

## **Métodos Analíticos para Detección de Alérgenos Alimentarios**

Autor: Diego Novoa, Area Manager Romer Labs.

La elección del método debe considerar aspectos tales como; el propósito del análisis, el tipo de muestra, la matriz del alimento y su procesamiento, así mismo los requerimientos de personal, equipos e instalaciones, sin pasar por alto los costos y el tiempo que se tardara en obtener un resultado.

El Propósito: el monitoreo de limpieza requiere tan solo una prueba cualitativa, en cambio, una investigación o desarrollo de un nuevo producto va a requerir un análisis de tipo cuantitativo con un valor exacto de la concentración.

La Muestra: conocer qué tipo de muestra se va a analizar, si es un producto terminado, un producto en proceso, una reformulación de un producto al cual se le han reemplazado ingredientes, un nuevo producto en desarrollo, residuos de limpieza o aguas de enjuague. Así mismo, es importante saber el estado físico en el cual se encuentra la muestra, liquido, solido, en polvo, granulado o pastoso.

La Matriz: existen virtualmente infinitas matrices en los productos alimenticios, conocer la composición del alimento resulta de especial importancia, dado que se puede presentar reactividad cruzada y consecuentemente falsos positivos.

El Procesado: dado que los alérgenos son proteínas y se ven afectadas durante algunas etapas del procesamiento, como pueden ser la cocción y la fermentación que afectan su detección. Es importante conocer el proceso que tiene el alimento sobre el cual se va a realizar el análisis de alérgenos.

Finalmente, el tiempo y el costo de la prueba, muy relacionados entre sí. En el caso de un monitoreo de limpieza, se va a requerir un resultado en minutos, es decir, se necesita una prueba rápida. En el caso de un desarrollo de un nuevo producto, es posible esperar días o incluso semanas para obtener un buen resultado, haciendo uso de metodologías más precisas y específicas.

El costo no solo está relacionado con el valor de la prueba como tal, sino con la necesidad de otros equipos asociados, un laboratorio especialmente dotado, e incluso el tipo de personal, su conocimiento y el grado de especialización para realizar la prueba.

### **Principales Métodos Analíticos Específicos**

Este artículo considera únicamente las metodologías específicas, métodos no-específicos como ATP y proteína total no serán considerados. Actualmente, encontramos cuatro metodologías específicas disponibles en el mercado, tres de ellas

basadas en la detección de proteínas, como son el método ELISA, las tiras de flujo lateral y la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, estas tres metodologías detectan el alérgeno. Por su parte, la metodología de PCR está basada en la detección del ADN del alimento.

### **Ensayos de Inmuno-adsorción Enzimática ELISA**

Es una metodología inmunológica cuantitativa, se caracteriza por ser altamente específica dado que utiliza anticuerpos específicos para el alérgeno a analizar, además es también muy sensible. La metodología ELISA es la técnica de detección más ampliamente utilizada. Es adecuada para todo tipo de productos y muestras, se debe verificar que la matriz a analizar se haya incluido dentro de una validación previa. En lo referente a productos procesados, se debe tener en cuenta que los alérgenos son proteínas que se ven afectadas en su estructura durante el procesamiento, y dado que el ELISA está basado en la detección de la estructura, cualquier cambio en esta puede afectar la detección. Por lo cual, la recomendación es medir antes y después de la etapa del proceso para confirmar la detectabilidad.

Esta prueba se considera rápida, las pruebas de ELISA comunes toman cerca de 60 minutos para dar un resultado y algunas pruebas aceleradas toman alrededor de 30 minutos. La posibilidad de realizar múltiples muestras del mismo alérgeno de manera simultánea, hace que esta prueba sea más rápida e incluso la más económica. Un analista experimentado está en capacidad de realizar 20 o más pruebas de manera simultánea y requiere instrumentación básica para realizarla, como un lector de ELISA, además de algunos equipos para la preparación de muestra. La prueba debe llevarse a cabo dentro de un laboratorio y por personal entrenado. Una desventaja de las pruebas ELISA es que presentan variaciones entre marcas, es común tener diferentes resultados de una misma muestra realizada con pruebas de diferentes fabricantes, la razón principal es que cada compañía utiliza anticuerpos diferentes, así mismo existen diferencias entre las matrices y las condiciones de validación.

En conclusión, las pruebas ELISA se pueden utilizar para todo tipo de productos, desde ingredientes, productos terminados, fluidos de limpieza, hisopados de superficies, es ideal para la validación de métodos de limpieza en conjunto con las tiras de flujo lateral. Adecuada para las áreas de investigación y desarrollo y muy recomendada para pruebas rutinarias siempre que se tenga un alto número de muestras para analizar.

### **Dispositivos de Flujo Lateral LFD**

Conocidas también como tiras reactivas, es una metodología similar a ELISA, de tipo inmunológico altamente específica y sensible. La diferencia con ELISA es que las tiras son una prueba cualitativa, es decir, una respuesta positiva o negativa con respecto a un nivel de concentración del alérgeno en la muestra, ej. 1.0 ppm. Dependiendo del fabricante las tiras reactivas pueden funcionar para todo tipo de productos y muestras, son ideales para monitoreo de limpieza en líneas de producción analizando aguas de enjuague e hisopados de superficies visualmente limpias. No requiere instrumentación

y la prueba la puede realizar cualquier persona con un entrenamiento básico, por tanto, se puede realizar *in-situ* lo cual es su principal ventaja cuando se trata de análisis de limpiezas y productos en proceso dentro de la planta de producción. Además de ser muy rápida, puede tomar alrededor de 10 minutos para obtener un resultado. Dependiendo del fabricante, los kits de pruebas de tiras de flujo lateral son muy estables y no requieren temperatura de almacenamiento, por lo cual son ideales para almacenarse en condiciones generales cerca de la línea de procesamiento.

En conclusión, las tiras de flujo lateral se pueden utilizar para todo tipo de productos siempre que el resultado que se busque sea cualitativo, es decir, una confirmación de un resultado que se presume negativo, pueden analizarse materias primas y productos terminados, es ideal para monitoreo de limpieza y análisis de rutina. Deben incluirse dentro de la validación de limpieza junto con una metodología cuantitativa como puede ser ELISA.

### **Reacción en Cadena de Polimerasa PCR**

La PCR es una metodología de análisis cualitativa y cuantitativa, basada en la detección de ADN. Aunque ofrece alta especificidad no detecta proteínas, esta es una gran diferencia con respecto a las metodologías inmunológicas. Al ser un método de detección de ADN presenta la desventaja que no puede diferenciar ADN de alimentos procedentes del mismo animal, esto significa que no puede diferenciar presencia de proteínas de carne de ganado vacuno, que es una proteína no alergénica, de la presencia de proteínas de leche de vaca que, si lo es, este aspecto debe tenerse siempre presente cuando se esté usando la PCR para detección de alérgenos en alimentos.

La PCR soluciona el problema de la reactividad cruzada, siendo la única alternativa al método ELISA para matrices que presentan este tipo de complicación. Adicionalmente, se puede utilizar para detección de alérgenos que no son detectables por las metodologías inmunológicas como lo es el apio, y para análisis que no ofrecen resultados confiables, como las proteínas hidrolizadas, dado que su estructura se ve afectada durante el procesamiento. El tiempo que toma realizar este tipo de análisis es entre 2 a 3 horas, no obstante, se pueden analizar múltiples alérgenos de manera simultánea. No es una metodología recomendada para análisis rutinario además porque requiere un laboratorio, instrumentación y personal altamente capacitado para ejecutar la prueba. Para el análisis cuantitativo requiere estándares de calibración.

En conclusión, la PCR es una metodología para análisis de materias primas, producto en proceso y producto terminado, ideal para muestras que presentan reactividad cruzada, y no es recomendable para análisis rápido de rutina.

### **Espectrometría de Masas LC-MS/MS**

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas es una técnica basada en la separación y detección de péptidos y proteínas, ampliamente usada en análisis químico, sensible y eficiente. Tiene la gran ventaja de detectar el peso de la molécula y

no la estructura, lo cual la hace ideal para alérgenos que se vean afectados por el procesamiento. La cromatografía se utiliza para detección de múltiples analitos en un solo ensayo, se habla de decenas o incluso centenares de compuestos separados y detectados en un solo análisis, esta ventaja es única y prometedora para el campo de los alérgenos en alimentos.

El espectrómetro de masas se clasifica como tecnología de alta complejidad y de muy alto costo, así mismo, requiere un laboratorio bien dotado, personal altamente capacitado y con conocimientos especializados en esta técnica. Los laboratorios de análisis a terceros, se perfilan como potenciales usuarios de esta tecnología para el análisis de alérgenos, dado que ya cuentan con las instalaciones, la instrumentación, el personal y ofrecen actualmente análisis como micotoxinas y pesticidas, únicamente requerirían la implementación y validación de la metodología específicamente para análisis de alérgenos. No obstante, existe una razón por la cual no se ha desarrollado más la técnica de LC-MS/MS para alérgenos, y es la escasa disponibilidad de estándares de calibración, esta es de momento una barrera para el uso de esta tecnología.

En conclusión, la espectrometría de masas puede ser usada para análisis de todo tipo de muestras y productos principalmente con fines de investigación y desarrollo, aun no se recomienda para análisis de rutina.

**Tabla 1. Comparativo de metodologías para detección de alérgenos.**

<b>Método</b>	<b>ELISA</b>	<b>LFD</b>	<b>PCR</b>	<b>LC-MS/MS</b>
Principio	inmunológico	inmunológico	molecular	espectrometría de masas
Detecta	proteína	proteína	ADN	péptidos
Costo	medio	medio	alto	muy alto
Tiempo	intermedio	corto	largo	largo
Labor	intermedia	baja	alta	alta