOD): Para estimar el límite de detección lo habitual es asumir la señal de una muestra testigo aumenta 3 veces la desviación típica de la muestra testigo. Es una estimación basada en una distribución gaussiana típica de las mediciones de la muestra testigo alrededor del cero. Pero también habrá que comprobarlo mediante experimentos.

Límite de Cuantificación (LC): Se debe de comprobar en matriz el LC.

✓ REACTIVIDAD CRUZADA: La reactividad cruzada es el grado en que los análogos u otras moléculas pueden unirse a los anticuerpos de la detección. Este concepto debería clasificarse y describirse en el método. La falta de

DETERMINACION DE ALERGENOS EN ALIMENTOS

reactividad cruzada debería evaluarse mediante resultados experimentales extraídos de la comprobación del método con proteínas o moléculas de especies/variedades no diana y estrechamente relacionadas, así como de proteína diana purificada o de materiales de referencia positivos de control. La posibilidad de que se produzcan interferencias causados por reactivos y material de laboratorio se puede evaluar sometiendo a ensayo extracciones de material libre de analito.

- ✓ EFECTOS DE LA MATRIZ: Si la respuesta del método se ve afectada por una sustancia en la extracción final, aparte del del analito proteico concreto, la respuesta no específica recibe el nombre de efecto matriz. Una manera de gestionar los efectos de la matriz consiste en demostrar que el método analítico arroja resultados similares con o sin la matriz de muestra presente en la extracción. Con este enfoque se debe demostrar la ausencia de efectos de la matriz en todas las matrices en las que se vaya a aplicar el ensayo.

ESTIMACION DE INCERTIDUMBRE

Una vez finalizado el proceso de validación con los datos obtenidos de los parámetros antes indicados se deberá de estimar la incertidumbre asociada a cada variable y en el rango de concentraciones validado. El resultado se deberá EVALUAR si es coherente y cumple las expectativas establecidas para el ensayo.

CONTROLES DE CALIDAD INTERNOS

Con la parametrización estadística obtenida se deberá de definir los controles de calidad internos, asegurando que los resultados son conformes a lo largo del tiempo. Se debe de planificar un plan de control de calidad periódico y EVALUACION de resultados.

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO

El control de calidad externo se deberá de realizar para asegurar que la exactitud del método se sigue cumpliendo y para ello es necesaria la comparación con otros laboratorios externos. Se debe planificar una participación periódica en ejercicios de intercomparación y una EVALUACION de estos.

ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

Para asegurar los resultados es imprescindible un control de los equipos tanto humanos como instrumentales. Recursos humanos, asegurar una cualificación periódica y en equipos instrumentales realizar y definir tanto actividades de mantenimiento, verificación como calibración.

CONCLUSION

El método ELISA es un método analítico como otro cualquiera con sus peculiaridades. El problema que siempre existirá será EL EFECTO MATRIZ con lo que nos hace preguntarnos:

¿Qué matrices son tan importantes en nuestro laboratorio como para validar y sea ECONOMICAMENTE factible y viable?