

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES DE PROCESO EN LA FABRICACIÓN DE GALLETAS
COMERCIALES SOBRE LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS ALÉRGENOS LECHE Y HUEVO
MEDIANTE PRUEBAS ELISA

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en
Ciencia de Alimentos para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencia de
Alimentos

CINDY MARÍA HIDALGO VÍQUEZ

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2021

Dedicatoria

En primer lugar, a Dios porque siempre me ha bendecido.

A **Steven, Clau, Ale y Nacho**, que han sido mi motor en este tiempo y que siempre me han apoyado en TODO. Los amo.

A mi red de apoyo, que sin ellos esto no hubiera sido nunca posible para una mamá de 3 hijos: A **MAMI** que en los momentos más difíciles me aconsejó sabiamente, **Papi, Maraya, Mapa, Tita, Tito, Roger, y Blondy**. Y mi sobrino **Andrés**. Gracias por estar siempre ahí.

También le dedico este trabajo a todas las personas que viven con alergias alimentarias, espero que estos resultados aporten un granito de arena para mejorarles su calidad de vida.

Agradecimientos

En primer lugar, a mi comité Asesor, la **profe Rebeca** además de contribuir con mi formación profesional, ha sido un gran ejemplo de humildad, solidaridad, amistad y trabajo. **Adrián** y la **Profe Jacqui** siempre me apoyaron y me guiaron con sabiduría, me retaron de forma asertiva y siempre me sentí acompañada en este proceso y **Jazmín** que inició este proceso conmigo y por cosas de la vida no pudo continuar. A la compañía **Pozuelo**, por financiar este proyecto y querer mejorar sus productos.

Y como me dijo alguien por ahí... “siempre hay almas caritativas que le ayudan a la gente que está haciendo tesis”, pues tuve varias almas caritativas en este proceso:

Carolina Cortes, Caro por ser incondicional en este proceso.

Eric Wong, que me ayudo a aterrizar y además me brindó de forma desinteresada y sincera toda su sabiduría en la parte estadística.

Lourdes Chacón, que hubiera hecho sin Lourdes, que fue mi guía en la empresa. No tengo como agradecerle.

Andrea Chacón, cómo aprendí de Andrea, ahora soy toda una experta en pruebas ELISA gracias a ella y a María Jesús que inició en el mundo de los ELISA.

A la **profe María Lourdes**, que siempre estuvo pendiente como directora de posgrado de mis avances. Al Dr. **Olman Riggioni** que me guio y ayudó con toda su experiencia a entender la situación de las alergias alimentarias en el país.

A mis amigas de la maestría Jessica, Massiel, Eve, Caro Villalobos y mis amigas de la vida doña B y la profe Anne que siempre me alentaron, especialmente en los momentos más difíciles.

A los compañeros y amigos del proyecto, la comisión y la red de alergias alimentarias, de todos he aprendido mucho. A todos los profesores del posgrado, gracias a ustedes soy un antes y un después profesionalmente hablando.

Considero que una graduación es un logro social, en mi caso más porque toda mi educación la recibí por medio del Sistema de Educación Pública de Costa Rica (kínder, escuela, colegio, universidad y posgrado); por tanto, también le dedico este logro a las personas que son honradas en el pago de impuestos y a los funcionarios del sistema de educación pública que hacen su mejor trabajo, GRACIAS porque gracias a esto estoy donde estoy. A todos mis maestros y profesores desde el kínder hasta la Universidad, llegar a este punto es una construcción de muchos años.

“Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencia de Alimentos”

Dra. María Lourdes Pineda Castro, M.Sc.

Representante de la Decana del Sistema de Estudios de Posgrado

M.Sc. Rebeca López Calvo

Directora

MIA. Adrián Roda Brenes

Asesor

M.Sc. Jacqueline Aiello Ramírez

Asesor

M.Sc. Manuel Montero Barrantes

Representante de la Directora del Programa de Posgrado en Ciencia de Alimentos

Cindy María Hidalgo Víquez

Sustentante

Tabla de contenido

Dedicatoria	ii
Hoja de firmas	iii
Tabla de contenido	iv
Resumen.....	vi
Lista de Cuadros	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de abreviaturas	ix
Capítulo 1. Introducción.....	1
Capítulo 2. Marco teórico.....	3
2.1 Alergias alimentarias	3
2.1.1 Leche	10
2.1.2 Huevo	12
2.2 Detección y cuantificación de alérgenos.....	14
2.2.1 Métodos emergentes	14
2.2.2 Métodos basados en ADN.....	16
2.2.3 Métodos basados en reconocimiento de proteínas.....	18
2.3 Kits ELISA	19
2.3.1 Tipos de ELISA	21
2.3.2 Efecto del procesamiento en la detección y cuantificación de alérgenos con pruebas ELISA.....	24
2.3.3 Efecto de la formulación en la detección y cuantificación de alérgenos con pruebas ELISA.....	26
Capítulo 3. Hipótesis y objetivos	28
3.1 Hipótesis.....	28
3.2 Objetivo general.....	28
3.3 Objetivos específicos.....	28
Capítulo 4. Artículo 1.....	29
Título:.....	29
Resumen:.....	29
Palabras clave:.....	29
1. Introducción	30
2. Materiales y métodos	32
2.1 Materiales	32
2.2 Contaminación de las masas y elaboración de las galletas	33
2.3 Recolección y análisis de las muestras.....	35
2.4 Métodos ELISA	35
2.5 Análisis estadístico	38
3. Resultados	38
4. Discusión	41
5. Conclusiones	45
6. Agradecimientos	46
7. Referencias.....	46
Capítulo 5. Artículo 2.....	49
Resumen:.....	49

Palabras clave:.....	49
1. Introducción	50
2. Materiales y métodos	52
2.1 Materiales	52
2.2 Contaminación de las galletas.....	53
2.3 Recolección y análisis de las muestras.....	54
2.4 Métodos ELISA	55
2.5 Análisis estadístico	59
3. Resultados	60
4. Discusión	62
5. Conclusiones	67
6. Agradecimientos	68
7. Referencias.....	69
Capítulo 6. Observaciones generales	73
6.1 Contaminación de las galletas.....	73
6.2 Aspectos analíticos.....	74
Capítulo 7. Conclusiones y recomendaciones.....	74
7.1 Conclusiones	74
7.2 Recomendaciones	76
7.2.1 Para futuras investigaciones.....	76
7.2.2 Para la industria alimentaria y laboratorios	76
7.2.3 A nivel regulatorio	77
Capítulo 8. Bibliografía	78
Capítulo 9. Anexos.....	85

Resumen

Introducción: Las pruebas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas son los métodos más usados en Costa Rica y el mundo para la detección y cuantificación de alérgenos en alimentos. El procesamiento de los alimentos puede afectar la sensibilidad de los métodos analíticos y factores como la matriz alimentaria, la geometría o el tratamiento térmico pueden influir en la veracidad de los resultados obtenidos.

Metodología: Las galletas se elaboraron con formulaciones comerciales de una industria alimentaria y se procesaron en sus instalaciones. Se utilizó la galleta tipo cracker tradicional e integral para determinar el efecto de la formulación. La geometría se evaluó con dos moldes de galleta tipo cracker (tradicional y XL). El efecto del horneado se evaluó con la galleta tipo cracker tradicional. Se utilizaron tres kits ELISA sándwich comerciales diferentes. Para cada kit se siguió el protocolo establecido. Para todos los experimentos se tomaron muestras de 4 lotes y se analizaron dos réplicas con cada kit.

Resultados: Se observó un efecto matriz en el desempeño de los kits al comparar la cantidad de alérgeno detectada por cada kit en el material de referencia puro contra la masa cruda de galleta tipo cracker tradicional contaminada con ambos alérgenos ($P \leq 0.001$). Para el alérgeno leche, este efecto se encontró en los kits de R-Biopharm y 3M, en el kit de Veratox la subestimación en la cuantificación fue igual tanto en el material de referencia como en la masa. En cuanto a huevo, el efecto matriz se encontró para los kits de 3M y Veratox, el de R-Biopharm tuvo la misma tendencia en cuanto al material de referencia y la masa cruda. Para el efecto de la formulación sobre la cuantificación de leche, se encontró una diferencia significativa ($P=0.0128$) en la interacción del tipo de galleta y el kit. Se encontró que el kit de R-Biopharm detecta en forma diferente el alérgeno en las formulaciones evaluadas ($P=0.004$). Sobre el efecto de la formulación en la cuantificación de huevo se encontró una diferencia significativa ($P=0.0451$) entre los porcentajes de cuantificación para las dos formulaciones, en los tres kits. Hay un efecto de la geometría sobre la cuantificación de huevo ($P=0.0228$), independientemente del kit. No se encontró diferencia significativa en la cuantificación de leche según la geometría ($P=0.4335$), ni en el tipo de galleta según el kit utilizado ($P=0.4302$). El efecto del horneado se presenta por igual independientemente del kit utilizado ($P=0.4245$) para huevo. La cuantificación de huevo posterior al horneado es entre 4 y 5 de la concentración inicial. No se encontró diferencia entre los kits ($P=0.1682$) para leche posterior al horneado, lo que se debe a la alta variabilidad de los datos entre los kits.

Conclusiones: El efecto de la formulación se puede presentar en algunos kits para la cuantificación del alérgeno leche y en todos los kits estudiados para el caso del alérgeno huevo, posiblemente por la presencia de fibra en la galleta tipo cracker integral. El efecto del procesamiento, especialmente el del tratamiento térmico, es una de las limitaciones de estos kits para lograr detectar la cantidad real de los alérgenos en los alimentos. Es muy importante evaluar el desempeño analítico de un método con la matriz que se quiere analizar para conocer si es adecuado. Se hace necesario poder contar con otras opciones de métodos como PCR y masas para realizar análisis confirmatorios o más exactos.

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Principales características de las proteínas de las familias de origen vegetal.....	¡Error!
Marcador no definido.	
Cuadro 2. Principales características de las proteínas de las familias de origen animal.....	¡Error!
Marcador no definido.	
Cuadro 3. Caracterización de las proteínas alérgenos de la leche de vaca según la nomenclatura de alérgenos de la Organización Mundial de la Salud y la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS)	11
Cuadro 4. Características, ventajas y alérgenos para cada uno de los métodos basados en PCR ...	17
Cuadro 5. Características de los kits comerciales de ELISA para análisis de leche y huevo utilizados para el experimento.	36
Cuadro 6. Porcentaje de recuperación e intervalo de confianza para la caracterización de cada kit con el material de referencia	39
Cuadro 7. Porcentaje de recuperación para cada kit entre el material de referencia y la masa cruda de galleta tipo cracker tradicional contaminada	39
Cuadro 8. Porcentaje de cuantificación de los alérgenos leche y huevo para las formulaciones de galleta tradicional y galleta tipo cracker integral.....	40
Cuadro 9. Características de los kits analíticos utilizados para la determinación de los alérgenos leche y huevo.	57
Cuadro 10. Promedios e intervalos de confianza de los porcentaje de cuantificación de los alérgenos huevo y leche con respecto a la masa cruda contaminada para las galletas con geometría tradicional y con geometría XL.	60
Cuadro 11. Promedios e intervalos de confianza de la diferencia en el porcentaje de cuantificación entre los momentos del proceso (masa cruda y galleta horneada) para los alérgenos leche y huevo.....	61
Cuadro 12. Porcentaje de cuantificación de los alérgenos huevo y leche con respecto a la masa cruda contaminada para los cuatro lotes de galletas tipo cracker tradicional, Integral y molde XL por kit.....	90
Cuadro 13. Diferencia en el porcentaje de cuantificación entre los momentos del proceso (masa cruda y galleta horneada) para los alérgenos leche y huevo para los cuatro lotes de galletas tipo cracker por kit.....	91

Índice de Figuras

Figura 1. . Pasos genéricos para efectuar análisis ELISA en alimentos.....	21
Figura 2. Esquema de ELISA directo.	22
Figura 3. Esquema de ELISA indirecto.	22
Figura 4. Esquema de ELISA “sándwich”.	23
Figura 5. Esquema de ELISA competitivo.	24
Figura 6. Contaminación de las galletas con una gota de la solución de leche y huevo.	34
Figura 7. Pasos genéricos para efectuar análisis ELISA en alimentos.....	55
Figura 8. Moldeado de galletas en la línea de producción de acuerdo con su geometría.....	63

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
ELISA	Ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas
AA	Aminoácidos
IgE	Inmunoglobulina E
CBA	Canasta Básica Alimentaria
IUIS	Organización Mundial de la Salud y la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas
ALA	α -lactalbumina
LF	Lactoferrina
BSA	Seroalbúmina bovina
Ig	Inmunoglobulinas
APLV	Alergia a la proteína de leche de vaca
MO Gal d 1	Ovomucoide
OT: Gal d 3	Ovotransferrina
LY; Gal d 4	Lisozima
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-PNA-HPLC	PCR-péptido ácido nucleico-cromatografía líquida de alta resolución
MS	Espectrometría de masas
SPR	Biosensores de resonancia de plasmón de superficie
LFD	Dispositivos de flujo lateral



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Cindy Hidalgo Víquez, con cédula de identidad 110800808, en mi condición de autor del TFG titulado EFFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES DE PROCESO EN LA FABRICACION DE GALLETAS COMERCIALES SOBRE LA DETECCION Y CUANTIFICACION DE LOS ALERGENOS LECHE Y HUEVO MEDIANTE PRUEBAS ELISA

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.


FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

Capítulo 1. Introducción

Las alergias alimentarias han sido reconocidas como un problema de salud pública cada vez más evidente en la población mundial, teniendo reportes de prevalencia en algunos países mayor al 10% en niños (Loh & Tang, 2018) y en adultos cerca del 6% (Sánchez et al., 2019). En la región latinoamericana, en general, se cuenta con pocos estudios o estudios con limitaciones importantes sobre la prevalencia de alergias alimentarias y los principales alérgenos (Sánchez & Sánchez, 2013). Costa Rica no es la excepción, ya que en el país no se cuenta con estudios de prevalencia de alergias alimentarias.

Se han reconocido un grupo de ocho alérgenos a nivel internacional como los causantes de la mayoría de las reacciones alérgicas; dentro de este grupo se incluyen la leche y el huevo (Al & Of, 2018). Se cuenta con datos a nivel mundial en los que se reporta una prevalencia de alergia a leche en niños menores de 3 años de hasta un 4% y de alergia a huevo de hasta un 2% en esa misma población (Dunlop & Keet, 2018). En Costa Rica no se cuenta con estudios de prevalencia; sin embargo, el alergólogo Dr. Olman Riggioni coincide con que en Costa Rica la leche y el huevo son alérgenos de los que más frecuentemente afectan a los preescolares (Riggioni, comunicación personal, 30 de marzo 2017).

La complejidad de los mecanismos por los cuales ocurren tanto alergias como intolerancias a alimentos complica bastante determinar factores causales. Por otro lado, la severidad de la sintomatología, que cada vez causa más muertes, obliga a las industrias vinculadas con los alimentos a asumir responsabilidad en informar a los consumidores con alergias o intolerancias, con la finalidad de proteger la integridad de su salud (A. J. Lee et al., 2013; Surojanametakul et al., 2012).

Durante muchos años la industria de alimentos ha cubierto su responsabilidad en el tema de brindar información de alérgenos a los consumidores mediante avisos precautorios en el etiquetado; sin embargo, esto ha conducido a un uso casi indiscriminado de esos avisos, lo cual conlleva a limitar la oferta de consumo de alimentos pre empacados para consumidores alérgicos, con lo cual se compromete la seguridad alimentaria nutricional de estas personas.

La tendencia en cuanto a legislación en países más avanzados en el tema de gestión de alérgenos en industria alimentaria es clara en permitir los avisos precautorios solamente cuando la empresa compruebe que no tiene forma de asegurar que el producto sea libre de uno o más alérgenos, esto mediante sistemas de gestión de alérgenos en alimentos (Al & Of, 2018; FSSC Foundation, 2019; Lopez, 2017; Programa Federal de Control de Alimentos de Argentina, 2017).

La necesidad de evaluar el riesgo de los alérgenos alimentarios se deriva directamente de la insuficiencia de manejar eficazmente este peligro relacionado con la inocuidad de alimentos (Crevel et al., 2014; Hattersley et al., 2014a). La industria de alimentos debe enfocarse en brindar información veraz al consumidor, por lo que se deben mantener programas de gestión de alérgenos que ayuden a etiquetar los alimentos de forma correcta; estos programas incluyen verificación analítica de presencia de proteínas alérgenos.

Cuando un alérgeno es parte de la formulación y se declara como tal en el etiquetado, no representa un riesgo, el problema real son los alérgenos no declarados, que para la persona alérgica implican un riesgo inminente. La no declaración del alérgeno puede ocurrir por factores como: estar en una cantidad no detectable por los métodos analíticos, que no se declaran de forma correcta en el etiquetado o que ocurra una contaminación por contacto cruzado.

Las pruebas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) son en la actualidad los métodos cuantitativos más usados en Costa Rica para la detección y cuantificación de alérgenos en alimentos. Por lo tanto, se pretende evaluar cómo los factores relacionados con el producto y el procesamiento pueden influir en la detección y cuantificación de estos alérgenos.

Las galletas son productos de consumo frecuente, a las cuales se le aplican diversos tipos de procesamiento y se usan varios ingredientes en su formulación, por lo que son productos en los que la detección y la cuantificación de los alérgenos se puede ver comprometida. Este tipo de productos generalmente se procesa en plantas con varias líneas de producción donde se podría presentar contaminación por contacto cruzado entre productos de líneas con y sin alérgenos. Esta investigación se realizó en una línea de producción de una empresa fabricante de galletas a nivel

comercial de Costa Rica, utilizando las formulaciones y condiciones de procesamiento propias de esta industria.

Capítulo 2. Marco teórico

2.1 Alergias alimentarias

Tener conocimiento sobre la naturaleza de los alérgenos alimentarios es esencial para comprender cómo se evalúan y cómo pueden ser regulados. En general, los alérgenos alimentarios son proteínas y la mayoría, si no todas las proteínas alimentarias, pueden provocar alergias en cierta medida (Barlow *et al.*, 2015). Las alergias alimentarias son un tipo de hipersensibilidad a alimentos, en la que la reacción al alimento es una respuesta inmunitaria (Ortolani & Pastorello, 2006).

Las proteínas, en general, son cadenas largas de aminoácidos (AA) y no toda la proteína es alérgica, sino que son algunas partes específicas de la proteína las que son capaces de unirse a anticuerpos como la Inmunoglobulina E (IgE), llamadas epítopos (Fiocchi *et al.*, 2016). Algunas reacciones alérgicas son no mediadas por IgE, en las que intervienen otros mecanismos inmunológicos, posiblemente celulares (Echeverría-Zudaire *et al.*, 2019).

Los epítopos se clasifican en dos tipos según su acomodo en la proteína. Los epítopos lineales o secuenciales son AA colocados en un orden determinado en una secuencia longitudinal capaz de unir inmunoglobulina E (IgE). La secuencia de AA puede resultar del plegamiento espacial de la proteína (relacionados con la estructura secundaria y terciaria de la proteína) y, cuando son capaces de unir IgE, se denominan epítopos conformacionales. Una vez que la proteína se desnaturaliza, los epítopos conformacionales generalmente se modifican o destruyen, mientras que los epítopos lineales tienden a mantenerse (European Food Safety Authority (EFSA), 2014; Fiocchi *et al.*, 2016).

La estructura y ubicación de los epítopos dentro de la proteína representa un aspecto relevante a nivel clínico. Se ha visto que en leche los epítopos de unión a IgE lineales cortos ubicados en partes hidrofóbicas de proteínas alérgicas podrían usarse como marcadores de una alergia

alimentaria persistente (Hernández et al., 2012). No es posible predecir el potencial alergénico de una proteína; sin embargo, algunas características permiten agrupar las proteínas en familias considerando si conservan características estructurales en relación con su actividad biológica, si son estables al procesamiento y si son resistentes a la proteólisis por enzimas digestivas (European Food Safety Authority (EFSA), 2014).

EFSA ha clasificado las proteínas alérgicas de alimentos en dos grandes grupos relacionados con su origen: las proteínas de origen vegetal y las de origen animal. Cada grupo se divide en subgrupos denominados familias. Esta clasificación por familias responde a un agrupamiento relacionado con la conformación y la estructura de las proteínas, así como su estabilidad (European Food Safety Authority (EFSA), 2014). En el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se puede observar las principales características de las proteínas de las familias de origen vegetal y en el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se pueden observar las características de las proteínas de las familias de origen animal.

Cuadro 1. Principales características de las proteínas de las familias de origen vegetal

Familia de proteínas	Características	
	Conformación, estructuras y estabilidad	Alérgenos de esta familia
<p>Superfamilia de prolaminas: contiene el mayor número de alérgenos de alimentos vegetales: Albúminas de almacenamiento de semillas 2S; proteínas de almacenamiento de semillas de cereales; inhibidores de la α-amilasa / tripsina de cereales; proteínas de transferencia de lípidos no específicas (nsLTP).</p>	<p>Alto contenido de residuos de aminoácidos que contienen azufre. Consisten en haces de cuatro hélices estabilizadas por enlaces disulfuro, que involucran ocho residuos de cisteína bien conservados. Los enlaces covalentes disulfuro intra e intermoleculares, restringen la molécula en un andamio rígido que no se rompe fácilmente y que eventualmente puede reformarse en una posición diferente después del tratamiento. Las prolaminas de almacenamiento de semilla contienen estructuras desordenadas (reomorfas) que generan epítomos expuestos incluso después de tratamientos térmicos, además contienen estructuras repetitivas que forman agregados no covalentes, que son particularmente estables al calor.</p>	<p>Los principales alérgenos de las nueces de árbol, el sésamo y las semillas de mostaza. Presentes alérgenos de trigo, la cebada, el arroz y el maíz. Reacciones alérgicas graves a los frutos de la familia de las rosáceas.</p>
<p>Superfamilia de cupinas: Incluye las principales proteínas de almacenamiento de globulinas, que son la causa de la mayoría de las reacciones alérgicas a las legumbres y frutos secos</p>	<p>Las monocupinas comprenden la mayoría de las proteínas cupina, pueden ser monoméricas, diméricas u oligoméricas, y la mayoría son enzimas. Láminas de seis hebras asociadas con hélices que forman una cavidad de barril β (en latín cupa, barril) con un sitio de unión para un ligando hidrófobo. La estructura de barril se relaciona con estabilidad de la proteína.</p>	<p>Maní, soja, lentejas, nueces, avellanas y semillas de sésamo.</p>
<p>Profilinas: Se encuentran exclusivamente en plantas con flores</p>	<p>Las profilinas son proteínas citosólicas de 12 a 15 kDa. Están plegadas en una estructura globular compacta de una hoja β antiparalela encerrada por hélices α en ambos lados. La alta conservación de la secuencia y la similitud de la estructura 3D explican la fuerte reactividad cruzada serológica con otros alimentos vegetales, pólenes y látex de Hevea.</p>	<p>Maní (Ara h 5), manzana (Mal d 4), apio (Api g 4).</p>

Características		
Familia de proteínas	Conformación, estructuras y estabilidad	Alérgenos de esta familia
<p>Superfamilia Bet v 1: comprende ocho familias, entre las que se encuentran las “proteínas 10 relacionadas con la patogenicidad” (PR 10), las principales proteínas del látex.</p>	<p>Son polipéptidos de 154 a 160 aminoácidos con una gran similitud de secuencia. Comparten un pliegue característico formado por siete láminas β que rodean una hélice C-terminal larga y dos hélices cortas adicionales que conectan dos hélices β-hojas y formando una gran cavidad hidrofóbica en forma de Y capaz de unir esteroides.</p>	<p>Látex, rosáceas (Manzana, cereza, albaricoque y pera) y hortalizas apiáceas (Apio, zanahoria). Reaccionan de forma cruzada con polen de abedul</p>

Nota: elaboración propia con base en información de EFSA (2014).

Cuadro 2. Principales características de las proteínas de las familias de origen Animal

Características		
Familia de proteínas	Conformación, estructuras y estabilidad	Alérgenos de esta familia
<p>Tropomiosinas: Familia de proteínas estrechamente relacionadas presentes en el músculo y otras células con un papel regulador en la contracción muscular</p>	<p>Contienen una repetición de siete aminoácidos (heptada), y la mayoría de las isoformas tienen una serie de 40 heptadas continuas. Estas proteínas forman una estructura dimérica de espiral helicoidal α paralela, que luego se une de la cabeza a la cola para formar un cable que se enrolla alrededor de la hélice. Tienen estructuras repetitivas que forman agregados no covalentes, que son particularmente estables al calor.</p>	<p>Moluscos y crustáceos</p>
<p>Mano EF: Las proteínas de la mano EF presentan un motivo hélice-bucle-hélice.</p>	<p>Una secuencia de generalmente 12 residuos de aminoácidos. Forman un bucle flanqueado en ambos lados por un dominio α-helicoidal de 12 residuos. El bucle es capaz de coordinar iones de calcio o magnesio con diferentes geometrías. El mismo motivo está presente en una gran familia de proteínas que se unen al calcio. La pérdida de calcio por tratamiento térmico induce importantes cambios conformacionales en la proteína, con pérdida de epítomos conformacionales. Sin embargo, los epítomos de unión a IgE restantes son suficientes para desencadenar reacciones alérgicas.</p>	<p>Pescado</p>

Características		
Familia de proteínas	Conformación, estructuras y estabilidad	Alérgenos de esta familia
<p>Caseínas: Las caseínas son proteínas de mamíferos presentes en la leche que se unen a iones calcio a través de los residuos de fosfoserina o fosfotreonina de αS1-, αS2- y β-caseína</p>	<p>Contienen grandes regiones de estructuras desordenadas. Dichas proteínas están constituidas por cadenas polipeptídicas con diferentes estructuras secundarias en equilibrio entre sí, asemejándose a proteínas desplegadas o parcialmente desplegadas, y se denominan reomorfos. Debido a su flexibilidad, son más susceptibles a la hidrólisis por proteasas, pero no sufren cambios conformacionales y sus epítomos permanecen expuestos incluso después de tratamientos térmicos.</p>	<p>Leche</p>

Nota: elaboración propia con base en información de EFSA (2014).

Se ha estudiado el efecto del procesamiento de los alimentos con alérgenos sobre la estructura de las proteínas y, especialmente, sobre los epítomos, esto debido a la tolerancia que eventualmente se puede o no generar al inducirse cambios estructurales por el procesamiento (Gomaa & Boye, 2013), siendo que algunos pacientes toleran mejor el alérgeno cuando se encuentra en productos horneados o con procesos extensivos de calor (Bavaro et al., 2019). Esto se explica con las características de las proteínas explicadas anteriormente.

Los alimentos reconocidos como alérgenos varían entre regiones y países. Algunos países han dado seguimiento al tema de alérgenos alimentarios por años, lo que ha permitido que tengan muy bien documentada la evolución en cuanto a cuáles alimentos considerar alérgenos. Codex Alimentarius reconoce ocho alimentos como los principales alérgenos, denominados “los grandes 8”, que incluyen cereales que contienen gluten, crustáceos, huevos, pescado, maní, soya, leche y nueces de árboles. Estos mismos son los reconocidos por Costa Rica, adicionando al grupo de los 8 el sulfito en concentraciones de 10 mg/kg o más (Ministerio de Industria y Comercio de Costa Rica, 2012).

Japón es uno de los países que ha logrado dar seguimiento e identificar sus mayores alérgenos alimentarios, esto les ha permitido generar legislación robusta para el control y declaración de estos en alimentos. Se puede identificar cómo la lista de alérgenos alimentarios en este país asiático ha cambiado con los años, reconociendo que los cambios en la dieta e inclusión de “nuevos alimentos” o alimentos que no eran usuales en su dieta pueden afectar la prevalencia de alergias alimentarias en la población (Al & Of, 2018).

Cada región o país debe realizar estudios que contribuyan a identificar los alérgenos alimentarios. En los países del trópico se han identificado algunos alimentos fuera de la lista de los 8 y algunos de los que están en la lista de los 8 se han descrito como de poca prevalencia en estas regiones. Por ejemplo, cuando se habla de alta prevalencia se incluyen frutas como la piña y alimentos como el tomate, maíz, pollo, cerdo, trigo y papa (Sánchez et al., 2019). En nuestro país se carece de este tipo de estudios que contribuyan a identificar los mayores alérgenos alimentarios en el país.

El tratamiento general para las personas que presentan alergias a alimentos es la exclusión de la dieta de los alimentos que contienen el alérgeno. En el caso de los lactantes, la madre debe excluir estos alimentos de su dieta, debido a que pueden pasar por la leche materna al niño (Rajani et al., 2020). Las dosis de consumo del alérgeno que desencadenan una reacción alérgica varían entre individuos y se establecen de diversas formas, llevando esto a una discusión amplia sobre cuándo una cantidad de alérgeno se considera una traza y cuándo se debe declarar a los consumidores, generalmente, mediante el etiquetado de alimentos (Turner et al., 2018).

Poder brindar información confiable a los consumidores sobre el contenido de alérgenos en los alimentos requiere acciones estandarizadas, sistemáticas y documentadas, que permitan identificar los peligros y realizar análisis de riesgo por parte de los operadores de alimentos. Lo anterior se debe regular mediante legislación acorde a las necesidades de las personas con alergias alimentarias en cada país, pero que, además, sea congruente con las metodologías analíticas que permitan detectar y cuantificar de forma acertada el alérgeno en los alimentos (Al & Of, 2018).

2.1.1 Leche

En Costa Rica la leche es uno de los alimentos más consumidos, teniendo un consumo per cápita en el 2016 de 212 litros, según la Cámara Nacional de Productores de Leche. La leche, el queso y natilla forman parte de la canasta básica alimentaria (CBA), con un consumo estimado diario por persona de 198 g, 16 g y 9 g, respectivamente, y representan la fuente de calcio más importante en la dieta costarricense (Hidalgo Víquez et al., 2020).

La leche está reconocida como el principal alimento que causa reacciones alérgicas en lactantes, siendo el primer alérgeno al que se expone el infante (Lapeña López de Armentia & Hierro Delgado, 2018). Se reporta una prevalencia en niños menores de 3 años de aproximadamente un 4% (Dunlop & Keet, 2018), en tanto que en adultos se reporta una menor prevalencia de aproximadamente 0.2% (Sicherer & Sampson, 2010), considerándose la alergia a la proteína de vaca transitoria en el 80% de los casos (Lapeña López de Armentia & Hierro Delgado, 2018).

La leche de vaca contiene aproximadamente 3 g de proteína /100 ml y estas proteínas incluyen 25 tipos, algunas de las cuales se han reconocido con potencial alergénico, distribuidas en las fracciones de caseína (precipitan a pH 4,6 y 20 ° C) y las de suero (solubles a pH 4,6 y 20 °C), correspondientes al 80% y 20%, respectivamente (Villa et al., 2018). Las caseínas, β -Lacto globulinas (β -LG) y la α -lacto albúmina (ALA) se consideran los principales alérgenos de la leche. Otras proteínas como la lacto ferrina (LF), la seroalbúmina bovina (BSA) y las inmunoglobulinas (Ig), se han reconocido como de gran importancia para inducir alergias a la leche (Villa et al., 2018). En la Cuadro 3 se puede observar la caracterización de las proteínas alérgenos de la leche de vaca.

Cuadro 3. Caracterización de las proteínas alérgenas de la leche de vaca según la nomenclatura de alérgenos de la Organización Mundial de la Salud y la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS)

Fracción de leche	Nombre proteína	Nomenclatura del alérgeno	Concentración en leche (g L ⁻¹)	Punto Isoeléctrico	# aminoácidos / Molécula
Caseínas (80%)	α S1-caseína	Bos d 9	12.0–15.0	4.9–5.0	199
	α S2-caseína	Bos d 10	3.0–4.0	5.2–5.4	207
	β -caseína	Bos d 11	9.0–11.0	5.1–5.4	209
	κ -caseína	Bos d 12	3.0–4.0	5.4–5.6	169
Suero (20%)	β -Lactalbúmina	Bos d 4	1.0–1.5	4.8	123
	β -Lactoglobulina	Bos d 5	3.0–4.0	5.3	162
	BSA	Bos d 6	0.1–0.4	4.9–5.1	582
	Inmunoglobulinas	Bos d 7	0.6–1.0		

Fuente: adaptado de Nehra et al. (2020).

La caseína contiene principalmente epítomos secuenciales termoestables, la hidrólisis térmica no es suficiente para evitar la unión de IgE, por lo que es posible que persistan péptidos alérgicos posterior a un tratamiento térmico (Fiocchi et al., 2016). La mayoría de los pacientes alérgicos a la proteína de leche de vaca (APLV) están sensibilizados a α -caseína (100%) y κ -caseína (91,7%) (Lapeña López de Armentia & Hierro Delgado, 2018).

Las proteínas del suero de la leche presentan comúnmente epítomos conformacionales que son muy termolábiles, por lo que al aplicar calor se induce la hidrólisis térmica de las proteínas y se

evita la unión de IgE específica (Fiocchi et al., 2016). En el caso de las β -LG, se ha observado que tratamientos térmicos vigorosos (121^o durante 20 minutos) pueden incluso aumentar algunas características alergénicas, formándose nuevas estructuras inmunológicamente reactivas. El porcentaje de alérgicos que responden a la β -LG está entre 13-76% de los APLV. A la ALA están sensibilizados entre el 0-80% de los APLV. Para BSA están sensibilizados el 0-88% de los pacientes, pero con síntomas clínicos sólo en el 20% de los casos (Lapeña López de Armentia & Hierro Delgado, 2018).

La leche y las proteínas lácteas se utilizan como ingredientes de muchas preparaciones de consumo usual en el mundo y Costa Rica no es la excepción. Muchos de los productos que contienen leche son sometidos a diversos procesamientos que comúnmente incluyen procesos térmicos, fermentaciones y deshidratado. Estos procesos tienen efectos en la estructura de la proteína que pueden derivar en cambios en la detección, cuantificación y capacidad alergénica del alimento, no siempre resultando en que una menor detección y cuantificación sea sinónimo de una disminución en la capacidad alergénica (Villa et al., 2018).

2.1.2 Huevo

El huevo de gallina es un alimento ampliamente consumido, fuente de proteína y vitaminas del complejo B y es de acceso generalizado en la población, con un consumo promedio diario de 23.6 g en personas de 15 a 65 años del área urbana (Guevara-Villalobos et al., 2019). También es un alimento que forma parte de la CBA en Costa Rica, en donde se establece un consumo promedio de 36 g (Hidalgo Víquez et al., 2020).

La prevalencia de alergia al huevo es de entre 2.4 y 2.6% en los primeros años de vida (Echeverría-Zudaire et al., 2019), mientras que en adultos norteamericanos se ha establecido en 0.2% (Sicherer & Sampson, 2010). Se ha identificado que el huevo genera reacciones adversas a los alimentos en el 35% de los niños alérgicos y en el 12% de los adultos. Para el huevo se ha establecido una dosis umbral entre 1 y 200 mg de huevo (0,13 a 20 mg de proteína de huevo) (J. Y. Lee & Kim, 2010).

El huevo consta de aproximadamente 57% de clara de huevo, 33% de yema de huevo y 10% de cáscara. El contenido de proteína del huevo entero es de aproximadamente 12,1 g de proteína total y 5,9 g de proteína de clara en 100 g de huevo (Fæste et al., 2007). Tanto la clara como la yema pueden causar reacciones alérgicas, aunque la clara, por su mayor contenido proteico, es la fuente más importante de sensibilización y de alergia en la población infantil (Echeverría-Zudaire et al., 2019).

La mayoría de las reacciones alérgicas producidas por huevo son de tipos IgE mediadas. En este tipo de reacción se presentan síntomas en menos de dos horas y muy frecuentemente tienen lugar en los primeros 30 minutos (Echeverría-Zudaire et al., 2019). Aproximadamente el 90% de los epítomos de las proteínas del huevo son de conformación. La mayoría de estos epítomos de conformación son consecutivos o secuencias de aminoácidos casi consecutivas. Esto puede resultar en resistencia a la degradación de proteínas y desnaturalización de los cuatro alérgenos principales del huevo, lo que podría relacionarse con su capacidad alérgica aún en alimentos con algún grado de procesamiento (Liu et al., 2013).

Los alérgenos más importantes del huevo son la ovoalbúmina (OA; Gal d 2), que representa un 54% del contenido proteico total, y la ovomucoide (MO; Gal d 1), que representa un 11%. Otras fracciones proteicas y proteínas menores descritas en la clara de huevo como alérgenos son: ovotransferrina (OT; Gal d 3), que representa un 12%, y lisozima (LY; Gal d 4) un 3,5% (Echeverría-Zudaire et al., 2019; Ji-Yun & Chan Jong, 2010).

La diferencia entre las dos principales proteínas alérgenos del huevo (ovoalbúmina y ovomucoide) está en su comportamiento frente a las operaciones de procesamiento de alimentos como agitación, calentamiento o hidrólisis enzimática, donde los epítomos de unión a IgE de la proteína MO; Gal d 1, que es termoestable, son relativamente estables (Fæste et al., 2007), por lo que se conserva el potencial alérgico. Esta estabilidad ante el procesamiento implica que pacientes con sensibilización elevada a esta proteína (MO; Gal d 1) presenten reacciones con cualquier tipo de alimento que contenga huevo, independientemente de su cocinado o procesamiento (Echeverría-Zudaire et al., 2019).

El alérgeno más importante de la yema de huevo es la α -livetina (Gal d 5), que es la seroalbúmina de pollo. Este alérgeno se relaciona con reactividad cruzada más frecuentemente en adultos, presentando síntomas de alergia alimentaria al huevo tras consumo de yema o carne de pollo. También se reconoce su relevancia en el síndrome ave-huevo, en el cual, por inhalar partículas de plumas, el paciente se sensibiliza y desarrolla manifestaciones clínicas respiratorias. También se tiene clara una reactividad cruzada entre huevos de diferentes aves (Echeverría-Zudaire et al., 2019).

2.2 Detección y cuantificación de alérgenos

La mayoría de los métodos para el análisis de alérgenos en alimentos se pueden dividir en dos grandes grupos; por un lado, están los basados en el reconocimiento de proteínas y por el otro los basados en ADN (Nehra et al., 2020). Los métodos basados en el reconocimiento de las proteínas incluyen inmunocromatografía, espectrometría de masas (MS) y ELISA (Castillo & Cassola, 2017). Los métodos de reconocimiento de ADN se basan en el reconocimiento de una secuencia específica de ADN que indica la presencia del alérgeno como, por ejemplo, los que se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (Nehra et al., 2020).

Estos métodos de detección de alérgenos también se pueden clasificar como cuantitativos (determinan una cantidad de alérgeno) o cualitativos (indican presencia o ausencia de las proteínas) y se encuentran disponibles para los principales alérgenos en diversas matrices alimenticias y superficies en contacto con alimentos (Schubert-Ullrich et al., 2009). Otros métodos, como la MS y los biosensores de resonancia de plasmón de superficie (SPR), se han aplicado solo recientemente para la detección y cuantificación de residuos alérgénicos en algunas matrices y requieren más investigación para considerarse métodos oficiales (Zeleňáková et al., 2019).

2.2.1 Métodos emergentes

Debido a que se tiene bien establecido que los procesamientos de alimentos generan cambios en la estructura de la proteína o del ADN utilizado para detectar y cuantificar alérgenos y esto afecta

la detección final, la MS surgió como una herramienta de confirmación final para la identificación inequívoca de alérgenos alimentarios en diferentes productos (Alves et al., 2016).

Heick et al (2011) investigaron un método para la detección simultánea de siete alimentos alergénicos y se ha aplicado a muestras procesadas y sin procesar (harina y pan) por medio de MS. Se evaluó la influencia del proceso de horneado y se compararon los resultados con los obtenidos con los kits de prueba ELISA disponibles comercialmente. Se concluyó que se presentaban grandes diferencias entre los dos métodos al analizar la leche, el huevo y la soya. Para el huevo, solo un kit fue capaz de detectar el alérgeno en el producto procesado. Para la leche y la soya, las sensibilidades disminuyeron al analizar el pan o no se pudo detectar el alérgeno en absoluto. Para estos alérgenos, el método MS mostró una capacidad de detección superior para las muestras procesadas (Heick et al., 2011).

Como ventaja de la MS se señala su capacidad de multiplexación (detectar varios alérgenos a la vez) y mejor sensibilidad para los alérgenos mencionados anteriormente. Una desventaja identificada en este estudio fue que hasta ese momento el método de MS desarrollado era solo cualitativo. Se propuso en el estudio como solución a esta limitación usar péptidos marcados con isótopos (Heick et al., 2011). Se han identificado otras desventajas como, por ejemplo, pocos estudios interlaboratorios, falta de repositorios de secuencias de proteínas para alimentos alergénicos, especialmente de origen vegetal, y las limitaciones conocidas que afectan todos los métodos de detección de alérgenos relacionadas con la extracción del alérgeno de la matriz (Clare Mills et al., 2019).

Los biosensores (inmunosensores y aptasensores) también se han estudiado como una opción más confiable frente a las limitaciones de otros métodos, como, por ejemplo, que ofrecen una opción de detección más barata, fácil, rápida y multiplex de alérgenos de la leche en comparación con las técnicas convencionales. Un biosensor es un dispositivo integrado autónomo constituido por un componente de reconocimiento biológico (receptor bioquímico) y un elemento de transducción de señales conectado a un sistema de adquisición y procesamiento de datos. El transductor se utiliza para convertir la señal (bio) química resultante de la interacción del analito con el biorreceptor en una electrónica. La intensidad de la señal es proporcional a la

concentración de analito (Alves et al., 2016).

El rendimiento de los biosensores depende del biorreceptor empleado, la estrategia de inmovilización (covalente, no covalente), el mecanismo de detección (es decir, electroquímico, óptico, etc.) y la reactividad cruzada de las biomoléculas (es decir, inmunorreactantes y aptámeros) a proteínas homólogas. Aunque la reactividad altamente específica de los aptámeros puede resolver el problema de la reactividad cruzada de los detectores, es necesario examinar el efecto de la variabilidad de la presentación de alérgenos de diferentes especies. La investigación con estos métodos plantea desafíos que se deben resolver, como los relativos a la inestabilidad y alto costo de los anticuerpos. Se hace evidente la necesidad de investigar más sobre este tema, por presumirse como técnicas prometedoras, pero con muy escasos estudios (Nehra et al., 2020).

2.2.2 Métodos basados en ADN

La detección de alérgenos con base en el ADN implica la extracción de un fragmento de ADN que codifica un alérgeno o proteína específico, seguido de amplificación por PCR. Dentro de estos métodos recientes de detección de alérgenos en productos alimenticios basados en PCR se pueden enlistar: PCR-ELISA, PCR en tiempo real, PCR-péptido ácido nucleico-cromatografía líquida de alta resolución (PCR-PNA-HPLC), PCR dúplex y PCR- multiplex tiempo real (Alves et al., 2016).

Las técnicas de PCR son fiables, muy específicas y sensibles, con límites de detección notados inferiores a 10 mg / kg de almendras, avellanas, soya, leche o maní. Permiten minimizar la reactividad cruzada y evitar resultados falsos positivos eligiendo cebadores adecuados que diferencian entre dos secuencias de ADN estrechamente relacionadas. La ventaja de las técnicas de PCR sobre los métodos basados en la detección de proteínas es la extracción eficiente de ADN en condiciones de desnaturalización, más eficaz que durante la extracción de proteínas de matrices alimentarias (Słowianek & Majak, 2011).

La principal desventaja es la degradación del ADN durante el procesamiento de alimentos y la dependencia del límite de detección de la cantidad y pureza de la matriz. Las técnicas basadas en la PCR no detectan los componentes responsables de la reacción alérgica, solo el ADN específico

de la especie, lo cual no significa necesariamente la presencia del alérgeno (Alves et al., 2016). Estos métodos no se recomiendan para la detección de alérgenos en productos alimenticios con alto contenido de proteínas y bajo contenido de ADN, como huevos (Słowianek & Majak, 2011).

Los métodos PCR constituyen una herramienta complementaria importante de los métodos inmunológicos (Alves et al., 2016). En la Cuadro 4 se muestran las características, ventajas y alérgenos para cada uno de los métodos basados en PCR.

Cuadro 4. Características, ventajas y alérgenos para cada uno de los métodos basados en PCR

Método PCR	Características	Ventajas	Alérgenos identificados
PCR-ELISA	No requiere gel de electroforesis El fragmento de ADN amplificado se marca con biotina o digoxigenina para poder ser determinado con ELISA	Alta especificidad Simplicidad del método Bajo costo de ELISA	Avellana
PCR-Tiempo real	Aislamiento de ADN mediante extracción caotrópica de fase sólida y PCR secundaria con sonda fluorescente Taq-Man y cebadores específicos.	Límites de detección muy buenos para los alimentos en que se aplica.	Maní, apio, mostaza, sésamo, altramuza, anacardo, nuez, pistachos, nueces pecanas, almendras y nueces de macadamia
PCR-PNA-HPLC	La técnica es una modificación de la PCR utilizando sondas marcadas con ácido péptido nucleico (PNA) y detección con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Permite la detección eficaz de alérgenos potencialmente ocultos incluso en productos con presencia no declarada de avellana o como posible contaminación	Avellana
PCR dúplex	Permite amplificar varios fragmentos de ADN simultáneamente mediante la aplicación de varios pares de cebadores	Detección simultánea de dos alérgenos	Avellana y maní (juntos) Dos tipos de trigo (juntos)

Método PCR	Características	Ventajas	Alérgenos identificados
PCR-multiplex tiempo real	Permite amplificar varios fragmentos de ADN simultáneamente mediante la aplicación de varios pares de cebadores	La prueba exhibe una alta especificidad y sensibilidad en el rango de 0.01%, menor para el huevo y la leche debido al bajo contenido de ADN	avellana, maní, apio, soya, huevo, leche, almendra y sésamo (todos analizados al mismo tiempo)

Fuente: elaboración propia con base en información de Słowianek & Majak (2011).

2.2.3 Métodos basados en reconocimiento de proteínas

Dentro del grupo de reconocimiento basado en proteínas se incluyen el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), pruebas con tira reactiva, dispositivos de flujo lateral (LFD, por sus siglas en inglés) y pruebas enzimáticas (Nehra et al., 2020). De este grupo solamente las pruebas ELISA dan resultados cuantitativos, las pruebas de LFD y las tiras reactivas son metodologías cualitativas de detección.

Las LFD contienen zonas donde los anticuerpos se fijan a la matriz sólida. Las muestras de hisopos de las superficies del equipo se pegan en la tira y producen líneas visibles donde ocurren las interacciones antígeno-anticuerpo. Estas pruebas son económicas, rápidas y portátiles, no requieren instrumentación y son extremadamente simples de realizar. Son específicas y sensibles y generalmente tienen límites de detección en el rango de 5 ppm (Taylor & Baumert, 2015).

Las LFD se usan con frecuencia en la industria alimentaria para evaluar la limpieza de los equipos de procesamiento compartidos después del saneamiento. Los inmunoensayos de flujo lateral también se pueden multiplexar mediante la adición de múltiples líneas de prueba. Cada línea de prueba corresponde a los analitos específicos que se van a detectar, con lo que se reduce el tiempo de análisis y el desperdicio de reactivos, ya que se pueden evaluar múltiples analitos en las mismas condiciones (Ross et al., 2018).

Para el análisis de sulfitos en alimentos existen otros métodos que se basan en la titulación, como el método Monier-Williams y el procedimiento Ripper (titulación yodométrica). El método Monier-

Williams es robusto, con un LOD ≥ 10 mg / kg, pero requiere mucho tiempo y está sujeto a pérdidas de SO₂ y / o co-distilación de otros compuestos volátiles oxidables presentes en los alimentos. El método de titulación yodométrica presenta un LOD de 5 mg / kg. Sin embargo, se considera que este método carece de exactitud y precisión debido al hecho de que el yodo puede reaccionar con otros compuestos oxidables presentes en los alimentos y no puede usarse para matrices coloreadas (European Food Safety Authority (EFSA), 2014).

Las pruebas ELISA son las más utilizadas para la detección y cuantificación de alérgenos en alimentos (Taylor & Baumert, 2015), y se basan en la unión específica entre epítomos en la molécula del alérgeno o una proteína específica presente en el alimento alergénico y una inmunoglobulina específicamente producida contra el elemento de interés (Alves et al., 2016). En el siguiente apartado se describen de forma amplia este tipo de pruebas, ya que son las usadas para esta investigación.

2.3 Kits ELISA

En la actualidad, la verificación analítica de los requisitos de etiquetado y la detección y cuantificación de proteínas alergénicas en los alimentos es realizada principalmente por pruebas ELISA, debido a su facilidad de uso, respuesta rápida y alta sensibilidad, así como su relativo bajo costo comparado con otros métodos analíticos. Los kits de ELISA emplean principalmente anticuerpos policlonales para la detección de alérgenos alimentarios, ya que estos ofrecen el beneficio de reconocer varios epítomos diferentes en la proteína diana y son menos sensibles a pequeños cambios (Monaci et al., 2011). Sin embargo, se discute la eficiencia de los anticuerpos policlonales versus los monoclonales (Castillo & Cassola, 2017).

De acuerdo con lo descrito por varios autores, el procesamiento juega un papel muy importante en la precisión (variabilidad) y exactitud (recuperación) de los kits ELISA (Gomaa & Boye, 2013; Khuda et al., 2012; Monaci et al., 2011). Se ha observado que los procedimientos de extracción y cuantificación, así como el equipo usado para el análisis de datos, pueden hacer que un kit sea más preciso para la detección de un alérgeno en lugar de otro en una sola matriz. Lo anterior debido a factores como calibradores estándares de los kits, los anticuerpos y los agentes de

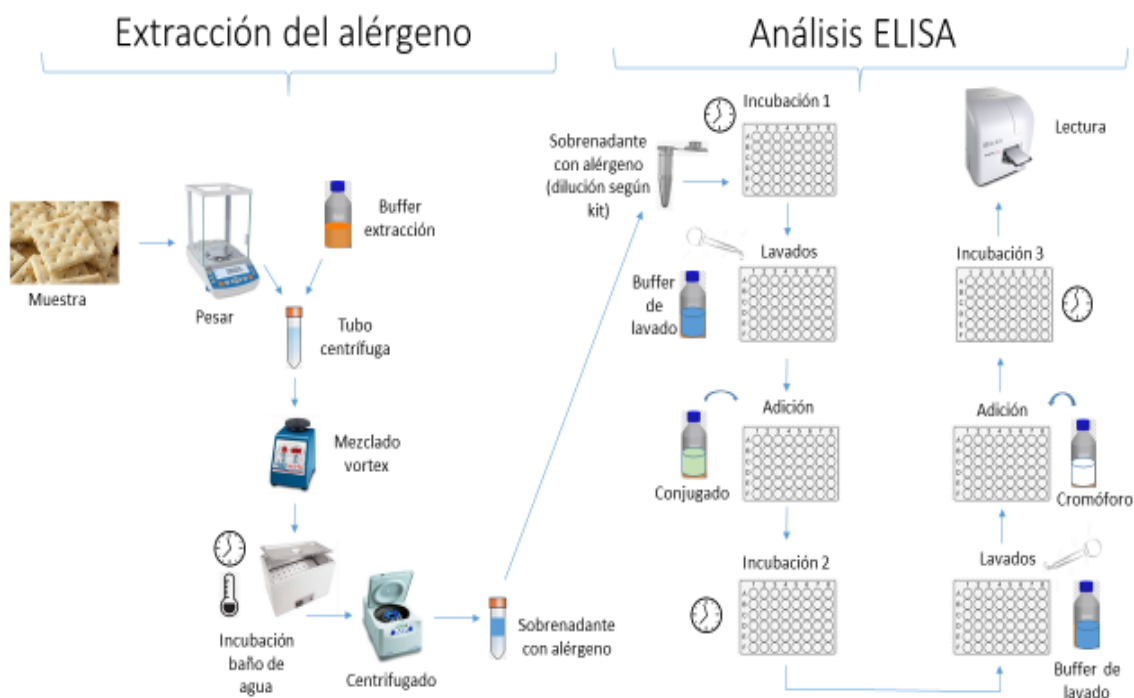
extracción (Khuda et al., 2012).

El procesamiento puede generar que las proteínas pierdan solubilidad y la capacidad de extracción en una matriz, esto debido a la sinergia que se genera entre los componentes de la matriz y la proteína alérgeno, así como los cambios químicos y estructurales que sufre la misma (Monaci et al., 2011). Todo lo anterior puede representar un riesgo en cuanto a que los datos arrojados por los kits ELISA sean confiables.

La capacidad de un método ELISA para detectar proteínas de alérgenos alimentarios en una muestra de prueba se ve afectada por la eficiencia con la que estas proteínas se extraen de la muestra, así como la eficiencia con la que el anticuerpo o los anticuerpos utilizados en la prueba ELISA detectan estas proteínas. El rendimiento general de un método basado en ELISA para la detección de alérgenos alimentarios es una función de estos dos parámetros (Hengel, 2012).

Los pasos genéricos para efectuar análisis ELISA en alimentos se observan en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Cada kit tiene sus particularidades, empezando por el costo y la cantidad de muestras que se pueden analizar con cada uno. Otras variaciones son en cuanto a la cantidad de muestra para el análisis, si el buffer de extracción requiere algún aditivo adicional, el tiempo y condiciones de incubación en el baño de agua (temperatura y agitación) para realizar la extracción y el tiempo de centrifugación (en algunos kits este paso se omite).

En cuanto a la parte del montaje de la placa de micro titulación, igualmente se presentan particularidades según los kits en cuanto a si se contempla alguna dilución propia del kit, a tiempos de incubación y sus condiciones, por ejemplo, agitación o no. La cantidad de lavados por muestra también varía entre kits. Para la adición del cromóforo en algunos kits se especifica que sea en condiciones de oscuridad y su posterior incubación, también; otros kits no especifican este aspecto. Por último, la longitud de onda a la que se debe hacer la lectura es otro aspecto variable. Todas estas variaciones entre kits se deben considerar a la hora de decidir con cuál trabajar, esto porque tanto el tiempo como la cantidad de reactivos tiene un impacto en el costo que implica la realización de estos análisis.



Nota: elaborado por la autora basado en los pasos descritos en los kits para análisis de leche y huevo de R-Biopharm, Veratox y 3M.

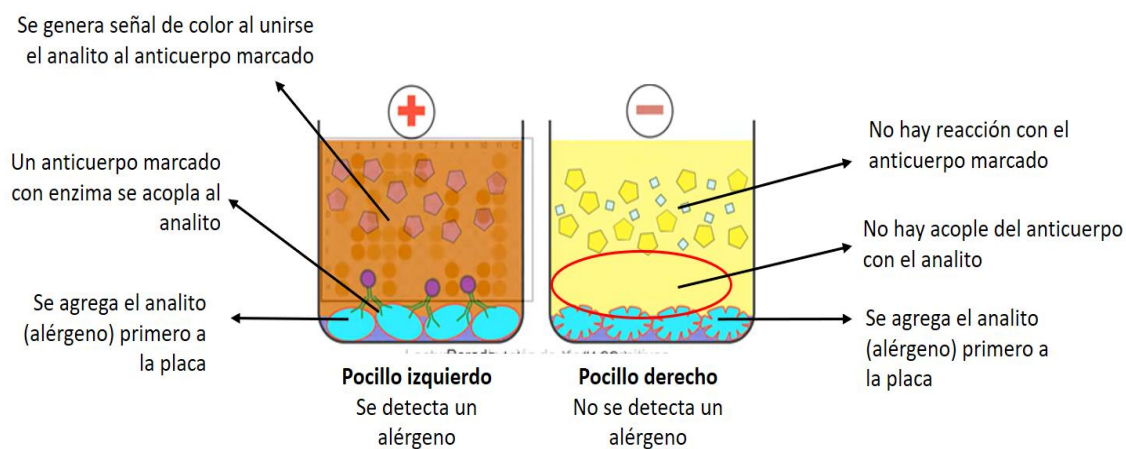
Figura 1. Pasos genéricos para efectuar análisis ELISA en alimentos.

2.3.1 Tipos de ELISA

Los ensayos de ELISA pueden ser de varios tipos: ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA tipo sándwich y ELISA competitivo. Las diferencias entre estos kits pueden generar diferencias significativas en términos de anticuerpos aplicados, proteínas diana, calibradores y procedimientos de extracción, por lo que proporcionan resultados considerablemente diferentes para el mismo analito (Török et al., 2015).

En el ensayo ELISA directo, el analito (antígeno) se une directamente a la fase sólida. Los sueros que contienen el anticuerpo marcado con enzima específico junto con el extracto de muestra adecuadamente diluido se pre incuban antes de agregarlos a los pocillos recubiertos con antígeno. Es un método más rápido pero su sensibilidad no es muy buena (Schubert-Ullrich et al., 2009). En la Nota: adaptado de San Millan (2016b).

Figura 2 se observa el esquema de este ensayo.

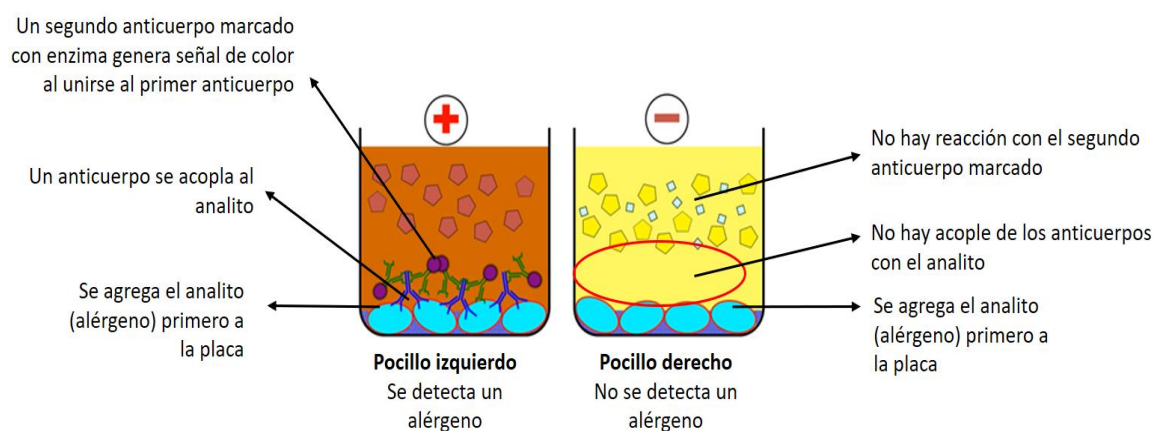


Nota: adaptado de San Millan (2016b).

Figura 2. Esquema de ELISA directo.

En el ELISA indirecto un analito se une a la fase sólida, se adiciona un anticuerpo específico del analito, y se hace una incubación adicional con un segundo anticuerpo específico de la especie marcado. Este tipo de ELISA da mejor señal y la diferencia con ELISA sándwich es que en este primero se agrega el antígeno a la placa (Kirsch et al., 2009). En la Nota: adaptado de San Millan (2016c).

Figura 3 se observa el esquema del ELISA indirecto.



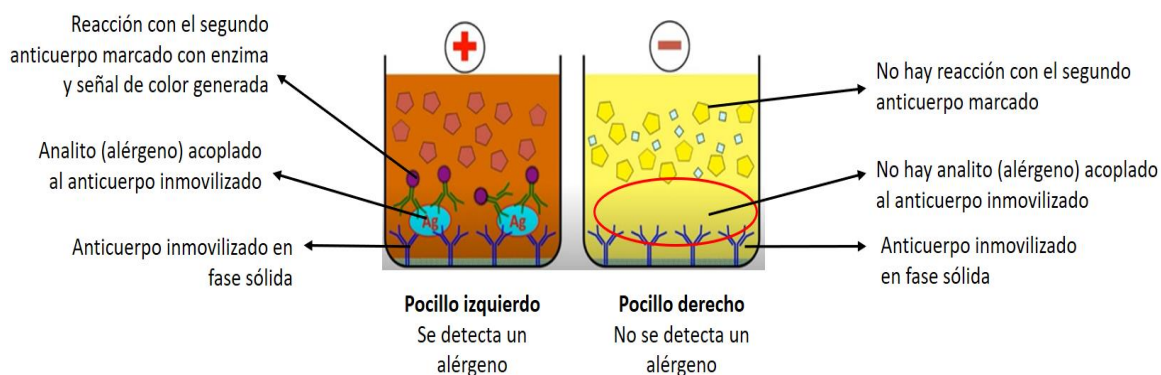
Nota: adaptado de San Millan (2016c).

Figura 3. Esquema de ELISA indirecto.

El ELISA tipo sándwich (s-ELISA) contiene un anticuerpo de captura específico para la proteína de interés que se inmoviliza en una fase sólida (placa de micro titulación o tiras de pocillos múltiples). Los analitos de la muestra son capturados por el anticuerpo inmovilizado y detectados por un segundo anticuerpo específico, que está marcado con enzima y se une a la proteína de interés formando un "sándwich". La absorción del producto coloreado formado después de agregar el sustrato es directamente proporcional a la concentración de analito (Schubert-Ullrich et al., 2009).

El ensayo sándwich es el formato más común para la detección de alérgenos en los alimentos (Taylor & Baumert, 2015). En la Adaptado de San Millan (2016a).

Figura 4 se observa la unión del anticuerpo con el analito y el efecto "sándwich" del segundo anticuerpo marcado con la enzima que reacciona con el sustrato para dar el color (pocillo izquierdo). A la derecha un pocillo negativo donde no se dio la unión del analito.

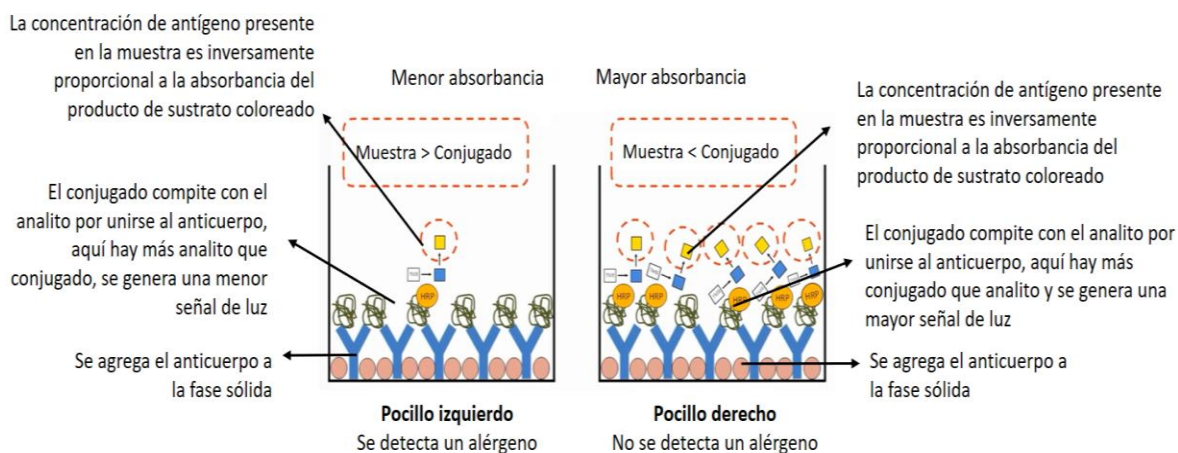


Adaptado de San Millan (2016a).

Figura 4. Esquema de ELISA "sándwich".

El ELISA competitivo se utiliza cuando hay cantidades pequeñas del analito. El ensayo consiste en fijar un anticuerpo a la fase sólida de la placa. Posteriormente se realiza una mezcla con el analito y un reactivo con el cual compite por unión en la placa (mezcla competitiva). A la mezcla competitiva se adiciona un conjugado con la proteína de interés y una enzima para generar color. Toda esta mezcla se adiciona en la placa donde se encuentra un anticuerpo fijado a la fase sólida, donde las proteínas marcadas con el conjugado van a generar una señal de color y las proteínas de interés no generan señal. En este ensayo la señal de luz es inversamente proporcional a la cantidad de analito en la muestra (Schubert-Ullrich et al., 2009). En la Adaptado de PROTOCOLPLACE (2013).

Figura 5 se puede observar un esquema del funcionamiento de los kits ELISA competitivo.



Adaptado de PROTOCOLPLACE (2013).

Figura 5. Esquema de ELISA competitivo.

2.3.2 Efecto del procesamiento en la detección y cuantificación de alérgenos con pruebas ELISA

Las modificaciones que se pueden presentar en las proteínas durante el procesamiento dependen de las condiciones del proceso, la naturaleza de la proteína y la composición de la matriz. Los procesamientos que se aplican a los alimentos a nivel casero e industrial, impactan tanto la estructura como las propiedades químicas de las proteínas. Dentro de los cambios más importantes se contemplan el despliegue y agregación de proteínas, proteólisis, glicosilación y glicación, efectos de solubilidad y pH, y redes para la formación de gel, lo que puede alterar su potencial alergénico (European Food Safety Authority (EFSA), 2014).

Los procesos de producción de alimentos como tratamientos térmicos y la extrusión pueden tener una influencia significativa en la solubilidad y la capacidad de extracción de las proteínas alérgenos, así como en la capacidad del anticuerpo o anticuerpos utilizados en el ELISA para reconocerlos. Los factores que pueden influir en los resultados de la prueba incluyen: (1) interacciones con compuestos en una matriz alimentaria (por ejemplo, presencia de polifenoles y taninos); (2) solubilidad y reactividad reducidas de proteínas desnaturalizadas por calor; y (3)

diferencias en el perfil proteico de un alérgeno alimentario particular de diferentes especies, variedades y orígenes geográficos (Hengel, 2012).

Gomaa & Boye (2013) y Monaci et al (2011) han confirmado que los procesos térmicos interfieren con la detección de las proteínas alérgenas y, por ende, se ha demostrado que el rendimiento de las pruebas ELISA se ve comprometido cuando se aplican técnicas de procesamiento de alimentos extensivas como el horneado; sin embargo, se conoce que, a pesar del procesamiento extensivo, el alimento sigue teniendo potencial alérgico (Török *et al.*, 2015).

Algunas de las consecuencias del procesamiento térmico sobre las proteínas alimentarias son: pérdida de epítomos Ig-E conformacionales, reacciones de Maillard y disminución de la solubilidad de las proteínas, capacidad de extracción o estabilidad. En particular, el calentamiento y el procesamiento tecnológico de los alimentos podrían conducir a cambios en la estructura de la proteína diana que afecta a algunos determinantes antigénicos y sitios de unión de epítomos, lo que podría comprometer la eficiente recuperación y detección de los alérgenos en los análisis ELISA (Monaci et al., 2011). Adicionalmente, se han demostrado diferencias significativas en cuanto a cuantificación y detección de los diferentes kits ELISA disponibles en el mercado (Ferrer, 2017).

Un aspecto del procesamiento, poco estudiado, es la geometría comercial de los productos en cuanto a la detección de los alérgenos. Gomaa & Boye (2013) estudiaron el efecto del tamaño de la galleta en la detección de caseína, huevo, gluten y soya. Encontraron que, de forma general, la recuperación de los alérgenos decrece al disminuir el tamaño de la galleta, lo que atribuyen a que la temperatura en el centro de la galleta aumenta al disminuir el tamaño. No se encontraron estudios similares donde se haya evaluado el tamaño de la galleta.

2.3.3 Efecto de la formulación en la detección y cuantificación de alérgenos con pruebas ELISA

Los alimentos son matrices complejas en las que se generan interacciones entre sus componentes, lo cual repercute en la capacidad de las proteínas alérgenas para acoplarse con los

anticuerpos, generando una disminución o aumento de la capacidad de las proteínas a unirse a estos (Lacorn et al., 2018). El efecto del procesamiento sobre el desempeño de los kits ELISA ha sido ampliamente estudiado. Por el contrario, del efecto de la composición de la matriz sobre este desempeño se encuentran pocos estudios, a pesar de que se reconoce la matriz como un factor importante a considerar para el uso de estos kits (Török et al., 2015).

El hecho de que la proteína puede perder su potencial alergénico beneficia a algunas personas con alergias alimentarias, ya que aumenta la tolerancia a estos alimentos. Sin embargo, surge un aspecto negativo considerando que esa incapacidad de la proteína para unirse a los anticuerpos limita la detección de estas en los alimentos. Se ha visto que esta limitación en la capacidad de los Kits ELISA para detectar y cuantificar las proteínas alergénicas no necesariamente indica que la proteína no es potencialmente peligrosa para las personas con alergias alimentarias (Al & Of, 2018).

También se ha descrito que la matriz alimenticia puede afectar la detección y cuantificación de los alérgenos, considerando si cuenta con uno o varios alérgenos en la matriz, lo que puede implicar variaciones en los resultados debido a la reactividad cruzada que podrían presentar los antígenos con los anticuerpos. Debido a esto es que se deben considerar factores como la formulación, qué tan homogénea es la matriz e, incluso, la cantidad y tipo de alimentos que la conforman (Török *et al.*, 2015).

Toyosaki et al. (2006) estudiaron el efecto de la sal en masas de pan crudas y el producto terminado, sobre la capacidad de unión de proteínas de huevo (ovomucoide (tipo III), ovomacroglobulina (tipo II), ovomucina (tipo I), ovoalbúmina (tipo VII), ovotransferrina (tipo I) y lisozima. Encontraron que la sal disminuyó la capacidad de unión con anticuerpos en las pruebas ELISA, tanto en la masa cruda como en el pan; por ende, se disminuye la detección. Sin embargo, este efecto también ocurre con la unión a IgE en el cuerpo humano (medida in vitro con sueros humanos), por lo que disminuye la capacidad alergénica del alimento (Toyosaki et al., 2006). El dilema está en si esa disminución en la capacidad alergénica es suficiente para una cantidad considerable de personas con alergia (European Food Safety Authority (EFSA), 2014).

Otro estudio comparó los resultados analíticos de cuantificación con kits ELISA comerciales para clara de huevo, caseína, soya y gluten en matrices modelo a base de harina de amaranto y basadas en harina sin gluten. Los resultados muestran que las concentraciones medidas de las muestras a base de harina de amaranto son más bajas (diferencia significativa), a excepción de las masas y galletas que contenían soya. La harina de amaranto tiene mayor contenido de proteínas y lípidos; ambos componentes están presentes en un nivel diez veces superior en comparación con la harina sin gluten. En consecuencia, es posible que los dos tipos de matrices conduzcan a diferentes propiedades físicas, solubilidad, etc. de las proteínas investigadas y / o afinidad modificada por los anticuerpos (Török et al., 2015). Para esta investigación no se estudió el efecto sobre la capacidad alergénica de las formulaciones evaluadas.

Capítulo 3. Hipótesis y objetivos

3.1 Hipótesis

La detección y cuantificación de alérgenos de leche y huevo mediante pruebas ELISA en galletas se ve afectada por las características del kit usado, la geometría, los ingredientes de la formulación y el perfil de horneado de las galletas.

3.2 Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes condiciones de proceso en la fabricación de galletas comerciales sobre la detección y cuantificación de los alérgenos leche y huevo mediante pruebas ELISA

3.3 Objetivos específicos

1. Comparar el desempeño analítico de tres kits tipo ELISA con los que se realizarán los ensayos de los alérgenos leche y huevo.
2. Evaluar el efecto de la formulación de galletas comerciales en la detección y cuantificación de los alérgenos leche y huevo
3. Evaluar el efecto de la geometría comercial de galletas sobre la detección y cuantificación de los alérgenos leche y huevo en el producto final.
4. Evaluar el efecto del perfil de horneado de galletas a nivel industrial sobre la detección y cuantificación de los alérgenos leche y huevo.

Capítulo 4. Artículo 1

Título:

Efecto de la formulación comercial de galletas saladas en la cuantificación de alérgenos leche y huevo comparando tres kits ELISA

Resumen:

Introducción: Las pruebas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas son los métodos más usados en Costa Rica y el mundo para la cuantificación de alérgenos en alimentos. La matriz por analizar puede tener un efecto en el nivel de cuantificación con este tipo de pruebas.

Metodología: Las galletas se elaboraron con formulaciones comerciales en una industria alimentaria. Se utilizó la galleta tipo cracker tradicional e integral. Se utilizaron tres kits ELISA comerciales diferentes, tipo sándwich (indicar las marcas de los kits), tanto para leche como para huevo. Para cada kit se siguió el protocolo establecido por el proveedor. **Resultados:** Para el efecto de la formulación sobre la cuantificación de leche, se encontró un efecto significativo ($P=0.0128$) en la interacción del tipo de galleta y el kit. Se encontró que el kit de R-Biopharm detecta en forma diferente el alérgeno en las formulaciones evaluadas ($P=0.004$). Sobre el efecto de la formulación en la cuantificación de huevo se encontró una diferencia significativa ($P=0.0451$) entre las dos formulaciones para los porcentajes de cuantificación, en los tres kits. **Conclusiones:** El efecto de la formulación se puede presentar en algunos kits para la cuantificación de alérgenos en leche. Para huevo se concluye que hay un efecto de la formulación sobre la cuantificación del kit, independientemente de la marca usada. Algún componente (probablemente la fibra) de galleta integral tiene un efecto sobre la cuantificación de los alérgenos estudiados.

Palabras clave:

Alérgenos alimentarios, formulación, ELISA, cuantificación, galletas

1. Introducción

En la Región Latinoamericana, en general, se cuenta con pocos estudios o estudios con limitaciones importantes sobre la prevalencia de alergias alimentarias y los principales alérgenos (Sánchez & Sánchez, 2013) y Costa Rica no es la excepción. Se han reconocido un grupo de ocho alérgenos a nivel internacional como los causantes de la mayoría de las reacciones alérgicas; dentro de este grupo se incluyen la leche y el huevo (Al & Of, 2018). A nivel mundial, se cuenta con datos en los que se reporta una prevalencia de alergia a leche en niños menores de 3 años de hasta un 4% y de alergia a huevo de hasta un 2% en esa misma población (Dunlop & Keet, 2018).

Durante muchos años la industria de alimentos ha cubierto su responsabilidad en el tema al brindar información de alérgenos a los consumidores mediante la declaración de ingredientes y avisos precautorios en el etiquetado; sin embargo, esto ha conducido a un uso casi indiscriminado de esos avisos, lo cual conlleva a limitar la oferta de consumo de alimentos pre empacados para consumidores alérgicos, con lo cual se puede ver afectada la disponibilidad a ciertos alimentos por estas personas.

Cuando un alérgeno es parte de la formulación, y se declara como tal en el etiquetado, no representa normalmente un riesgo. El problema real son los alérgenos no declarados, que para la persona alérgica implica un riesgo inminente si lo consume (Taylor et al., 2014). La no declaración del alérgeno puede ocurrir por factores como: ausencia de un programa de gestión de alérgenos en la industria (Programa Federal de Control de Alimentos de Argentina, 2017) o por estar en una cantidad no detectable por los métodos analíticos. Esto último puede deberse a que la concentración del alérgeno está por debajo del límite de detección o cuantificación o porque hay una transformación en la estructura de las proteínas provocada por diferentes factores relacionados con la composición y el procesamiento, y esto afecta su capacidad de detección y cuantificación, pero no su capacidad alergénica (Hattersley et al., 2014).

Las pruebas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) son en la actualidad los métodos cuantitativos más usados en Costa Rica y en el mundo para la detección

y cuantificación de alérgenos en alimentos (Garber et al., 2020). El efecto del procesamiento sobre el desempeño de los kits ELISA ha sido ampliamente estudiado; por el contrario, del efecto de la composición de la matriz sobre este desempeño se encuentran pocos estudios, a pesar de que se reconoce la matriz como un factor importante a considerar para su uso (Török et al., 2015).

Durante las reacciones alérgicas, el antígeno (alérgeno) se acopla con el anticuerpo que genera la reacción alérgica. Bajo este mismo fundamento, los kits ELISA cuentan con anticuerpos capaces de reconocer un antígeno específico en los alimentos y por diversos métodos generar una señal que se detecta en un equipo específico. Los alimentos son matrices complejas, en las que se generan interacciones entre sus componentes, lo cual repercute en la capacidad de las proteínas alergénicas para acoplarse con esos anticuerpos, generando una disminución o aumento de la capacidad de las proteínas a unirse a estos (Lacorn et al., 2018). Esos cambios en la capacidad de unión con anticuerpos podrían presumir un cambio en el potencial alergénico de la proteína, aumentándolo o disminuyéndolo.

El hecho de que la proteína puede disminuir su potencial alergénico, beneficia a algunas personas con alergias alimentarias, ya que aumenta la tolerancia a estos alimentos. Sin embargo, se ha visto que lo anterior puede representar una limitación en la capacidad de los Kits ELISA para detectar y cuantificar las proteínas alergénicas y no necesariamente indica que la proteína no es potencialmente peligrosa para las personas con alergias alimentarias (AI & Of, 2018).

También, se ha descrito que la matriz alimenticia puede afectar la detección y cuantificación de los alérgenos, considerando si cuenta con uno o varios alérgenos en la matriz, lo que puede implicar variaciones en los resultados por la reactividad cruzada que podrían presentar los antígenos con los anticuerpos. Debido a esto es que, para la selección de un método analítico para la detección y cuantificación de alérgenos, se deben considerar factores como la formulación, qué tan homogénea es la matriz e, incluso, la cantidad y tipo de alimentos que la conforman (Török et al., 2015).

Las galletas son alimentos comúnmente consumidos en Costa Rica, con una ingesta promedio diaria de 12 g en la población de 15 a 65 años del área urbana (Guevara-Villalobos et al., 2019),

que están compuestas por una gran variedad de ingredientes; por lo tanto, representan un desafío analítico para la detección y cuantificación de alérgenos por medio de las pruebas ELISA. El objetivo de esta investigación es evaluar el efecto de la formulación comercial de galletas saladas en la cuantificación de leche y huevo comparando el desempeño analítico de tres kits ELISA disponibles comercialmente en Costa Rica.

2. Materiales y métodos

2.1 Materiales

La formulación, elaboración y procesamiento de las galletas se llevó a cabo en la compañía de galletas Pozuelo DCR.SA, que distribuye sus productos a nivel centroamericano. Esta planta se ubica en San José, Costa Rica. La empresa cuenta con un programa de Gestión de Alérgenos que va desde la recepción de la materia prima hasta el empaque, también cuenta con certificación FSSC 22000 y por estas razones fue seleccionada para trabajar esta investigación. El estudio se realizó en la línea de producción de galletas tipo cracker.

Se utilizó la formulación de galleta tipo cracker tradicional y la de galleta integral, sin modificaciones. La diferencia entre estas formulaciones es que la galleta integral contiene tres ingredientes que la tradicional no tiene, estos son: salvado limpio, dextrosa monohidratada y edulcorante. Ambas formulaciones cuentan con el mismo flujo de proceso, lo cual permite evaluar el efecto de la formulación.

Para la contaminación con huevo se utilizó el material de referencia NIST 8445 (valor de fracción de masa de referencia = 48% +/- 1%) y para el experimento con leche se usó el material de referencia certificado para alérgenos MoniQA MQA082016 (17 mg/kg de proteína de leche). La contaminación de las masas se dio en un ambiente controlado ya que estos son alérgenos que el producto no contiene en su formulación. Cabe indicar que el blanco (masa cruda sin contaminar) resultó negativa para trazas de estos alérgenos, es decir solamente se contabilizó la cantidad del alérgeno que se le adicionó de forma intencional.

2.2 Contaminación de las masas y elaboración de las galletas

Debido a que las masas se contaminaron en la empresa en la que se producen y las cantidades con que trabajan son muy grandes, se decidió contaminar las masas con el alérgeno una vez que estaban moldeadas, antes de ser horneadas. Se trabajó con las masas del final del lote de producción de galleta tipo cracker tradicional y se aprovechó el cambio de masa a galleta integral; por lo tanto, para el segundo producto las galletas contaminadas fueron las del inicio de la producción. Entre los cambios de masa se realizó una limpieza de la línea de producción y se tomó masa sin contaminar (o blanco), la masa cruda contaminada y el producto final para ambas formulaciones.

Ninguna de las dos formulaciones contiene huevo o leche como ingredientes de la formulación, por lo que ambas se contaminaron con proteína de huevo y proteína de leche con los materiales de referencia mencionados anteriormente. El nivel de concentración se estableció considerando la mayor cantidad de material de referencia disponible para poder asegurar una mejor distribución del alérgeno. El cálculo de proteína se hizo por el peso de cada galleta y se estableció el siguiente protocolo de contaminación.

Se realizó una solución con los dos alérgenos en las concentraciones establecidas. Para el lote 1 estas concentraciones difirieron de las de los lotes 2, 3 y 4, debido a la disponibilidad del material de referencia al momento de preparar cada ensayo, siendo 200 y 100 ppm de huevo y 138 y 500 ppm de leche, respectivamente. Los resultados se reportaron como el porcentaje de alérgeno detectado en la galleta con respecto a la concentración detectada en la masa cruda para no considerar las otras fuentes de variación como el efecto matriz y que el único factor que se reporte sea la formulación.

Adicionalmente, se cuantificó la cantidad del alérgeno leche y huevo con cada uno de los respectivos kits en los materiales de referencia, esto para conocer el desempeño del kit ante el material de referencia sin tener un efecto matriz. Para calcular el porcentaje de recuperación se aplicaron los factores indicados por cada kit para convertir el resultado a proteína de leche o huevo, esto porque no siempre el resultado de los kits se expresa en mg/kg (ppm) de proteína del

alérgeno. Esta determinación se realizó por triplicado.

Por último, se comparó el porcentaje de cuantificación de los alérgenos en la masa cruda con respecto a la cantidad con la que se contaminó y el porcentaje de cuantificación obtenido con el material de referencia. Esto con el fin de identificar si se presentó algún efecto matriz. Para efectos de este estudio, se entiende como efecto matriz el efecto en la cuantificación del alérgeno en la masa cruda, comparado con el comportamiento del kit ante la cuantificación del material de referencia. El efecto de la formulación es el comportamiento de cuantificación entre las dos diferentes formulaciones de galleta eliminando el efecto matriz en las masas crudas; es por esto que el porcentaje de cuantificación para determinar el efecto de la formulación es con respecto a la cantidad detectada en la masa cruda de forma analítica y no con respecto a la cantidad contaminada.

Se realizó una solución para cada masa cruda (para asegurar mejor distribución del alérgeno). Cada solución se mezcló con un Vortex por aproximadamente 10 minutos. Con una micropipeta y puntas nuevas para cada masa y galleta se procedió a contaminar adicionando 115 μ l de la solución con los alérgenos en el centro de la galleta (Figura 6). Antes de la contaminación se verificó el peso promedio de las galletas para asegurar que era con el que se había realizado el cálculo de ppm.



Figura 6. Contaminación de las galletas con una gota de la solución de leche y huevo.

Con respecto al horneado de las galletas, las condiciones (temperatura, tiempo, flujos de aire y

eficiencia de la llama del horno) fueron las mismas para ambas formulaciones. Sí es importante aclarar que el horneado, aunque fue el mismo para ambas formulaciones, tiene un efecto diferente sobre los componentes de una matriz alimentaria. Este efecto se contempla dentro de lo que se está reportando como efecto de la formulación.

2.3 Recolección y análisis de las muestras

Se recolectaron muestras de cuatro lotes diferentes, en distintas semanas de producción. Cada lote contaminado se recolectó y procesó completo para asegurar que todo el alérgeno adicionado fue recuperado. Las masas y galletas se empacaron en bolsas plásticas y se trasladaron al laboratorio de química del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) ubicado en la sede Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, donde fueron realizados los análisis de cuantificación mediante la técnica ELISA.

Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Se analizaron las masas crudas sin contaminar (blanco), contaminadas y las galletas una vez horneadas. Las masas se liofilizaron para lograr una mejor distribución de los alérgenos, pero, como las galletas tenían una humedad relativamente baja (5.9-7.3 g/100g), no se requirió hacerles este proceso. A cada muestra se le analizó la humedad por el método de análisis 935.39A AOAC. Los resultados se presentan en porcentaje de cuantificación en base seca para cada alérgeno partiendo de la cantidad analítica determinada en las masas crudas contaminadas.

2.4 Métodos ELISA

Se utilizaron tres kits analíticos tipo ELISA sándwich de diferentes casas comerciales. Para cada kit se siguió el protocolo establecido en el inserto que incluye y se solicitaron algunas aclaraciones a los proveedores cuando surgieron dudas. De cada muestra se analizaron dos réplicas. Cada kit tiene sus particularidades en cuanto a la cantidad de muestra para el análisis, si el buffer de extracción requiere algún aditivo adicional, el tiempo y condiciones de incubación en el baño de agua (temperatura y agitación) para realizar la extracción y el tiempo de centrifugación (en algunos kits este paso se omite).

Para el montaje de la placa de microtitulación, igualmente, se presentan particularidades según los kits, en cuanto a si se contempla alguna dilución, los tiempos de incubación y sus condiciones; por ejemplo, agitación o no. La cantidad de lavados por muestra también varía entre kits. En algunos kits se especifica que la adición del cromóforo debe ser en condiciones de oscuridad y su posterior incubación también; otros kits no especifican este aspecto.

Por último, la longitud de onda a la que se debe hacer la lectura es otro parámetro variable. En el Cuadro 5 se muestran las características de los kits comerciales de ELISA para análisis de leche y huevo utilizados en el experimento.

Cuadro 5. Características de los kits comerciales de ELISA para análisis de leche y huevo utilizados para el experimento.

Nombre del Kit	Especificidad	Límite detección	Límite de cuantificación	Expresión de resultados
ELISA RIDASCREEN® Fast Milk R- Biopharm	Caseínas y la β lactoglobulina (β -LG) de la leche de vaca	0.7 mg/kg (ppm) de proteína de leche	2,5 mg/kg (ppm) de proteína de leche	mg de proteína de leche/ kg de galleta (ppm)
Veratox Total Milk Allergen Quantitative 8470 Veratox	Caseínas y proteínas de suero	1 ppm	2.5–25 ppm	ppm de leche en polvo descremada
Leche bovina entera 3M	Proteína total de leche bovina	5,8 ppb	1 ppm	ppm de proteína total de leche bovina
RIDASCREEN®FAST Ei / Egg Protein R-Biopharm	Proteínas de la clara de huevo ovoalbúmina y ovomucoide	Huevo entero de 0,10 mg / kg (ppm) (corresponde a 0,03 mg / kg (ppm) de proteína de clara de huevo)	Huevo entero de 0,5 mg / kg (ppm) (corresponde a 0,13 mg / kg (ppm) de proteína de clara de huevo)	mg / kg de huevo entero en polvo.
Egg veratox Veratox	Anticuerpos contra Ovomucoide (Gal d1), Ovoalbúmina (gal d2), Ovotransferrina (Gal d3)9 y Lisozima	1 ppm	2.5–25 ppm (100–1000 ng/mL)	ppm de proteína de huevo

Kit ELISA para Proteína de Clara de Huevo 3M	Anticuerpo anti-clara de huevo	2,1 ng/mL (ppb)	0,5 ppm	ppm de clara de huevo
---	--------------------------------	-----------------	---------	-----------------------

Para cada kit se utilizó el software indicado por cada casa comercial. En el caso de los kits de R-Biopharm se aplica un factor de dilución contemplado en los estándares de 100 y 50 para ELISA RIDASCREEN® Fast Milk y RIDASCREEN® FAST Ei/Egg Protein, respectivamente. Los factores de dilución adicionales se incluyeron en el software para el cálculo. Para el caso de los kits Veratox Total Milk Allergen Quantitative y Egg veratox no se indica algún factor de dilución es propio del kit y los adicionales de igual forma se incluyeron en el software para ser contemplados en el cálculo.

Con respecto a los kits Leche bovina entera y Kit ELISA para Proteína de Clara de Huevo de 3M se indica que tienen un factor de dilución de 100, más cualquier otra dilución que se realice. Esos datos no se pueden incluir en el software que provee la empresa; por lo tanto, se realizaron los cálculos por aparte. Además, los resultados se deben pasar de ppb a ppm. Las fórmulas aplicadas para estos cálculos son las siguientes.

- [1] ppb calculado por software a partir de absorbancia * 100 = ppb contemplando dilución del kit
- [2] ppb contemplando dilución del kit * factor de dilución adicional = ppb cuantificadas en la muestra
- [3] ppb obtenida / 1000 = ppm cuantificada en la muestra

En cuanto a la calidad de los análisis, para cada corrida realizada con los kits R-Biopharm y Veratox – Neogen se montó como control material de referencia, esto con la finalidad de obtener el estadístico de desempeño Z. Para todas las pruebas con estas dos marcas de kits, tanto para leche como para huevo, se obtuvo un valor Z satisfactorio (menor o igual a 2 o -2) con respecto al valor obtenido en la ronda interlaboratorios FAPAS 27204, 2017, para ambos alérgenos. Para los kits de 3M no se contaba con datos de este tipo, por lo que el parámetro de calidad fue que el porcentaje de cuantificación del material de referencia se encontrara en el rango aceptable para pruebas ELISA (50-150%) (Abbott et al., 2010).

2.5 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental estadístico de bloques completos al azar, donde el bloque estuvo representado por cada lote, que a su vez coincide con cada repetición. Para el análisis del efecto matriz, se usó un arreglo factorial 3 x 2 con los siguientes factores: los Kits analíticos (3 kits diferentes) y las matrices (material de referencia y masa cruda de galleta tipo cracker tradicional). La variable respuesta fue el porcentaje de cuantificación con respecto a la cantidad de proteína certificada en el caso del material de referencia y el porcentaje de cuantificación con respecto a la concentración con la que se contaminó la masa cruda del alérgeno. Se realizó un ANDEVA con un nivel de significancia del 5% en el que se evaluaron las significancias de los efectos simples de los factores y su interacción. Al encontrar significancia ($P < 0,05$) se realizó la prueba de Tukey para identificar las diferencias.

Con respecto al efecto de la formulación, se usó un arreglo factorial 3 x 2 con los siguientes factores: los Kits analíticos (3 kits diferentes) y las formulaciones (2 formulaciones diferentes). La variable respuesta fue el porcentaje de cuantificación con respecto a la concentración detectada en la masa cruda del alérgeno. Se realizó una ANDEVA con un nivel de significancia del 5% en el cual se evaluaron las significancias de los efectos simples de los factores y su interacción. Para analizar la interacción se utilizó la comparación de Bonferroni para un nivel de significancia de 0.017 (usando las pruebas de contraste entre la interacción). El análisis estadístico se realizó en el software JMP® Pro 9.0.2.

3. Resultados

Debido a que en todos los casos los kits detectaron los alérgenos, los resultados están planteados en función de la cuantificación.

Se realizó una prueba de porcentaje de recuperación para el material de referencia, con la que se pretendía verificar la tendencia de cuantificación de cada kit ante el material de referencia solo, sin un posible efecto matriz interfiriendo. En el Cuadro 6 se muestran los resultados del porcentaje de recuperación del material de referencia para cada kit estudiado.

Cuadro 6. Porcentaje de recuperación e intervalo de confianza para la verificación de cada kit con el material de referencia

Alérgeno	R-Biopharm	Veratox	3M
	Promedio \pm IC		
Leche (MQA082016, 17 mg/kg)	130 \pm 1	35 \pm 0	70 \pm 1
Huevo (NIST 8445, 48% +/- 1)	110 \pm 3	180 \pm 1	200 \pm 15

Las tendencias en cuantificación, incluso con el material de referencia certificado, fueron diferentes entre los kits.

Cuadro 7. Porcentaje de recuperación para cada kit entre el material de referencia y la masa cruda de galleta tipo cracker tradicional contaminada

	Kit	R-Biopharm	Veratox	3M
Alérgeno	Matriz	Promedio ¹ \pm IC		
Leche	Material referencia	130 \pm 10 ^a	35 \pm 2 ^a	70 \pm 5 ^a
	Masa cruda tradicional contaminada	20 \pm 10 ^b	30 \pm 10 ^a	200 \pm 50 ^b
Huevo	Material referencia	110 \pm 5 ^a	200 \pm 10 ^a	205 \pm 15 ^a
	Masa cruda tradicional contaminada	120 \pm 10 ^a	100 \pm 20 ^b	75 \pm 10 ^b

1/Para cada alérgeno por separado letras distintas en una misma columna denotan diferencia significativa ($P < 0,05$). El material de referencia tuvo tres repeticiones, la masa cruda contaminada tradicional tuvo 4 repeticiones.

En el Cuadro 7 se puede observar un efecto matriz tanto para leche como para huevo dependiendo del kit ($P < 0.001$). Se encontró este efecto para los kits de R-Biopharm y 3M, debido a que el comportamiento de cuantificación entre el material de referencia solo y la masa cruda fue diferente. Este efecto no se encontró para el kit Veratox, debido a que la subestimación fue igual en el material de referencia y en la masa cruda. En cuanto a huevo, no se observó un efecto matriz en el kit de R-Biopharm debido a un comportamiento similar entre la cuantificación del material de referencia y la masa cruda. Para los kits de 3M y Veratox sí se encontró un efecto matriz con este alérgeno. Debido a lo encontrado en este análisis preliminar es que se decidió partir de la concentración detectada de forma analítica en la masa cruda contaminada y así anular las interferencias generadas por la matriz y poder determinar el efecto propiamente de la

formulación.

En el Cuadro 8 se puede observar el resultado del Porcentaje de cuantificación de los alérgenos leche y huevo para las formulaciones de galleta tradicional y galleta integral

Cuadro 8. Porcentaje de cuantificación de los alérgenos leche y huevo para las formulaciones de galleta tradicional y galleta integral.

	Kit	R-Biopharm	Veratox	3M
Alérgeno	Tipo de galleta	Promedio ¹ ± IC (n=4)		
Leche	Tradicional	50 ± 20 ^a	40±20 ^a	90±50 ^a
	Integral	140±40 ^b	70±50 ^a	50±20 ^a
Huevo	Tradicional	4±2 ^a	4±2 ^a	5±2 ^a
	Integral	3±1 ^b	3±2 ^b	3±2 ^b

1/Para cada alérgeno por separado letras distintas en una misma columna denotan diferencia significativa (P < 0,05)

Se encontró que existe interacción (P=0.0128) entre los efectos formulación y kit, por lo que el efecto de la formulación en cada tipo de galleta depende del kit que se utilizó para la cuantificación del alérgeno leche. Los kits de Veratox y 3M no presentaron diferencia entre las formulaciones (P=0.1675 y 0.2041, respectivamente). Para el kit de R-Biopharm se encontró una diferencia significativa entre las formulaciones (P=0.004), donde el porcentaje de cuantificación en la galleta tipo cracker integral fue mayor al de la masa cruda.

En cuanto al efecto de la formulación sobre la cuantificación de huevo, se encontró una diferencia significativa (P=0.0451) entre los porcentajes de cuantificación para las dos diferentes formulaciones, en los tres kits. La tendencia en los tres kits fue a una mayor cuantificación en la formulación tradicional. Para la interacción entre el kit y el tipo de galleta no se encontró efecto (P=0.5076), lo que refleja que este efecto, contrario a lo encontrado con leche, no depende del kit con el que se analizaron las muestras.

4. Discusión

Se obtuvo que al analizar el material de referencia solo, sin estar incorporado en alguna matriz, se observa mucha variabilidad entre los kits. Para el alérgeno leche se observó una sobreestimación con el kit de R-Biopharm, y una subestimación por parte de los kits Veratox y 3M. Para huevo, todos los kits sobreestimaron, en alguna medida, la cantidad de proteína en el material de referencia. Por lo tanto, se evidencia que entre los kits existen resultados variables en la cuantificación de los alérgenos. Lo anterior puede estar relacionado con la especificidad de los kits en aspectos como la capacidad de extracción de la proteína de la muestra y la eficacia de los anticuerpos utilizados para detectar la proteína (Hayward et al., 2010).

La capacidad de extracción de la proteína puede influenciarse también por los componentes de la matriz alimentaria y el tipo de alérgeno a detectar. La extracción cuantitativa y la recuperación de los residuos alimentarios alergénicos de la matriz es quizás la preocupación más importante. Las proteínas pueden perder solubilidad en las matrices alimentarias por muchas razones, incluido el pH, las modificaciones químicas y los fenómenos de agregación. Además, la matriz alimentaria puede contener componentes que interfieren con el ELISA al inhibir la unión antígeno-anticuerpo, reaccionar con epítomos o tener una actividad enzimática interferente (Taylor et al., 2009).

Si bien no hay un resultado contundente del efecto de la formulación sobre la cuantificación de leche con estas formulaciones, al haberse encontrado en un kit es recomendable investigar sobre el eventual impacto que podría tener una formulación específica en la eficacia de la cuantificación del kit utilizado. Con respecto al kit R-Biopharm, el resultado obtenido puede deberse a que la formulación de galleta tipo cracker integral incluye componentes (especialmente fibra) que podrían tener un efecto en los resultados al interactuar con los componentes de la formulación tradicional para generar especies que son reconocidas por los anticuerpos del kit como proteína alergénica.

Aunque no se encontraron estudios sobre el efecto de la fibra dietética en la detección y cuantificación de alérgenos en alimentos mediante métodos ELISA, sí se ha estudiado el efecto de dietas altas en fibras sobre la modulación inmunitaria, encontrando un efecto protector ante

alergias alimentarias, sin embargo, son mecanismos complejos que se encuentran en estudio (Wang et al., 2021). Estos hallazgos in vivo no necesariamente se pueden extrapolar a la detección y cuantificación en alimentos, pero dan indicios de la necesidad de estudiar más el efecto de la fibra contenida en la matriz alimentaria en la detección de alérgenos.

Además, el efecto del horneado, si bien es el mismo sobre ambas formulaciones, puede afectar en forma distinta por la naturaleza de los componentes y la modificación estructural y química que experimentan los alérgenos en el tratamiento término al interactuar con componentes de la matriz, dando como resultado una menor solubilidad / extracción de las proteínas, tal y como lo indican Monaci et al. (2011). Estos autores afirman que, como la aplicación de temperaturas superiores a 100 °C puede producir reacciones de Maillard, se pueden formar productos Amadori, modificando así la detección y cuantificación y también la capacidad alérgica general del alimento específico.

Las proteínas del suero de la leche presentan comúnmente epítomos conformacionales que son muy termolábiles, por lo que al aplicar calor se induce la hidrólisis térmica de las proteínas y se evita la unión de IgE específica. En el caso de las β -LG se ha observado que tratamientos térmicos vigorosos (121 °C durante 20 minutos), pueden incluso aumentar algunas características alérgicas, formándose nuevas estructuras inmunológicamente reactivas (Fiocchi et al., 2016).

La β -LG es la proteína más reactiva por el potencial de reticulación y agregación. Su extracción requiere condiciones reductoras y sales caotrópicas, además de temperaturas de extracción de 100 °C para prevenir el entrecruzamiento y la agregación, que conducen a una reducción en la detección y cuantificación (Lacorn et al., 2018). Solamente en el kit de R-Biopharm se hace una extracción en baño de agua a 100°C por 10 minutos y otra a 60°C por 10 minutos, para los otros dos kits la extracción se lleva a cabo a 60 °C por 15 minutos para Veratox y 25 minutos para 3M. Con esto se puede inferir que el kit de R-Biopharm podría tener un mejor resultado en cuanto al proceso de extracción de la proteína y, por ende, esto podría explicar por qué se detectó en la galleta tipo cracker integral un porcentaje mayor de leche con este kit (140%).

En el Cuadro 6 se observa cómo, de forma general, el kit R-Biopharm tuvo valores de

cuantificación más altos; solamente para la galleta tipo cracker tradicional no se presentó esta tendencia. Otro aspecto importante de resaltar es que el rango de porcentaje de cuantificación aceptable para kits ELISA es de 50 a 150% (Abbott et al., 2010) y solamente para el kit de R-Biopharm los porcentajes de cuantificación de leche para ambas formulaciones se ubicaron en estos valores.

El análisis de huevo demostró que para este alérgeno sí se presenta un efecto de la formulación independientemente del kit con el que se realice la cuantificación. Es importante resaltar que los porcentajes de cuantificación de huevo en las galletas fueron muy bajos con todos los kits, menores al 5%. Khuda et al. (2012) encontraron algo similar al evaluar la cuantificación de huevo en galletas dulces con 5 diferentes kits ELISA, en ninguna de las muestras después del tratamiento térmico se recuperó más del 15% de huevo (Khuda et al., 2012).

La subestimación del alérgeno de huevo de los alimentos procesados es bien conocida y ha motivado la evaluación de parámetros críticos de las pruebas ELISA, como la extracción de proteínas de huevo de una matriz procesada, el uso de anticuerpos anti-huevo procesados térmicamente en la cuantificación de proteínas modificadas y la utilización de matrices modelo contaminadas con estándares (Nguyen et al., 2019), como las matrices evaluadas en este estudio.

Nguyen et al. (2019) estudiaron el efecto del buffer de extracción sobre la detección y cuantificación de huevo en diferentes matrices. Encontraron que los ensayos que utilizaron extractos con buffer de solución salina con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) mostraron una variación notable en la recuperación de proteínas de huevo entre las matrices de prueba, entre ellas galletas (entre 38 y 68% de recuperación), sobreestimando los niveles de huevo en el chocolate templado y subestimando los niveles de huevo en las matrices de alimentos horneados. El kit de Veratox especifica que la sustancia de extracción es PBS, los otros dos kits no especifican el tipo de sustancia.

Se quiere evidenciar cómo diferencias metodológicas entre los kits generan efectos en los resultados. Por ejemplo, para hacer este tipo de estudio el kit de 3M requiere diluciones muy grandes debido al nivel de contaminación de la muestra con leche y a que el kit reporta en ppb (la

curva de calibración de este kit va de 0 a 810 ppb), lo que hace que el resultado tenga una mayor incertidumbre. sin embargo, el tener una sensibilidad de ppb representa una ventaja a nivel práctico por poder detectar cantidades más pequeñas. El nivel de contaminación de las masas con el material de referencia de huevo fue menor que el de leche, lo que implicó una menor dilución de las muestras.

No se encontraron estudios publicados que hayan evaluado el efecto de matrices alimenticias con y sin fibra sobre la cuantificación de alérgenos de leche y huevo en alimentos. Aunque en este estudio no se puede concluir que efectivamente la fibra tiene un efecto, se concluye estadísticamente que para el caso del huevo la formulación presenta un efecto, y en el caso de la leche se vio el efecto solamente en uno de los kits utilizados. Lo anterior pone en evidencia el papel de las matrices y formulaciones en la cuantificación de alérgenos por ELISA; por ejemplo, se ha descrito interacciones con compuestos en una matriz alimentaria como polifenoles y taninos (Koerner et al., 2013).

Toyosaki et al. (2006) estudiaron el efecto de la adición de sal al pan y la capacidad de detección y cuantificación con ELISA, y encontraron que la sal disminuyó la capacidad de unión con anticuerpos en las pruebas ELISA, lo que disminuyó la detección y cuantificación. este efecto también ocurre con la unión a IgE en el cuerpo humano e implica la reducción de la capacidad alergénica del alimento (Toyosaki et al., 2006). Sin embargo, de manera general, no se puede asegurar que una disminución de la detección automáticamente implique una disminución de la capacidad alergénica de los alimentos (European Food Safety Authority (EFSA), 2014).

Platteau et al. (2011), en su estudio sobre detección cuantitativa de avellana en galletas, encontraron que, aunque la técnica ELISA parecía ser más sensible en comparación con la PCR en tiempo real, ambas técnicas de detección adolecían de efectos de matriz y carecían de robustez con respecto al procesamiento de alimentos. Como estos impactos fueron muy variables entre los diferentes ensayos evaluados (tanto ELISA como PCR en tiempo real), no se pudo llegar a una conclusión firme sobre qué técnica es la más adecuada para detectar la avellana en productos alimenticios (procesados) (Platteau et al., 2011).

5. Conclusiones

Se observa un efecto matriz importante para ambos alérgenos con la masa de galleta tradicional; este efecto depende del kit usado. El hecho de que no se presente este efecto no necesariamente indica buena cuantificación, esto porque, en el caso de un kit, no se evidenció que la matriz interfiriera en la cuantificación al compararla con el material de referencia; sin embargo, tanto en la galleta como en el material de referencia se tuvo un porcentaje de cuantificación bajo (<50%).

Para el caso de la cuantificación de leche, no se puede concluir que hay un efecto de la formulación porque los kits muestran diferentes resultados y tendencias, por lo que el método analítico no es contundente para definir si la matriz influye sobre la cuantificación de leche. Sin embargo, se puede concluir que el efecto se puede eventualmente presentar en algunos kits. Con la matriz estudiada se concluye que algún componente de la formulación de galleta integral (probablemente la fibra) tiene un efecto de sobreestimación de la cuantificación de leche cuando se utiliza el kit de R-Biopharm.

Con respecto a huevo, se concluye que sí hay un efecto de la formulación sobre la cuantificación, posiblemente atribuible a la cantidad de fibra de la formulación de galleta integral en comparación con la galleta tradicional, que provoca una disminución en el porcentaje obtenido. Resulta muy relevante continuar mejorando los métodos analíticos para que la industria alimentaria pueda tener más confianza en lo que se reporta en las etiquetas de los productos y esto favorezca a los consumidores con sensibilidad a alimentos.

Una misma formulación contaminada con dos alérgenos diferentes presenta efectos diferentes, como se muestra en los resultados de esta investigación. Por ejemplo, para leche, solamente el kit de R-Biopharm mostró un comportamiento de cuantificación diferente entre las formulaciones, mientras que, para huevo, con todos los kits se encontró diferencia en el comportamiento de cuantificación.

Los kits tipo ELISA tienen limitaciones; sin embargo, son el método de alcance generalizado para detección y cuantificación de alérgenos en alimentos, y especialmente con fines de etiquetado de

alérgenos y cumplimiento de legislación. Debido a esto se hace muy necesario desarrollar investigación sobre factores que afectan la detección y cuantificación, y buscar alternativas para mejorarlos y así minimizar los riesgos para los consumidores con alergias alimentarias.

6. Agradecimientos

A la compañía Pozuelo DCR.SA, que financió parte de esta investigación, al posgrado en Ciencia de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, que aportó una cantidad de recursos económicos y humanos sin la cual la investigación no hubiera sido posible. Al PhD. Eric Wong quien contribuyó en el análisis estadístico de los datos y brindó guía durante el proceso de definición del diseño experimental.

7. Referencias

- Abbott, M., Hayward, S., Ross, W., & Godefroy, F. (2010). Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices. *Journal of AOAC International*, 93(2), 442–450.
- Al, H. E. T., & Of, O. (2018). *Japanese Food Allergen Labeling Regulation : An Update*. 8–14. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0389>
- Downs, M. L., & Taylor, S. L. (2010). Effects of thermal processing on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of milk residues in a model food matrix. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10085–10091. <https://doi.org/10.1021/jf101718f>
- Dunlop, J. H., & Keet, C. A. (2018). Epidemiology of Food Allergy. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 38(1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2017.09.002>
- European Food Safety Authority (EFSA). (2014). Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients. *EFSA Journal*, 12(11). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3894>
- Fiocchi, A., Dahda, L., Dupont, C., Campoy, C., Fierro, V., & Nieto, A. (2016). Cow's milk allergy: towards an update of DRACMA guidelines. *World Allergy Organization Journal*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40413-016-0125-0>

- Garber, E. A. E., Cho, C. Y., Rallabhandi, P., Nowatzke, W. L., Oliver, K. G., Venkateswaran, K. V., & Venkateswaran, N. (2020). Multi-laboratory validation of the xMAP-Food Allergen Detection Assay: A multiplex, antibody-based assay for the simultaneous detection of food allergens. In *PLoS ONE* (Vol. 15, Issue 7 July). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234899>
- Guevara-Villalobos, D., Flores-Soto, N., Céspedes-Vindas, C., Úbeda-Carrasquilla, L., Chinnock, A., & Gómez, G. (2019). Hábitos alimentarios de la población urbana costarricense (Food habits of urban Costa Rican population). *Acta Médica Costarricense*, *61*(4), 152–159.
- Hattersley, S., Ward, R., Baka, A., & Crevel, R. W. R. (2014). Advances in the risk management of unintended presence of allergenic foods in manufactured food products - An overview. *Food and Chemical Toxicology*, *67*, 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.036>
- Hayward, M., Ross, S., Godefroy, W., Benrejeb Ulberth, S., Van Hengel, F., Roberts, A. J., Akiyama, J., Popping, H., Yeung, B., Wehling, J. M., Taylor, P., Poms, S. L., & Ernest Delahaut, R. (2010). Title: Validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods: community guidance and best practices. *Journal of AOAC International*, *93*(442).
- Khuda, S., Slate, A., Pereira, M., Al-Taher, F., Jackson, L., Diaz-Amigo, C., Bigley, E. C., Whitaker, T., & Williams, K. M. (2012). Effect of processing on recovery and variability associated with immunochemical analytical methods for multiple allergens in a single matrix: Sugar cookies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(17), 4195–4203. <https://doi.org/10.1021/jf3001839>
- Koerner, T. B., Abbott, M., Godefroy, S. B., Popping, B., Yeung, J. M., Diaz-Amigo, C., Roberts, J., Taylor, S. L., Baumert, J. L., Ulberth, F., Wehling, P., & Koehler, P. (2013). Validation procedures for quantitative gluten ELISA methods: AOAC allergen community guidance and best practices. *Journal of AOAC International*. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-043>
- Lacorn, M., Lindeke, S., Siebeneicher, S., & Weiss, T. (2018). Commercial ELISA measurement of allergens and gluten: What we can learn from case studies. *Journal of AOAC International*, *101*(1), 102–107. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0399>
- Monaci, L., Brohée, M., Tregoeat, V., & Van Hengel, A. (2011). Influence of baking time and matrix effects on the detection of milk allergens in cookie model food system by ELISA. *Food Chemistry*, *127*(2), 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.113>
- Nguyen, A. V., Williams, K. M., Ferguson, M., Lee, D., Sharma, G. M., Do, A. B., & Khuda, S. E. (2019). Enhanced quantitation of egg allergen in foods using incurred standards and

- antibodies against processed egg in a model ELISA. *Analytica Chimica Acta*, 1081, 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.030>
- Platteau, C., De Loose, M., De Meulenaer, B., & Taverniers, I. (2011). Quantitative detection of hazelnut (*Corylus avellana*) in cookies: ELISA versus real-time PCR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11395–11402. <https://doi.org/10.1021/jf202167b>
- Programa Federal de control de alimentos de argentina. (2017). *Directrices para el rotulado de alérgenos y sustancias capaces de producir reacciones adversas en individuos susceptibles de productos alimenticios envasados*. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/directrices_rotulado_alergenos.pdf
- Sánchez, J., & Sánchez, A. (2013). Epidemiology of food allergy in Latin America. *Allergologia et Immunopathologia*, 43(2), 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2013.07.001>
- Taylor, S. L., Baumert, J. L., Kruizinga, A. G., Remington, B. C., Crevel, R. W. R., Brooke-Taylor, S., Allen, K. J., & Houben, G. (2014). Establishment of Reference Doses for residues of allergenic foods: Report of the VITAL Expert Panel. *Food and Chemical Toxicology*, 63, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.032>
- Török, K., Hajas, L., Horváth, V., Schall, E., Bugyi, Z., Kemény, S., & Tömösközi, S. (2015). Identification of the factors affecting the analytical results of food allergen ELISA methods. *European Food Research and Technology*, 241(1), 127–136. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2441-y>
- Toyosaki, T., Sakane, Y., & Koketsu, M. (2006). Effects of addition of salt to bread on IgE antibody responses. *Food and Agricultural Immunology*, 17(3–4), 149–156. <https://doi.org/10.1080/09540100600927186>
- Wang, Z., Zhong, J., Meng, X., Gao, J., Li, H., Sun, J., Li, X., & Chen, H. (2021). The gut microbiome-immune axis as a target for nutrition-mediated modulation of food allergy. *Trends in Food Science and Technology*, 114(May), 116–132. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.021>

Capítulo 5. Artículo 2

Efecto del procesamiento industrial de galletas saladas en la cuantificación de los alérgenos leche y huevo con tres kits ELISA

Resumen:

Introducción: El procesamiento de los alimentos puede generar limitaciones en la detección y cuantificación analítica de alérgenos. Factores como la geometría o el tratamiento térmico pueden influir en la veracidad de los resultados de los ensayos. **Metodología:** La geometría se evaluó con dos moldes de galleta tipo cracker (tradicional y XL). El efecto del horneado se evaluó con la galleta tipo cracker tradicional. Para ambos experimentos se tomaron muestras de 4 lotes y se analizaron con tres kits diferentes para análisis de leche y huevo, en forma independiente. **Resultados:** El efecto de la geometría se observó para la cuantificación de huevo ($P= 0.0228$) pero no para la de leche ($P= 0.4335$), independientemente del kit analítico utilizado. El efecto disminución de cuantificación posterior al horneado se presenta por igual independientemente del kit utilizado ($P=0.4245$) para huevo. La cuantificación de huevo posterior al horneado es entre 4 y 5%. Para los alérgenos de la leche no se encontró diferencia significativa en la cuantificación posterior al horneado entre los kits ($P=0.1682$), lo que se debe a la variabilidad de los datos entre los kits. **Conclusiones:** El tratamiento térmico impacta la eficacia de los kits para lograr detectar la cantidad real de alérgenos en los alimentos. Se debe evaluar el desempeño analítico de un método con la matriz que se quiere analizar para conocer si es adecuado y qué tanto impacto puede tener el procesamiento en la cuantificación de los alérgenos.

Palabras clave:

Alérgenos alimentarios, ELISA, cuantificación, procesamiento, capacidad alérgica

1. Introducción

Cada día se hace más evidente que las alergias alimentarias representan un problema de salud pública a nivel mundial. Algunos países han documentado prevalencias mayores a 10% en niños (Loh & Tang, 2018) y en adultos cerca del 6% (Sánchez et al., 2019). La complejidad de los mecanismos por los cuales ocurren tanto alergias como intolerancias a alimentos complica bastante determinar factores causales.

Por otro lado, la severidad de la sintomatología cada vez causa más muertes, lo que ha llevado a que las regulaciones en la comercialización de alimentos a nivel mundial consideren este peligro, obligando a las industrias procesadoras a asumir la responsabilidad de informar a los consumidores con alergias o intolerancias en forma clara y veraz sobre el contenido alergénico de cada alimento pre empacado, con la finalidad de proteger la integridad de su salud (Lee et al., 2013; Surojanametukul et al., 2012).

La tendencia en cuanto a legislación en países más avanzados en el tema de gestión de alérgenos en industria alimentaria es clara en permitir los avisos precautorios solamente cuando la empresa compruebe que no tiene forma de asegurar que el producto sea libre de uno o más alérgenos, esto mediante sistemas de gestión de alérgenos en alimentos (Al & Of, 2018; López, 2017; Programa Federal de Control de Alimentos de Argentina, 2017).

En los programas de gestión de alérgenos se incluye la verificación analítica de presencia de proteínas alérgicas en los alimentos y el entorno de producción. A nivel mundial y en Costa Rica las pruebas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), son muy utilizadas para evaluar la presencia de alérgenos en alimentos (Garber et al., 2020). Las declaraciones de alérgenos en alimentos, en Costa Rica, están establecidas en el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.01.07:10 Etiquetado General de los Alimentos Previamente Envasados.

Las modificaciones que se pueden presentar en las proteínas durante el procesamiento dependen de las condiciones del proceso, la naturaleza de la proteína y la composición de la matriz. Muchos de los procesos que se aplican a los alimentos a nivel industrial impactan tanto la estructura como las propiedades químicas de las proteínas. Dentro de los cambios más importantes se contemplan el despliegue y agregación de proteínas, proteólisis, glicosilación y glicación, efectos de solubilidad y pH, y redes para la formación de gel, lo que puede aumentar o disminuir su potencial alergénico. No se puede asumir que cuando un ensayo analítico no es eficaz en la detección y cuantificación de un alérgeno, éste ha perdido su potencial de causar hipersensibilidad. (European Food Safety Authority (EFSA), 2014).

Está bien identificado que los procesos térmicos interfieren con la detección de las proteínas alergénicas (Gomaa & Boye, 2013; Monaci et al., 2011) y, por ende, se ha demostrado que el rendimiento de las pruebas ELISA se ve comprometido cuando se aplican técnicas de procesamiento de alimentos extensivas como el horneado; sin embargo, se conoce que, a pesar del procesamiento extensivo, el alimento sigue teniendo potencial alergénico (Török et al., 2015).

Los procesos de producción de alimentos como tratamientos térmicos y la extrusión pueden tener una influencia significativa en la solubilidad y la capacidad de extracción de las proteínas alergénicas, así como en la capacidad del anticuerpo o anticuerpos utilizados en el ELISA para reconocerlos, debido a la pérdida de epítopos Ig-E conformacionales. Los factores que pueden influir en los resultados de la prueba incluyen: (1) interacciones con compuestos en una matriz alimentaria (por ejemplo, polifenoles y taninos); (2) solubilidad y reactividad reducidas de proteínas desnaturalizadas por calor o reacciones como las de Maillard; y (3) diferencias en el perfil proteico de un alérgeno alimentario particular de diferentes especies, variedades y orígenes geográficos (Ferrer, 2017; Hengel, 2012).

En particular, el calentamiento y el procesamiento tecnológico de los alimentos podrían conducir a cambios en la estructura de la proteína alergénica que afecta a algunos determinantes antigénicos y sitios de unión de epítopos, lo que podría comprometer la eficiente recuperación y detección de los alérgenos en los análisis ELISA (Monaci et al., 2011). Adicionalmente, se han demostrado diferencias significativas en cuanto a cuantificación y detección de los diferentes kits ELISA

disponibles en el mercado (Ferrer, 2017).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del procesamiento industrial de galletas saladas en la cuantificación de leche y huevo comparando el desempeño analítico de tres kits ELISA de diferentes casas comerciales.

Los efectos del procesamiento estudiados fueron la geometría comercial de las galletas y el tratamiento térmico. Cabe resaltar que una de las fortalezas de este estudio es que el procesamiento de las galletas se realizó en una empresa de fabricación de galletas, por lo tanto, los equipos utilizados y las condiciones de proceso son las que se usan a nivel industrial.

2. Materiales y métodos

2.1 Materiales

El procesamiento de las galletas se llevó a cabo en la compañía de galletas Pozuelo DCR.SA. Esta planta se ubica en San José, Costa Rica. La empresa cuenta con un programa de Gestión de Alérgenos que va desde la recepción de la materia prima hasta el empaque, también cuenta con certificación FSSC 22000 y por estas razones fue seleccionada para trabajar esta investigación.

El estudio se realizó en la línea de producción de galletas tipo cracker. Se utilizó la formulación y el proceso de producción de las galletas tipo cracker tradicionales. La formulación base no cuenta entre sus ingredientes con leche y huevo, la misma fue contaminada con ambos alérgenos de forma intencional y bajo condiciones controladas para el experimento. Al analizar las masas crudas sin contaminar (blanco) no se detectaron ni cuantificaron leche ni huevo. Para el efecto de la geometría se utilizó el molde original y se comparó con un molde XL que tenía un área 26% más grande y las galletas tenían el doble de peso.

Las galletas de ambas geometrías se sometieron a las mismas condiciones térmicas. Se utilizaron hornos de fuego directo con un tiempo de horneado entre 2 y 3 minutos, a una temperatura entre 260 y 295 °C.

Los materiales de referencia usados fueron: NIST 8445 para alérgeno huevo (valor de fracción de masa de referencia = 48% +/- 1%) y para leche MoniQA MQA082016 certificado para alérgenos (17 mg/kg de proteína de leche).

2.2 Contaminación de las galletas

Debido a que las galletas se contaminaron en la línea de producción de la empresa y las cantidades que se producen son muy grandes, se decidió contaminar las galletas con el alérgeno una vez que estaban moldeadas antes de ser horneadas. Se tomó masa sin contaminar (se analizó como blanco), la masa cruda contaminada y las galletas para ambas geometrías. El cálculo de proteína se hizo por el peso de cada galleta.

Las masas se contaminaron a 200 ppm de huevo y 138 ppm de leche para el lote 1 y 100 ppm de proteína de huevo y 500 ppm de proteína de leche para los lotes 2, 3 y 4. Los resultados se reportaron como el porcentaje de alérgeno detectado en la galleta con respecto a la concentración detectada en la masa cruda para anular las otras fuentes de variación. El nivel de contaminación se definió de acuerdo con la disponibilidad del material de referencia al momento de realizar los ensayos. La formulación usada no contiene huevo o leche como ingredientes.

Para la contaminación de las muestras se elaboró una solución con los dos alérgenos en las concentraciones establecidas, se le agregó agua destilada, la cual fue contemplada en el cálculo de ppm. Se realizó una solución para cada lote (para asegurar mejor distribución del alérgeno). Cada solución se mezcló con Vortex por aproximadamente 10 minutos. Con una micropipeta y puntas nuevas para cada masa y galletas se procedió a contaminar adicionando la solución de acuerdo con el peso de las masas y de las galletas moldeadas. Posterior a la contaminación de las galletas solamente se efectuó el horneado.

2.3 Recolección y análisis de las muestras

Se recolectaron muestras de 4 lotes en semanas diferentes de producción de galletas tipo cracker en su geometría tradicional y con el molde de galleta tipo cracker XL. Cada lote contaminado se recolectó y procesó completo para asegurar que todo el alérgeno adicionado estaba en el lote recolectado. Las masas y galletas se empaclaron en bolsas plásticas y se trasladaron al laboratorio de química del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), ubicado en la sede Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, donde fue realizado el análisis de alérgenos mediante técnica ELISA.

Todas las muestras se mantuvieron a -80°C hasta su análisis. Las masas se liofilizaron debido a que con su humedad inicial (entre 27 y 31 g/100g) se dificultaba asegurar la distribución homogénea de los alérgenos en fresco. A cada muestra se le analizó la humedad por el método de análisis termo gravimétrico (TGA). Todos los análisis se realizaron en dos réplicas por muestra. Los resultados se presentan en porcentaje de recuperación en base seca para cada alérgeno partiendo de la cantidad analítica determinada en las masas crudas contaminadas.

Se siguieron los protocolos de extracción y análisis ELISA indicados por cada kit, aunque tienen sus particularidades. Se forma general, las pruebas ELISA siguen los pasos descritos en la Figura 7.

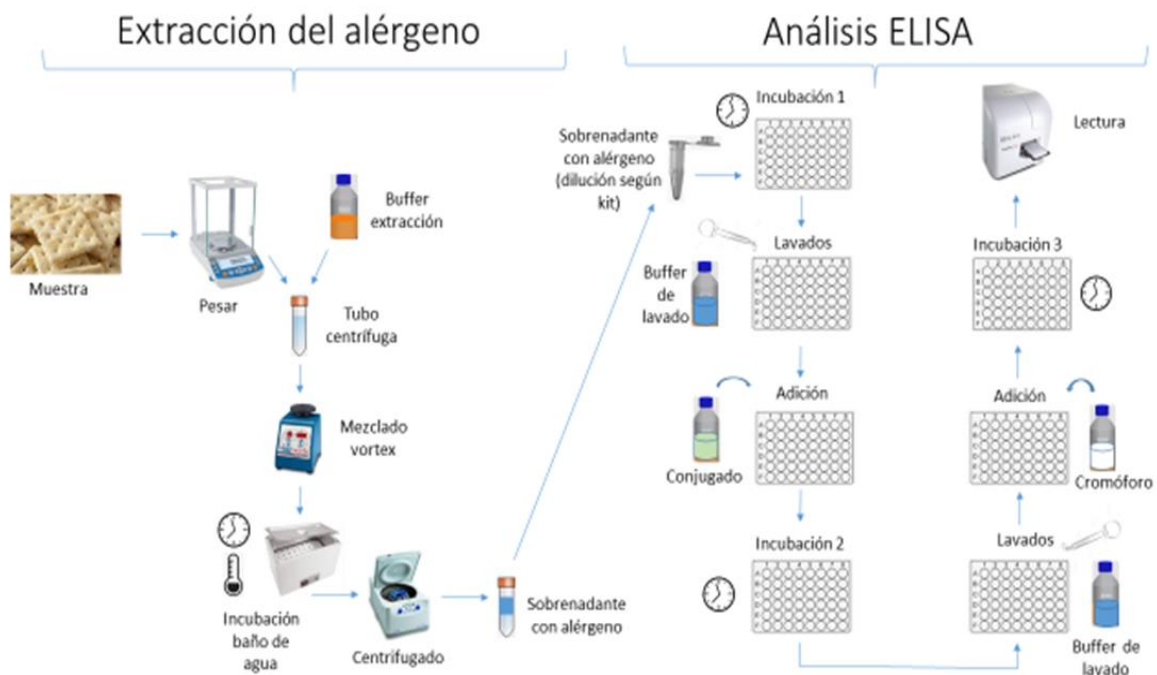


Figura 7. Pasos genéricos para efectuar análisis ELISA en alimentos. Elaborado por los autores con base en los pasos descritos en los kits para análisis de leche y huevo de R-biopharm, Veratox y 3M.

2.4 Métodos ELISA

Todos los kits analíticos utilizados fueron tipo ELISA sándwich. Se utilizaron tres kits comerciales para leche y tres para huevo, las características de cada kit se describen a continuación.

Kit ELISA RIDASCREEN® Fast Milk de R-Biopharm: especificidad para caseína y la β -lactoglobulina. La curva de calibración cubre un rango de 2.5 a 67.5 mg / kg de proteína de leche. El límite de detección es 0,7 ppm de proteína de leche, el límite de cuantificación es 2,5 ppm de proteína de leche y el rango de cuantificación es 2,5 a 67,5 ppm de proteína de leche en galletas procesadas (Weiss et al., 2016). El resultado se expresará en mg de proteína de leche / kg de galleta (ppm).

Kit Veratox Total Milk Allergen Quantitative Test de Neogen: especificidad para caseína y proteínas del suero. Presenta un límite de detección de 1 ppm de leche en polvo descremada y un límite de

cuantificación de 2,5–25 ppm de leche en polvo descremada. El resultado se expresa en ppm de leche en polvo descremada (Veratox, 2016).

Kit Leche bovina entera 3M: especificidad para proteína total de leche bovina. Presenta un límite de detección de 5.8 ppb y un límite de cuantificación de 1 ppm. El resultado se expresa en ppm de proteína total de leche bovina.

Kit Ridascreen Fast Ei/Egg de R-Biopharm: especificidad para proteínas de la clara de huevo ovoalbúmina y ovomucoide. Presenta un límite de detección: 0,10 mg / kg (ppm) de huevo en polvo entero (corresponde a 0.03 mg / kg (ppm) de proteína de clara de huevo), un límite de cuantificación: 0,5 mg / kg (ppm) de huevo en polvo entero (corresponde a 0,13 mg / kg (ppm) de proteína de clara de huevo). El resultado se expresa en ppm de huevo entero en polvo (Ferrer, 2017).

Kit Veratox for Egg Allergen Quantitative Test de Neogen: especificidad para Ovomucoide (Gal d1), Ovoalbúmina (gal d2), Ovotransferrina (Gal d3) y Lisozima. Presenta un límite de detección de 1 ppm de huevo seco entero y un límite de cuantificación de 2,5 ppm de huevo seco entero. El resultado se expresa en ppm de huevo seco entero.

Kit ELISA para proteína de clara de huevo 3M: especificidad para proteína de clara de huevo. Presenta un límite de detección de 2.1 ppb y un límite de cuantificación de 0.5 ppm. El resultado se expresa en ppm de proteína de clara de huevo.

En el Cuadro 9 se muestran las principales diferencias analíticas entre los kits utilizados en esta investigación.

Cuadro 9. Características de los kits analíticos utilizados para la determinación de los alérgenos leche y huevo.

Kit	Cantidad muestra (g)	Cantidad buffer por muestra	Extracción	Centrifugado	Dilución del kit	Condiciones Incubación de placa	Lavados	Longitud de onda de lectura (nm)
ELISA RIDASCREEN® Fast Milk R- biopharm	1	4 ml extracto 2 diluido + 16 ml de A-AEP	Incubación baño a 100°C/10 minutos Incubación baño a 60°C/10 minutos Usa aditivo	2500 g / 10 minutos	100 (contemplado en la curva de calibración)	10 minutos por incubación a temperatura ambiente	3 lavados por incubación	450
Veratox Total Milk Allergen Quantitative 8470 Neogen	5	125 ml + 1 cdta raza de aditivo	Incubación en baño de agua a 60°C por 15 minutos con agitación Usa aditivo	No tiene	No indica	10 minutos por incubación a temperatura ambiente	10 lavados por incubación	650
Leche bovina entera 3M	0.5	4.5 ml	Incubación a 60°C/25 minutos con agitación	5000 rpm y 7000 rpm (3000 x g) durante 20 o 30 segundos	100 (se debe aplicar en los cálculos)	30 minutos la incubación 1 y 10 minutos las posteriores. Todas con agitación	3 lavados por incubación	450

Kit	Cantidad muestra (g)	Cantidad buffer por muestra	Extracción	Centrifugado	Dilución del kit	Condiciones Incubación de placa	Lavados	Longitud de onda de lectura (nm)
RIDASCREEN®FAST Ei / Egg Protein R-biopharm	1	20 ml	Incubación baño a 60°C/10 minutos	2500 g / 10 minutos	20 (contemplado en la curva de calibración)	10 minutos por incubación a temperatura ambiente	3 lavados por incubación	450
Egg veratox Neogen	5	125 ml + 1 cda raza de aditivo	Incubación en baño de agua a 60°C por 15 minutos con agitación Usa aditivo	14000 rpm / 5 minutos	No indica	10 minutos por incubación a temperatura ambiente	5 lavados por incubación	650
Kit ELISA para Proteína de Clara de Huevo 3M	0.5	4.5 ml	Incubación a 60°C/25 minutos con agitación	5000 rpm y 7000 rpm (3000 x g) durante 20 o 30 segundos	100 (se debe aplicar en los cálculos)	30 minutos la incubación 1 y las posteriores 10 minutos. Todas con agitación	3 lavados por incubación	450

Las absorbancias medidas se incluyeron en cada uno de los softwares proveídos por las casas comerciales de los kits. En el caso de los kits de R-biopharm y Veratox – Neogen ambos softwares permiten incluir factores de dilución aplicados y dan el resultado en ppm considerando estos factores.

Con respecto a los kits Leche bovina entera y Kit ELISA para Proteína de Clara de Huevo de 3M se indica que tienen un factor de dilución de 100, más cualquier otra dilución que se realice. Esos datos no se pueden incluir en el software que provee la empresa; por lo tanto, se deben realizar los cálculos por aparte, además los resultados se deben pasar de ppb a ppm. Las fórmulas aplicadas para estos cálculos son las siguientes:

[1] ppb calculado por software a partir de absorbancia *100 = ppb contemplando dilución del kit

[2] ppb contemplando dilución del kit * factor de dilución adicional = ppb cuantificadas en la muestra

[3] ppb obtenida / 1000 = ppm cuantificada en la muestra

En cuanto a la calidad de los análisis, todas las pruebas ejecutadas con los kits R-biopharm y Veratox – Neogen presentaron un estadístico de desempeño Z satisfactorio (menor o igual a 2 o -2) con respecto al valor obtenido en la ronda interlaboratorios FAPAS 27204, 2017 para ambos alérgenos. Para los kits de 3M no se contaba con datos de este tipo, por lo que el parámetro de calidad fue que el porcentaje de cuantificación del material de referencia se encontrara en el rango aceptable para pruebas ELISA (50-150%) (Abbott et al., 2010).

2.5 Análisis estadístico

Para el efecto de la geometría se utilizó un diseño experimental estadístico de bloques completos al azar, donde el bloque estuvo representado por cada lote, que a su vez coincide con cada repetición. Se usó un arreglo factorial 3 x 2 con los siguientes factores: los Kits analíticos (3 kits diferentes) y las geometrías (2 geometrías diferentes). La variable respuesta fue el porcentaje de cuantificación con respecto a la concentración detectada en la masa cruda del alérgeno. Se realizó

un ANDEVA con un nivel de significancia del 5% y se evaluaron las significancias de los efectos simples de los factores y su interacción.

Para el efecto horneado, el diseño experimental estadístico fue de bloques al azar de un único factor, que corresponde al kit a tres niveles (3 kits diferentes) dado que se calculó la diferencia entre la masa cruda y el producto horneado (momento del proceso). La variable respuesta fue la diferencia en el porcentaje de cuantificación entre los momentos del proceso (antes y después del horneado) y se realizó un ANDEVA con un nivel de significancia del 5%.

Ambos experimentos se realizaron con cuatro repeticiones y cada repetición con dos réplicas. El análisis estadístico se realizó en el software JMP® Pro 9.0.2.

3. Resultados

Debido a que en todos los casos los kits detectaron los alérgenos, los resultados están planteados en función de la cuantificación. En el Cuadro 10 se muestran los resultados sobre el efecto de la geometría.

Cuadro 10. Porcentaje de cuantificación de los alérgenos huevo y leche con respecto a la masa cruda contaminada para las galletas con geometría tradicional y con geometría XL.

	Kit	R-Biopharm	Veratox	3M
Alérgeno	Tipo de galleta	Promedio ¹ ± IC (n=4)		
Huevo	Tradicional	4±2 ^a	4±2 ^a	5±2 ^a
	XL	3±2 ^b	2±1 ^b	3±2 ^b
Leche	Tradicional	50 ± 20 ^a	40±20 ^a	90±50 ^a
	XL	50±40 ^a	40±20 ^a	50±20 ^a

1/Para cada alérgeno por separado letras distintas en una misma columna denotan diferencia significativa

Para el efecto de la geometría sobre la cuantificación del alérgeno huevo se observa una diferencia significativa (P= 0.0228), independientemente del kit con el que se haga la cuantificación. Por

tanto, se encuentra que hay un efecto de la geometría en cuanto a disminución en la cuantificación del alérgeno en la galleta con geometría XL con respecto a la tradicional, que se manifiesta de igual forma en los 3 kits.

No se encontró diferencia significativa para la geometría en la cuantificación del alérgeno leche ($P=0.4335$) ni en la interacción entre el tipo de galleta y el kit utilizado para la medición ($P=0.4302$). La potencia obtenida en la prueba ($1-\beta= 1.0000$) indica que hay una alta probabilidad de que la no diferencia exista y esto no se debe a la variabilidad de los datos.

En el Cuadro 11 se observan los resultados del efecto del horneado sobre la cuantificación de leche y huevo.

Cuadro 11. Diferencia en el porcentaje de cuantificación entre los momentos del proceso (masa cruda y galleta horneada) para los alérgenos leche y huevo.

Alérgeno	Kit	R-Biopharm	Veratox	3M
	Tipo de galleta	Promedio ¹ ± IC (n=4)		
Huevo	Tradicional	96±2 ^a	96±2 ^a	95±2 ^a
Leche	Tradicional	49 ± 20 ^a	63±20 ^a	14±50 ^a

1/Para cada alérgeno por separado, letras distintas en una misma columna denotan diferencia significativa

Para el efecto del momento del proceso sobre la cuantificación de huevo no se encontró diferencia significativa entre los kits ($P=0.4245$), y esto no se debe la variabilidad de los datos (potencia de prueba $1-\beta= 1.0000$). Se puede afirmar que el efecto del horneado se presenta por igual independientemente del kit utilizado. Cabe resaltar que la cuantificación de huevo posterior al horneado es bastante baja (entre 4 y 5%).

Con respecto a la cuantificación de leche posterior al horneado, no se encontró diferencia entre los kits ($P=0.1682$) pero, en este caso, al calcular la potencia de la prueba ($1-\beta= 0.1079$), se encuentra que la no significancia se debe a la variabilidad de los datos entre los kits.

4. Discusión

La geometría comercial de los productos es un aspecto del procesamiento poco estudiado en cuanto a la cuantificación de los alérgenos. Gomaa & Boye (2013) estudiaron el efecto del tamaño de la galleta en la detección y cuantificación de caseína, huevo, gluten y soya. Encontraron que, de forma general la recuperación de los alérgenos decrece al disminuir el tamaño de la galleta. El efecto del horneado pareciera ser más importante que el de la geometría por sí sola, debido a que los resultados obtenidos relacionados con el tamaño de la galleta los atribuyeron a que la temperatura en el centro de la galleta aumenta al disminuir el tamaño (diámetro y peso, mantuvieron el espesor) y por eso se dan las diferencias entre los diferentes tamaños.

En el caso del presente estudio, se identificó que la mayor recuperación de huevo se dio en galleta con geometría tradicional, cuya área y peso es menor que la XL. Aunque en este caso las galletas más pequeñas fueron las que tuvieron mejor cuantificación de huevo, los resultados son congruentes con lo encontrado por Gomaa & Boye (2013) en cuanto a que las que más afectación tuvieron en la cuantificación fueron las que se expusieron a temperaturas más altas.

Lo anterior se debe a que, al haberse realizado el experimento en condiciones industriales, la distribución de calor no es totalmente homogénea y este efecto se puede ver incrementado en las galletas de mayor tamaño, ya que su posicionamiento deja espacios más amplios en las zonas externas de la banda y entre cada galleta (Figura 8), por lo que estas se exponen más a los flujos de aire caliente que las galletas con geometría tradicional, considerando que las condiciones de horneado no variaron en cuanto a temperatura y tiempo entre tamaños de galletas. Por otro lado, para la cuantificación del alérgeno leche, se encontró que no hay un efecto significativo de la geometría de la galleta.

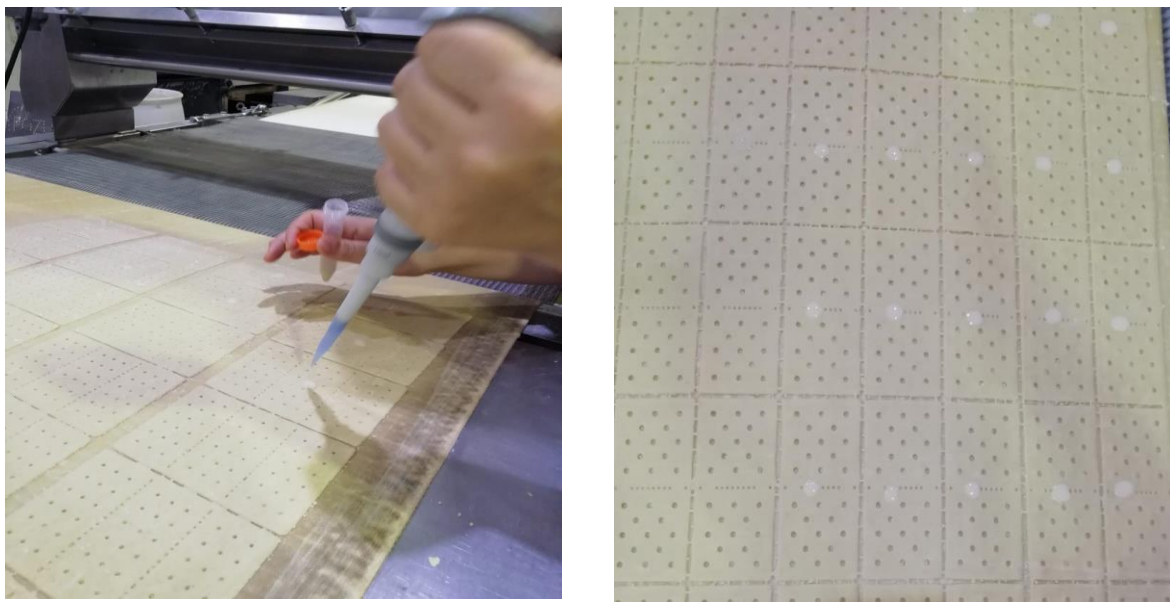


Figura 8. Moldeado de galletas en las bandas de acuerdo con su geometría

Un dato importante con respecto al estudio de Gomaa & Boye (2013) es que estos autores hornearon las galletas de diferente tamaño durante 10, 15 y 25 minutos y las mayores diferencias las encontraron en los tiempos de horneado mayores. En el presente estudio el tiempo de horneado fue entre 2 y 3 minutos, un tiempo bastante menor que podría contribuir a que el efecto de la geometría de la galleta sea menor.

Con respecto a la cuantificación de huevo posterior al horneado, no se encontró diferencia entre los kits, pero es muy evidente la baja cuantificación de este alérgeno posterior al horneado en todos los kits estudiados. Esta baja cuantificación ha sido descrita en varios estudios (Gomaa & Boye, 2013; Khuda et al., 2012; Török et al., 2014). Khuda et al. (2012) evaluaron la detección y cuantificación de huevo con 5 kits ELISA diferentes, dentro de los cuales se encuentran dos marcas comerciales evaluadas en el presente estudio, y encontraron que, en galletas dulces, ninguno de los kits cuantificó adecuadamente la proteína de huevo en las galletas horneadas en términos de las concentraciones medias medidas y el porcentaje de recuperación. Además, identificaron que los niveles detectados de proteína de huevo se redujeron drásticamente después de 30 minutos de tiempo de horneado, con recuperaciones del kit que variaron del 3,5 al 20,5% en promedio.

En el presente estudio, durante el horneado, se perdió la cuantificación de más del 95% de huevo con los 3 kits evaluados, lo cual es congruente con lo encontrado por Khuda et al. (2012). Gomaa & Boye (2013) evaluaron dos kits ELISA para cuantificación de huevo en galletas, encontrando para un kit recuperaciones del 8 al 48% (se pierde entre un 92 y 52% de cuantificación) y para el otro de 0 a 4% (se pierde entre un 100 y 96% de cuantificación), dependiendo del tratamiento térmico (10, 15 y 25 minutos).

La efectividad de los kits ELISA está limitada a dos factores determinantes, la extracción de la proteína de la matriz y el reconocimiento por parte del anticuerpo del alérgeno (Hayward et al., 2010). Los procesos térmicos de los alimentos son los que más influyen en la cuantificación de los alérgenos del huevo, debido al reconocimiento reducido de la proteína nativa modificada por los anticuerpos y / o la solubilidad disminuida de las proteínas, lo que conlleva a una menor cuantificación de la proteína (European Food Safety Authority (EFSA), 2014).

Se han estudiado las dificultades de los reactivos de extracción de la proteína alérgena de los kits ELISA en matrices procesadas, como es el caso de las galletas (Nguyen et al., 2019) y es un tema a considerar en la mejora de los kits ELISA comerciales para cuantificación de huevo. Sobre la sustancia de extracción, solamente un kit especifica utilizar buffer de solución salina con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés), los otros dos kits no indican en el inserto el tipo de sustancia, pero esta es la más utilizada por kits ELISA a nivel comercial (Senyuva et al., 2019) y, por la poca cuantificación posterior al tratamiento térmico, se podría presumir que la sustancia de extracción podría ser una de las limitantes.

Con respecto al reconocimiento de la proteína alérgena, generalmente los kits comerciales utilizan anticuerpos policlonales, tal es el caso de los utilizados en este estudio. Recientemente se ha estudiado el efecto de los anticuerpos monoclonales, encontrando algunas ventajas como su homogeneidad, consistencia y alta especificidad en comparación con los anticuerpos policlonales. Tal es el caso del estudio desarrollado por Kato et al. (2015), en el que obtuvieron porcentajes de recuperación para huevo en productos procesados entre 61.6–89.3%, en el kit con anticuerpo monoclonal, y, aunque ninguna de las matrices evaluadas era un producto horneado, se abre una interrogante sobre el uso de este tipo de anticuerpos en los kits comerciales ELISA. Este kit de

detección y cuantificación de huevo se estaba validando para ser utilizado como de uso oficial según la regulación japonesa, que para huevo había encontrado con otros kits poca recuperación en matrices procesadas y discordancia entre los resultados de diferentes kits, lo que complicaba la definición de un resultado oficial a nivel regulatorio (Al & Of, 2018).

Uno de los principales avances en la regulación japonesa sobre alérgenos alimentarios es el establecimiento de métodos ELISA oficiales, resultado de mucha investigación y logrando para huevo una nueva versión del ensayo que incorporó una solución de extracción de muestra que utiliza el tenso activo dodecilsulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés) y el reactivo reductor 2-mercaptoetanol (2ME), que mejoran la solubilización de las proteínas de alérgenos alimentarios de una matriz alimentaria. El nuevo procedimiento de extracción permitió la detección y cuantificación de huevo en alimentos altamente procesados (Al & Of, 2018).

Otro aspecto por resaltar es que, a pesar de la poca cuantificación del alérgeno huevo en las galletas estudiadas, la variabilidad natural, que se encontró en los experimentos con huevo entre los 3 kits, fue muy controlada en comparación con lo que se obtuvo para leche.

Sobre el efecto del horneado en la cuantificación del alérgeno leche, es bien conocido que los kits ELISA generan resultados muy variables, en este caso se observó mucha variabilidad en la cuantificación. Esto debido a la cantidad de factores que pueden interferir en los resultados, como se ha observado a lo largo de esta investigación. La misma variabilidad de los kits no permite diferenciar entre ellos; sin embargo, es claro que la cuantificación del alérgeno baja después del horneado. El solo hecho de que el rango de porcentaje de recuperación aceptable para kits ELISA sea de 50 a 150% (Abbott et al., 2010) es un indicador de la alta variabilidad que se puede presentar.

Se ha observado que los kits de ELISA comerciales para análisis cuantitativos emplean diferentes sustancias de extracción y procedimientos de calibración, difieren en la calidad de los anticuerpos utilizados y los resultados varían entre las marcas comerciales y los lotes. Las principales limitaciones incluyen efectos de la matriz, extracción insuficiente de la proteína, especificidad insuficiente debido a reacciones cruzadas y reproducibilidad insuficiente de los resultados

(European Food Safety Authority (EFSA), 2014). Estas limitantes pueden influir en los resultados que se obtuvieron con los kits de leche.

Resultados similares a los encontrados en esta investigación se observaron en el estudio de Gomaa & Boye (2013), en el que se evaluó la recuperación de caseína posterior al horneado en galletas dulces con dos kits ELISA y uno de citometría de flujo. El rango de recuperación fue del 89% al 35% para el kit Ridascreen, del 77% al 21% para el kit Veratox y del 75% al 19% para la citometría de flujo para la caseína, lo que demuestra una alta variabilidad entre la recuperación encontrada. Como se observa, la variabilidad no solo se presenta con las pruebas ELISA, de igual forma ocurre con otros métodos analíticos.

Aunque el kit Veratox y la citometría de flujo proporcionaron recuperaciones más bajas que el kit Ridascreen, las diferencias no fueron estadísticamente significativas excepto para las muestras medianas y pequeñas horneadas durante 15 min. Lo anterior es congruente con lo que se encontró en la presente investigación sobre la no diferencia entre los kits para leche.

Khuda et al. (2012), también encontraron alta variabilidad en la cuantificación de caseína y β -lactoglobulina al evaluar 5 kits ELISA en galletas dulces; los porcentajes de recuperación estuvieron en el rango de 2 a 68% para caseína y de 0 a 48% para β -lactoglobulina en galletas horneadas por 25 minutos. Cabe indicar que los porcentajes de recuperación más altos reportados por Khuda et al. (2012), corresponden a la marca comercial Morinaga, la cual no fue evaluada en esta investigación debido a que no cuenta con distribución directa en Costa Rica, por lo que se debe importar y esto aumenta su costo y complica el acceso para la industria.

Se ha descrito que los cambios en las proteínas alergénicas (modificaciones químicas y de conformación) que provocan una disminución en su cuantificación ocurren en los primeros minutos del horneado. Además, al igual que con el huevo, hay una disminución de la solubilidad de las proteínas. Es bien sabido que es probable que el procesamiento de alimentos afecte la integridad de las proteínas alergénicas, induciendo modificaciones químicas y cambios en su conformación tridimensional (Monaci et al., 2011).

Algo que resulta interesante es el hecho de que las pruebas de alérgenos de rutina realizadas por la industria alimentaria se basan en kits de prueba comercializados y, con frecuencia, los proveedores brindan muy pocos detalles de sus características, debido a que se trata de información patentada (Senyuva et al., 2019). De hecho, la oferta de kits ELISA para leche y huevo en Costa Rica es limitada y la mayoría de los kits contiene poca información de importancia analítica en los protocolos insertos en cada kit. Por ejemplo, no indican si el anticuerpo usado es mono o policlonal, solamente dos kits de los seis estudiados indicaban sobre el tipo de sustancia de extracción y esto limita poder tomar mejores decisiones sobre la selección de los kits en función de las matrices que se van a analizar.

Existe el cuestionamiento de que si la no detección o la disminución en la detección del alérgeno implica una reducción en su capacidad alergénica. Lamentablemente no se puede afirmar que esa disminución en la detección implique una disminución de la capacidad alergénica de la proteína (Downs & Taylor, 2010; European Food Safety Authority (EFSA), 2014).

En algunos casos se ha visto una mejora de la tolerancia en personas con alergias alimentarias para alimentos que han tenido algún procesamiento térmico (Liu et al., 2013), especialmente horneado (Bavaro et al., 2019), pero esto no se puede inferir para todas las personas. Por esto es que es muy importante que los métodos de detección y cuantificación de alérgenos en alimentos sean fiables debido a que el resultado de un análisis influye en la decisión de etiquetado de trazas, así como en validaciones de limpieza de superficies, además de ser la fuente de información para establecer el cumplimiento a nivel regulatorio nacional e internacional.

5. Conclusiones

Se encontró que hay un efecto de la geometría de la galleta sobre la cuantificación del alérgeno huevo independientemente del kit que se utiliza para la cuantificación, siendo mayor en la galleta tipo cracker tradicional. Este efecto está estrechamente ligado al horneado de las galletas y no se observó para el alérgeno leche, por lo que se puede concluir que las proteínas alergénicas del huevo son más sensibles a la variación de la geometría de las galletas que las correspondientes de

la leche con los kits ELISA utilizados en el estudio

Con respecto al efecto del horneado, no se encontraron diferencias significativas entre los kits de cuantificación de huevo, ni tampoco en los de leche, pero por razones diferentes. En los kits de análisis del alérgeno huevo la no diferencia se debe a que todos detectaron cantidades muy bajas del alérgeno, mientras que en el caso de la leche la no diferencia se debe a la gran variabilidad de los datos obtenidos con los diferentes kits. Ambos resultados sobre el efecto del horneado requieren atención, esto porque pueden representar un riesgo para la identificación de alérgenos en alimentos en la industria alimentaria y, por ende, errores en la información que se le brinda al consumidor sobre la presencia de estos alérgenos en los productos.

Cuando se debe elegir un kit ELISA para trabajar se debe buscar información técnica que asegure que las características del kit son congruentes con los requerimientos y se pueda demostrar su eficacia, esto debido a que todos los kits evaluados en este estudio indican que se pueden utilizar en matrices procesadas; sin embargo, se comprobó que diversos factores afectan la cuantificación con los diferentes kits para la matriz evaluada.

Las casas comerciales deben brindar mayor información técnica sobre los reactivos de extracción, los anticuerpos utilizados y las particularidades de cada kit, con el fin de poder tomar mejores decisiones a la hora de elegir un ensayo para detección y cuantificación de alérgenos en alimentos.

6. Agradecimientos

A la compañía Pozuelo DCR.SA, que financió parte de esta investigación, al posgrado en Ciencia de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, que aportó una cantidad de recursos económicos y humanos sin la cual la investigación no hubiera sido posible. Al PhD. Eric Wong quien contribuyó en el análisis estadístico de los datos y brindó guía durante el proceso de definición del diseño experimental.

7. Referencias

- Abbott, M., Hayward, S., Ross, W., & Godefroy, F. (2010). Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices. *Journal of AOAC International*, 93(2), 442–450.
- Al, H. E. T., & Of, O. (2018). *Japanese Food Allergen Labeling Regulation : An Update*. 8–14. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0389>
- Bavaro, S. L., De Angelis, E., Barni, S., Pilolli, R., Mori, F., Novembre, E. M., & Monaci, L. (2019). Modulation of milk allergenicity by baking milk in foods: A proteomic investigation. *Nutrients*, 11(7), 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu11071536>
- Downs, M. L., & Taylor, S. L. (2010). Effects of thermal processing on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of milk residues in a model food matrix. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10085–10091. <https://doi.org/10.1021/jf101718f>
- European Food Safety Authority (EFSA). (2014). Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients. *EFSA Journal*, 12(11). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3894>
- Ferrer, P. R. De. (2017). Allergens declaration and detection of milk , soy and egg traces in foods of frequent consumption by children. *Actualización En Nutrición*, 18(3), 72–83.
- Garber, E. A. E., Cho, C. Y., Rallabhandi, P., Nowatzke, W. L., Oliver, K. G., Venkateswaran, K. V., & Venkateswaran, N. (2020). Multi-laboratory validation of the xMAP-Food Allergen Detection Assay: A multiplex, antibody-based assay for the simultaneous detection of food allergens. In *PLoS ONE* (Vol. 15, Issue 7 July). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234899>
- Gomaa, A., & Boye, J. I. (2013). Impact of thermal processing time and cookie size on the detection of casein, egg, gluten and soy allergens in food. *Food Research International*, 52(2), 483–489. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.019>
- Hayward, M., Ross, S., Godefroy, W., Benrejeb Ulberth, S., Van Hengel, F., Roberts, A. J., Akiyama, J., Popping, H., Yeung, B., Wehling, J. M., Taylor, P., Poms, S. L., & Ernest Delahaut, R. (2010). Title: Validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods: community

- guidance and best practices. *Journal of AOAC International*, 93(442).
- Hengel, V. (2012). *Appendix M: Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices*. 3, 1–8.
- Kato, S., Yagi, T., Kato, A., Yamamoto, S., Akimoto, M., & Arihara, K. (2015). Interlaboratory Study of ELISA Kits for the Detection of Egg. *Journal of AOAC International*, 98(3), 810–817. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.14-219>
- Khuda, S., Slate, A., Pereira, M., Al-Taher, F., Jackson, L., Diaz-Amigo, C., Bigley, E. C., Whitaker, T., & Williams, K. M. (2012). Effect of processing on recovery and variability associated with immunochemical analytical methods for multiple allergens in a single matrix: Sugar cookies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(17), 4195–4203. <https://doi.org/10.1021/jf3001839>
- Lee, A. J., Thalayasingam, M., & Lee, B. W. (2013). Food allergy in Asia: how does it compare? *Asia Pacific Allergy*, 3(1), 3–14. <https://doi.org/10.5415/apallergy.2013.3.1.3>
- Liu, X., Feng, B. S., Kong, X., Xu, H., Li, X., Yang, P. C., & Liu, Z. (2013). Food-cooking processes modulate allergenic properties of Hen's egg white proteins. *International Archives of Allergy and Immunology*, 160(2), 134–142. <https://doi.org/10.1159/000339396>
- Loh, W., & Tang, M. L. K. (2018). The epidemiology of food allergy in the global context. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(9). <https://doi.org/10.3390/ijerph15092043>
- López, M. C. (2017). Food Allergen Labeling: A Latin American Approach. *Journal of AOAC International*, 101(1), 14–16. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0382>
- Ministerio de Industria y Comercio de Costa Rica. (2012). *Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.01.07:10 Etiquetado General de los Alimentos Previamente Envasados (Preenvasados)* (pp. 1–18). Disponible en: http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?par_am1=NRTC&nValor1=1&nValor2=84388&nValor3=0&strTipM=TC

- Monaci, L., Brohée, M., Tregogat, V., & Van Hengel, A. (2011). Influence of baking time and matrix effects on the detection of milk allergens in cookie model food system by ELISA. *Food Chemistry*, 127(2), 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.113>
- Nguyen, A. V., Williams, K. M., Ferguson, M., Lee, D., Sharma, G. M., Do, A. B., & Khuda, S. E. (2019). Enhanced quantitation of egg allergen in foods using incurred standards and antibodies against processed egg in a model ELISA. *Analytica Chimica Acta*, 1081, 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.030>
- Programa Federal de Control de Alimentos de Argentina. (2017). *Directrices para el rotulado de alérgenos y sustancias capaces de producir reacciones adversas en individuos susceptibles de productos alimenticios envasados*. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/directrices_rotulado_alergenos.pdf
- Sánchez, A., Sánchez, J., & Cardona, R. (2019). Results and limitations of epidemiological studies on food allergy. Focus on tropical countries. *Revista Alergia Mexico*, 66(1), 9–17. <https://doi.org/10.29262/ram.v66i1.340>
- Senyuva, H. Z., Jones, I. B., Sykes, M., & Baumgartner, S. (2019). A critical review of the specifications and performance of antibody and DNA-based methods for detection and quantification of allergens in foods. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 36(4), 507–547. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1579927>
- Surojanametakul, V., Khaiprapai, P., Jithan, P., Varanyanond, W., Shoji, M., Ito, T., & Tamura, H. (2012). Investigation of undeclared food allergens in commercial Thai food products. *Food Control*, 23(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.013>
- Török, K., Hajas, L., Horváth, V., Schall, E., Bugyi, Z., Kemény, S., & Tömösközi, S. (2015). Identification of the factors affecting the analytical results of food allergen ELISA methods. *European Food Research and Technology*, 241(1), 127–136. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2441-y>
- Török, K., Horváth, V., Horváth, Á., Hajas, L., Bugyi, Z., & Tömösközi, S. (2014). Investigation of

incurred single- and multi-component model food matrices for determination of food proteins triggering allergy and coeliac disease. *European Food Research and Technology*, 239(6), 923–932. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2289-6>

Veratox. (2016). *Veratox for total milk allergen*. 5333, 1. <http://www.neogen.com/FoodSafety/pdf/ProdInfo/V-TotalMilk.pdf>

Weiss, T., Lacorn, M., Flannery, J., Benzinger, M. J., Bird, P., Crowley, E. S., Goins, D., Agin, J. R., Gilani, S., Poepping, B., & Garber, E. (2016). Validation of the RIDASCREEN[®] FAST Milk Kit. *Journal of AOAC International*, 99(2), 495–503. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-0290>

Capítulo 6. Observaciones generales

Este capítulo incluye información que se considera de valor para el lector o para futuras investigaciones de este tipo.

6.1 Contaminación de las galletas

Sobre la contaminación de las galletas, éste paso implicó todo un reto. En el Anexo 1 se muestra el protocolo de contaminación de las galletas en el escenario real de producción. La única parte del proceso en la que se podía tener certeza sobre los gramos de masa a contaminar fue una vez que estaban las galletas moldeadas. Esto era sumamente importante porque se requería contaminar a una concentración de mg/kg (ppm) conocida. El cálculo se realizó de acuerdo con la concentración de proteína en el material de referencia y el peso de las galletas moldeadas.

Por aspectos logísticos, las pruebas preliminares no se realizaron en el escenario industrial, ya que cada prueba implicaba parar la línea de producción por aproximadamente 1 hora y 30 minutos, por lo tanto, era muy difícil predecir algunos aspectos importantes sobre la contaminación de las galletas.

Las muestras se contaminaron adicionando una gota con micropipeta en el centro de la galleta con la cantidad de μl calculada (Anexo 2). Cada lote contaminado se recolectó y procesó completo para asegurar que todo el alérgeno adicionado estaba en el lote recolectado. Las muestras una vez procesadas se mantuvieron en temperaturas ultra bajas (-80°C) hasta el momento del análisis.

Las masas crudas eran difíciles de procesar para los análisis y se detectaron problemas en cuanto a distribución del alérgeno; por lo tanto, se procedió a liofilizarlas. Esto contribuyó a que se pudieran procesar mejor y se mejoró la recuperación de los alérgenos.

6.2 Aspectos analíticos

En el Anexo 3 se encuentra el detalle de los porcentajes de cuantificación para cada tipo de galleta evaluada en este estudio y en el Anexo 4 el Cuadro con la diferencia en los porcentajes de cuantificación entre el momento del proceso para cada lote.

Capítulo 7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

Todos los kits fueron capaces de detectar los alérgenos estudiados en todas las muestras analizadas por lo que los efectos encontrados son sobre la capacidad de cuantificación.

Para el caso de la cuantificación del alérgeno leche, no se puede establecer que hay un efecto de la formulación porque los kits muestran diferentes tendencias. Sin embargo, se puede concluir que el efecto se puede presentar en algunos kits. Con la matriz estudiada se concluye que algún componente (probablemente la fibra) de la formulación de galleta tipo cracker integral en el kit de R-Biopharm tiene un efecto de sobreestimación de la cuantificación del alérgeno leche.

Con respecto a huevo, se concluye que sí hay un efecto de la formulación sobre la cuantificación, posiblemente atribuible a la cantidad de fibra de la formulación de galleta tipo cracker integral en comparación con la galleta tipo cracker tradicional. También es importante concluir sobre la poca cuantificación de huevo en matrices procesadas, como ocurrió en este estudio, y la necesidad de continuar mejorando los métodos analíticos.

Existe un efecto de la geometría de la galleta sobre la cuantificación del alérgeno huevo independientemente del kit que se utiliza para la cuantificación, observándose que la cuantificación fue mayor en la galleta tipo cracker tradicional. Este efecto está estrechamente ligado al horneado de las galletas y la distribución de calor durante la cocción, pero no fue observado para el alérgeno leche. Se puede concluir que el huevo es más sensible a la variación de

la geometría que la leche en galletas saladas, con los kits utilizados en el estudio.

Con respecto al efecto del horneado, no se encontraron diferencias entre los kits de cuantificación de huevo, ni tampoco en los de leche. La diferencia está en que en los kits de huevo la no diferencia se debe a que todos detectaron cantidades muy bajas del alérgeno, mientras que en el caso de la leche la no diferencia se debe a la gran variabilidad de los datos obtenidos con los diferentes kits. Ambos resultados sobre el efecto del horneado requieren atención, esto porque pueden representar un riesgo para la identificación de alérgenos en alimentos en la industria alimentaria.

Cuando se debe elegir un kit ELISA para trabajar se debe buscar información técnica que asegure que las características del kit son congruentes con los requerimientos, por ejemplo, para matrices procesadas. Las casas comerciales deben brindar más información técnica sobre los reactivos de extracción, los anticuerpos utilizados y las particularidades de cada kit, con el fin de poder tomar mejores decisiones a la hora de elegir un ensayo para detección y cuantificación de alérgenos en alimentos.

Los kits ELISA tienen limitaciones, sin embargo, son el método de alcance generalizado para detección y cuantificación de alérgenos en alimentos. El hecho de que todos los kits fueron capaces de detectar la presencia de los alérgenos estudiados es un resultado importante para la industria alimentaria, ya que muchas veces se utiliza este parámetro para decidir sobre el etiquetado de alérgenos y velar por el cumplimiento de legislación en cuanto a contenido máximo permitido para algunas declaraciones de “trazas” o “libre de”. Es necesario continuar desarrollando investigación sobre factores que afectan la cuantificación y buscar alternativas para mejorarlos con el fin de disminuir el riesgo para los consumidores con alergias alimentarias.

A lo largo de esta investigación se evidencia la necesidad de tener resultados analíticos veraces, que contribuyan a que la industria de alimentos tenga más confianza en los datos generados mediante la verificación con los análisis realizados mediante pruebas ELISA y, por lo tanto, la información que se brinda al consumidor con alergia alimentaria mediante el etiquetado sea mucho más real.

7.2 Recomendaciones

7.2.1 Para futuras investigaciones

Estudiar el efecto de la fibra en la detección y cuantificación de alérgenos en alimentos mediante pruebas ELISA.

Estudiar otras metodologías para contaminar las muestras con los alérgenos, por ejemplo, rociado tipo "spray" para asegurar una mejor distribución del alérgeno en las galletas y evitar la pérdida de éste. Esta recomendación surge porque se observó que, en la línea de producción, en algunos casos, quedaban rastros de la solución debajo de las galletas y esto se debe a que se aplicó una gota en un punto de la galleta.

La humedad y textura de las matrices se debe considerar como aspecto relevante para la distribución del alérgeno y el procesamiento de las muestras y, como en este caso, se debe considerar la posibilidad de liofilizar las muestras para prepararlas para los análisis.

7.2.2 Para la industria alimentaria y laboratorios

Los resultados de las pruebas ELISA están condicionados a muchos factores, lo cual implica que se deben considerar aspectos básicos para la veracidad de los resultados. Poder incluir este tipo de pruebas como parte de un sistema de gestión de calidad requiere un análisis exhaustivo de aspectos como la matriz o matrices con las que se trabaja, el alérgeno de interés y las características de los kits, de modo que se elija la opción que brinde los resultados más cercanos a la realidad.

Los laboratorios que realizan este tipo de análisis en alimentos deben considerar las

particularidades logísticas definidas en los protocolos de cada kit, como el tamaño de muestra, los equipos necesarios, el número de pruebas que se pueden realizar con cada kit y la vida útil de los mismos, así como realizar verificaciones comparativas con otros laboratorios que les permita validar los métodos y asegurar resultados confiables.

Cuando una industria contrate un laboratorio para realizar estos análisis debe solicitar información sobre la calidad analítica de los mismos; por ejemplo, acreditaciones de los métodos, materiales de referencia utilizados e información sobre el kit que utilizan para el alérgeno y la justificación de por qué se considera que ese kit es la mejor opción.

Se recomienda a la Compañía de Galletas Pozuelo DCR.SA, hacer un estudio comparativo entre el efecto del horneado sobre la cuantificación de alérgenos en el extremo y centro de la banda de horneado. En tanto no se haya realizado este estudio, se les recomienda que la toma de muestras de galletas para análisis de alérgenos con pruebas ELISA se tomen del área central de la banda transportadora de horneado y no de los extremos, debido a que las galletas de la parte central deberían verse menos afectadas por el calor.

7.2.3 A nivel regulatorio

Con tanta variabilidad entre los kits es difícil establecer un resultado oficial a nivel regulatorio, por lo que es importante oficializar métodos analíticos y kits comerciales para poder realizar vigilancia en cuanto al cumplimiento de la regulación de alérgenos en alimentos en el país. Los reglamentos deben ser claros sobre los métodos analíticos permitidos, las tolerancias y los requerimientos analíticos que deben cumplir los kits comerciales.

Capítulo 8. Bibliografía

- Abbott, M., Hayward, S., Ross, W., & Godefroy, F. (2010). Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices. *Journal of AOAC International*, 93(2), 442–450.
- Al, H. E. T., & Of, O. (2018). *Japanese Food Allergen Labeling Regulation : An Update*. 8–14. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0389>
- Alves, R. C., Barroso, M. F., González-García, M. B., Oliveira, M. B. P. P., & Delerue-Matos, C. (2016). New Trends in Food Allergens Detection: Toward Biosensing Strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(14), 2304–2319. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.831026>
- Barlow, S. M., Boobis, A. R., Bridges, J., Cockburn, A., Dekant, W., Hepburn, P., Houben, G. F., König, J., Nauta, M. J., Schuermans, J., & Bánáti, D. (2015). The role of hazard- and risk-based approaches in ensuring food safety. *Trends in Food Science and Technology*, 46(2), 176–188. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.007>
- Bavaro, S. L., De Angelis, E., Barni, S., Pilolli, R., Mori, F., Novembre, E. M., & Monaci, L. (2019). Modulation of milk allergenicity by baking milk in foods: A proteomic investigation. *Nutrients*, 11(7), 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu11071536>
- Castillo, D. S., & Cassola, A. (2017). Novel sensitive monoclonal antibody based competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of raw and processed bovine beta-casein. *PLoS ONE*, 12(7), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182447>
- Clare Mills, E. N., Adel-Patient, K., Bernard, H., De Loose, M., Gillard, N., Huet, A. C., Larré, C., Nitride, C., Pilolli, R., Tranquet, O., Pouke, C. Van, & Monaci, L. (2019). Detection and quantification of allergens in foods and minimum eliciting doses in food-Allergic individuals (ThRAII). *Journal of AOAC International*, 102(5), 1346–1353. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0063>
- Crevel, R. W. R., Baumert, J. L., Baka, A., Houben, G. F., Knulst, A. C., Kruizinga, A. G., Luccioli, S., Taylor, S. L., & Madsen, C. B. (2014). Development and evolution of risk assessment for food allergens. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British*

- Industrial Biological Research Association*, 67, 262–276.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.032>
- Downs, M. L., & Taylor, S. L. (2010). Effects of thermal processing on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of milk residues in a model food matrix. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10085–10091. <https://doi.org/10.1021/jf101718f>
- Dunlop, J. H., & Keet, C. A. (2018). Epidemiology of Food Allergy. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 38(1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2017.09.002>
- Echeverría-Zudaire, L., García-Magán, C., & del Río Camacho, G. (2019). Alergia a huevo de gallina. *Protocolos Diagnósticos y Terapéuticos En Pediatría*, Protocolos(2), 217–235. https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/16_alergia_huevo.pdf
- European Food Safety Authority (EFSA). (2014). Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients. *EFSA Journal*, 12(11). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3894>
- Fæste, C. K., Løvberg, K. E., Lindvik, H., & Egaas, E. (2007). Extractability, stability, and allergenicity of egg white proteins in differently heat-processed foods. *Journal of AOAC International*, 90(2), 427–436. <https://doi.org/10.1093/jaoac/90.2.427>
- Ferrer, P. R. De. (2017). Allergens declaration and detection of milk , soy and egg traces in foods of frequent consumption by children. *Actualización En Nutrición*, 18(3), 72–83.
- Fiocchi, A., Dahda, L., Dupont, C., Campoy, C., Fierro, V., & Nieto, A. (2016). Cow's milk allergy: towards an update of DRACMA guidelines. *World Allergy Organization Journal*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40413-016-0125-0>
- FSSC Foundation. (2019). *FSSC 22000, versión 5*. https://www.fssc22000.com/wp-content/uploads/19.1217-FSSC-22000-Scheme-Version-5_incl-content_ES.pdf
- Garber, E. A. E., Cho, C. Y., Rallabhandi, P., Nowatzke, W. L., Oliver, K. G., Venkateswaran, K. V., & Venkateswaran, N. (2020). Multi-laboratory validation of the xMAP-Food Allergen Detection Assay: A multiplex, antibody-based assay for the simultaneous detection of food allergens. In *PLoS ONE* (Vol. 15, Issue 7 July). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234899>
- Gomaa, A., & Boye, J. I. (2013). Impact of thermal processing time and cookie size on the detection of casein, egg, gluten and soy allergens in food. *Food Research International*, 52(2), 483–489. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.019>
- Guevara-Villalobos, D., Flores-soto, N., Céspedes-vindas, C., Úbeda-Carrasquilla, L., Chinnock, A., & Gómez, G. (2019). Hábitos alimentarios de la población urbana costarricense (Food habits of

- urban Costa Rican population). *Acta Médica Costarricense*, 61(4), 152–159.
- Hattersley, S., Ward, R., Baka, A., & Crevel, R. W. R. (2014). Advances in the risk management of unintended presence of allergenic foods in manufactured food products - An overview. *Food and Chemical Toxicology*, 67, 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.036>
- Hayward, M., Ross, S., Godefroy, W., Benrejeb Ulberth, S., Van Hengel, F., Roberts, A. J., Akiyama, J., Popping, H., Yeung, B., Wehling, J. M., Taylor, P., Poms, S. L., & Ernest Delahaut, R. (2010). Title: Validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods: community guidance and best practices. *Journal of AOAC International*, 93(442).
- Heick, J., Fischer, M., Kerbach, S., Tamm, U., & Popping, B. (2011). Application of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous detection of seven allergenic foods in flour and bread and comparison of the method with commercially available ELISA test kits. *Journal of AOAC International*, 94(4), 1060–1068.
- Hengel, V. (2012). *Appendix M: Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices*. 3, 1–8.
- Hernández, M., Martin, B., & Medina, A. (2012). Algunos aspectos de la hipersensibilidad alergica alimentaria a frutas y vegetales. *Gaceta Médica de Bilbao*, 109(3), 104–112.
- Hidalgo Víquez, C. M., Andrade Pérez, L., Rodríguez González, S., Dumani Echandi, M., Alvarado Molina, N., Cerdas Núñez, M., & Quirós Blanco, G. (2020). Análisis de la canasta básica alimentaria de Costa Rica: oportunidades desde la alimentación y nutrición. *Población y Salud En Mesoamérica*, 18. <https://doi.org/10.15517/psm.v18i1.40822>
- Ji-Yun, L., & Chan Jong, K. (2010). Determination of allergenic egg proteins in food by protein-, mass spectrometry-, and DNA-based methods. *Journal Of AOAC International*, 93(2), 462–477.
- Kato, S., Yagi, T., Kato, A., Yamamoto, S., Akimoto, M., & Arihara, K. (2015). Interlaboratory Study of ELISA Kits for the Detection of Egg. *Journal of AOAC International*, 98(3), 810–817. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.14-219>
- Khuda, S., Slate, A., Pereira, M., Al-Taher, F., Jackson, L., Diaz-Amigo, C., Bigley, E. C., Whitaker, T., & Williams, K. M. (2012). Effect of processing on recovery and variability associated with immunochemical analytical methods for multiple allergens in a single matrix: Sugar cookies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(17), 4195–4203. <https://doi.org/10.1021/jf3001839>

- Kirsch, S., Fourdrilis, S., Dobson, R., Scippo, M. L., Maghuin-Rogister, G., & De Pauw, E. (2009). Quantitative methods for food allergens: A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(1), 57–67. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2869-7>
- Koerner, T. B., Abbott, M., Godefroy, S. B., Popping, B., Yeung, J. M., Diaz-Amigo, C., Roberts, J., Taylor, S. L., Baumert, J. L., Ulberth, F., Wehling, P., & Koehler, P. (2013). Validation procedures for quantitative gluten ELISA methods: AOAC allergen community guidance and best practices. *Journal of AOAC International*. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-043>
- Lacorn, M., Lindeke, S., Siebeneicher, S., & Weiss, T. (2018). Commercial ELISA measurement of allergens and gluten: What we can learn from case studies. *Journal of AOAC International*, 101(1), 102–107. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0399>
- Lapeña López de Armentia, S., & Hierro Delgado, E. (2018). Alergia a proteínas de leche de vaca. *Pediatría Integral*, 22(2), 76–86.
- Lee, A. J., Thalayasingam, M., & Lee, B. W. (2013). Food allergy in Asia: how does it compare? *Asia Pacific Allergy*, 3(1), 3–14. <https://doi.org/10.5415/apallergy.2013.3.1.3>
- Lee, J. Y., & Kim, C. J. (2010). Determination of allergenic egg proteins in food by protein-, mass spectrometry-, and DNA-based methods. *Journal of AOAC International*, 93(2), 462–477.
- Liu, X., Feng, B. S., Kong, X., Xu, H., Li, X., Yang, P. C., & Liu, Z. (2013). Food-cooking processes modulate allergenic properties of Hen's egg white proteins. *International Archives of Allergy and Immunology*, 160(2), 134–142. <https://doi.org/10.1159/000339396>
- Loh, W., & Tang, M. L. K. (2018). The epidemiology of food allergy in the global context. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(9). <https://doi.org/10.3390/ijerph15092043>
- Lopez, M. C. (2017). Food Allergen Labeling: A Latin American Approach. *Journal of AOAC International*, 101(1), 14–16. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0382>
- Ministerio de Industria y Comercio de Costa Rica. (2012). *Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.01.07:10 Etiquetado General de los Alimentos Previamente Envasados (Preenvasados)* (pp. 1–18). Disponible en: http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=84388&nValor3=0&strTipM=TC
- Monaci, L., Brohée, M., Tregogat, V., & Van Hengel, A. (2011). Influence of baking time and matrix effects on the detection of milk allergens in cookie model food system by ELISA. *Food*

- Chemistry*, 127(2), 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.113>
- Nehra, M., Lettieri, M., Dilbaghi, N., & Kumar, S. (2020). Nano-Biosensing Platforms for Detection of Cow ' s. *Sensors*, 1–20. <https://doi.org/10.3390/s20010032>
- Nguyen, A. V, Williams, K. M., Ferguson, M., Lee, D., Sharma, G. M., Do, A. B., & Khuda, S. E. (2019). Enhanced quantitation of egg allergen in foods using incurred standards and antibodies against processed egg in a model ELISA. *Analytica Chimica Acta*, 1081, 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.030>
- Orotolani, C., & Pastorello, E. A. (2006). Food allergies and food intolerances. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 20(3), 467–483. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2005.11.010>
- Platteau, C., De Loose, M., De Meulenaer, B., & Taverniers, I. (2011). Quantitative detection of hazelnut (*Corylus avellana*) in cookies: ELISA versus real-time PCR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11395–11402. <https://doi.org/10.1021/jf202167b>
- Programa Federal de Control de Alimentos de Argentina. (2017). *Directrices para el rotulado de alérgenos y sustancias capaces de producir reacciones adversas en individuos susceptibles de productos alimenticios envasados*. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/directrices_rotulado_alergenos.pdf
- PROTOCOLPLACE (23 julio 2013). Competitive ELISA Tutorial 1: How a Competitive ELISA Works. [video]. Youtube. <https://www.youtube.com/watch?v=Kb26nQVMHds>
- Rajani, P. S., Martin, H., Groetch, M., & Kirsi, M. J. (2020). Presentation and Management of Food Allergy in Breastfed Infants and Risks of Maternal Elimination Diets. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology in Practice*, 8(1), 52–67. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.11.007>
- Ross, G. M. S., Bremer, M. G. E. G., & Nielen, M. W. F. (2018). Consumer-friendly food allergen detection: moving towards smartphone-based immunoassays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(22), 5353–5371. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0989-7>
- San Millan, R (22 de marzo 2016a). Video ELISA directa [video]. Youtube. https://www.youtube.com/watch?v=_8r5XVmKfOc&t=43s
- San Millan, R (30 octubre 2016b). Video ELISA directa [video]. Youtube. <https://www.youtube.com/watch?v=fxyHClJ3sgo>
- San Millan, R. (30 octubre 2016c). Video ELISA indirecta [video]. Youtube. <https://www.youtube.com/watch?v=KrGC0ZgIDl8>

- Sánchez, A., Sánchez, J., & Cardona, R. (2019). Results and limitations of epidemiological studies on food allergy. Focus on tropical countries. *Revista Alergia Mexico*, 66(1), 9–17. <https://doi.org/10.29262/ram.v66i1.340>
- Sánchez, J., & Sánchez, A. (2013). Epidemiology of food allergy in Latin America. *Allergologia et Immunopathologia*, 43(2), 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2013.07.001>
- Schubert-Ullrich, P., Rudolf, J., Ansari, P., Galler, B., Führer, M., Molinelli, A., & Baumgartner, S. (2009). Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: An overview. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(1), 69–81. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2715-y>
- Senyuva, H. Z., Jones, I. B., Sykes, M., & Baumgartner, S. (2019). A critical review of the specifications and performance of antibody and DNA-based methods for detection and quantification of allergens in foods. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 36(4), 507–547. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1579927>
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2010). Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 SUPPL. 2), S116–S125. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.08.028>
- Słowianek, M., & Majak, I. (2011). Biotechnology and Food Science Methods of allergen detection based on DNA analysis. *Biotechnol Food Sci*, 75(2), 39–44. <http://www.bfs.p.lodz.pl>
- Surojanametakul, V., Khaiprapai, P., Jithan, P., Varanyanond, W., Shoji, M., Ito, T., & Tamura, H. (2012). Investigation of undeclared food allergens in commercial Thai food products. *Food Control*, 23(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.013>
- Taylor, S. L., & Baumert, J. L. (2015). Worldwide food allergy labeling and detection of allergens in processed foods. *Chemical Immunology and Allergy*, 101, 227–234. <https://doi.org/10.1159/000373910>
- Taylor, S. L., Baumert, J. L., Kruizinga, A. G., Remington, B. C., Crevel, R. W. R., Brooke-Taylor, S., Allen, K. J., & Houben, G. (2014). Establishment of Reference Doses for residues of allergenic foods: Report of the VITAL Expert Panel. *Food and Chemical Toxicology*, 63, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.032>
- Török, K., Hajas, L., Horváth, V., Schall, E., Bugyi, Z., Kemény, S., & Tömösközi, S. (2015). Identification of the factors affecting the analytical results of food allergen ELISA methods.

- European Food Research and Technology*, 241(1), 127–136. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2441-y>
- Török, K., Horváth, V., Horváth, Á., Hajas, L., Bugyi, Z., & Tömösközi, S. (2014). Investigation of incurred single- and multi-component model food matrices for determination of food proteins triggering allergy and coeliac disease. *European Food Research and Technology*, 239(6), 923–932. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2289-6>
- Toyosaki, T., Sakane, Y., & Koketsu, M. (2006). Effects of addition of salt to bread on IgE antibody responses. *Food and Agricultural Immunology*, 17(3–4), 149–156. <https://doi.org/10.1080/09540100600927186>
- Turner, P. J., Beyer, J. H. B. B. K., Gowland, C. C. M. H., Regent, S. O. H. L., & Crevel, S. S. T. S. R. W. R. (2018). *How does dose impact on the severity of food-induced allergic reactions, and can this improve risk assessment for allergenic foods? Report from an ILSI Europe Food Allergy Task Force Expert Group and Workshop. August 2017*, 1383–1392. <https://doi.org/10.1111/all.13405>
- Veratox. (2016). *Veratox for total milk allergen*. 5333, 1. <http://www.neogen.com/FoodSafety/pdf/ProdInfo/V-TotalMilk.pdf>
- Villa, C., Costa, J., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2018). Bovine Milk Allergens : A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, 137–164. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12318>
- Wang, Z., Zhong, J., Meng, X., Gao, J., Li, H., Sun, J., Li, X., & Chen, H. (2021). The gut microbiome-immune axis as a target for nutrition-mediated modulation of food allergy. *Trends in Food Science and Technology*, 114(May), 116–132. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.021>
- Weiss, T., Lacorn, M., Flannery, J., Benzinger, M. J., Bird, P., Crowley, E. S., Goins, D., Agin, J. R., Gilani, S., Poepping, B., & Garber, E. (2016). Validation of the RIDASCREEN[®] FAST Milk Kit. *Journal of AOAC International*, 99(2), 495–503. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-0290>
- Zeletňáková, L., Fikselová, M., Žiarovská, J., Kolesárová, A., & Jurčaga, L. (2019). Identification of cow milk allergen in the products of grape processing. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 8(4), 1098–1102. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.8.4.1098-1102>

Capítulo 9. Anexos

Anexo 1. Protocolo de contaminación de muestras en la empresa



Protocolo de Pruebas y Validaciones

Fecha	20/01/2021
Objetivo	Elaborar tipo cracker y tipo cracker integral contaminada con lácteo y huevo para estudio de alérgenos
Alcance	Tipo cracker y tipo cracker integral
Nombre del proyecto	Efecto de diferentes condiciones de proceso en la detección de leche y huevo

1. Tipo de ensayo

Materia Prima	Nuevos Equipos		
Material Empaque	Procedimiento		
Desarrollo Producto	Peso declarado		
Mejoramiento Proceso	¿Otros?	X	¿Cuál? Investigación

Justificación prueba

Dentro del marco de un proyecto de investigación de la Universidad de Costa Rica, se está evaluando cuál es el efecto que tiene el horneado en la capacidad de los kits rápidos de análisis de alérgenos para detectar leche y huevo. Los resultados permitirán conocer qué tanto afecta el procesamiento de nuestros productos en la detección de proteínas alergénicas por contacto cruzado.

Recursos

1. 5 kilos de pasta de tipo cracker normal
2. 5 kilos de pasta de tipo cracker integral
3. Molde de tipo cracker
4. Molde de club
5. Bandejas para acumular producto
6. Personal de laminación, horneado y empaque.
7. Micropipeta y sus puntas
8. Vortex
9. Disolución de material de referencia

*Los recursos del 7-9 son proporcionados por la investigadora de la UCR.

Plan de Prueba

1. Al final de la producción normal de tipo cracker se lamina 1kg (132 galletas) de pasta de tipo cracker.
2. Después del moldeo (antes de ingresar al horno) se detiene la banda. Se quita una fila (a lo ancho) de galletas para formar dos grupos de galletas.
3. La investigadora de la UCR coloca sobre las galletas la disolución con alérgeno de huevo y lácteo.
4. Se enciende de nuevo la banda y se deja correr el producto hasta que salga del horno.
5. En empaque se acumulan las galletas en 1 bandeja previamente rotuladas:
6. Se cambia el molde de tipo cracker por el de club y se pasan 500 g de pasta siguiendo los puntos del 2-5.
7. Al terminar la pasta de tipo cracker con el molde de club se coloca de nuevo el molde de tipo cracker.
8. Se laminan 500 g de pasta de tipo cracker integral
9. Se repiten los pasos del 2-5
10. Al finalizar la prueba se procede con la limpieza en la laminadora y en las bandas de salida del horno.

Responsabilidades

Producción:

- Coordinador de mezclas: coordinar con el personal del área de mezclas los siguiente:
 - a. Guardar los kilogramos de la pasta de tipo cracker normal.
 - b. Los cambios de molde
 - c. Apoyo de los operarios ya que se requiere trabajar en las condiciones normales de procesamiento.
- Coordinador de Línea 1:
 - a. Asegurar que se acumulen en bandejas las galletas que salen del horno (se requiere sólo 1 operario).

Calidad:

- a. Verificar que la prueba se ejecute correctamente.
- b. Velar por que las galletas que se elaboraron se retengan, identifiquen y guarden aparte para que no salgan al mercado.
- c. Tomar muestras del producto a lo largo de la prueba.
- d. Asegurar que el área quede limpia y lista para continuar la producción.

Investigadora de la UCR:

- a. Conducir las pruebas
- b. Contaminar la pasta con los alérgenos
- c. Tomar muestras en distintos puntos

Disposición del producto obtenido durante ensayo
--

El producto elaborado será enviado al laboratorio de Química del CITA para los respectivos análisis.

Especificaciones de Proceso y Producto en diferentes etapas de elaboración
--

Aplican las mismas especificaciones normales del proceso tanto para tipo cracker como para Club.

Resultados obtenidos

Firmas de aprobación

Nombre	Firma	Comentario
Diego Gómez, Coordinador de producción		
Montserrat García, Coordinadora de producción		
Lourdes Chacón, Analista de Aseguramiento de Calidad		
Cindy Hidalgo, Investigadora UCR		

ANEXOS

Anexo 2. Imágenes de la contaminación de las galletas moldeadas en la línea de producción.



Imagen 1. Contaminación de las galletas en la línea de producción de galletas tipo cracker de la compañía Pozuelo DCR.SA



Imagen 2. Adición de una gota de la solución de alérgenos con la concentración establecida en mg /kg (ppm) de acuerdo con el peso de las galletas.



Imagen 3. Galletas contaminadas con la solución de alérgenos listas para ser horneadas.

Anexo 3. Resultados por lote de la cuantificación de alérgenos leche y huevo en galletas tipo cracker

Cuadro 12. Porcentaje de cuantificación de los alérgenos huevo y leche con respecto a la masa cruda contaminada para los cuatro lotes de galletas tipo cracker tradicional, Integral y molde XL por kit.

Kit		R- biopharm					Veratox					3M				
Alérgeno	Muestra	LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3	LOTE 4	Promedio	LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3	LOTE 4	Promedio	LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3	LOTE 4	Promedio
Leche	Galleta Tipo cracker tradicional	58	32	78	35	51	17	61	21	50	37	49	100	147	48	86
	Galleta Tipo cracker integral	146	93	136	183	139	16	128	64	79	72	80	30	33	50	48
	Galleta Tipo cracker Club	43	21	110	27	50	54	33	14	65	41	68	35	39	64	51
Huevo	Galleta Tipo cracker corriente	4	6	4	1	4	6	3	5	1	4	5	6	5	2	5
	Galleta Tipo cracker integral	4	3	4	1	3	6	1	3	1	3	4	3	3	2	3
	Galleta Tipo cracker Club	5	1	6	1	3	2	2	4	1	2	4	1	4	2	3

Anexo 4. Resultados por lote de la diferencia en el porcentaje de cuantificación entre los momentos del proceso

Cuadro 13. Diferencia en el porcentaje de cuantificación entre los momentos del proceso (masa cruda y galleta horneada) para los alérgenos leche y huevo para los cuatro lotes de galletas tipo cracker por kit.

Kit	R- biopharm					Veratox					3M				
	LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3	LOTE 4	Promedio	LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3	LOTE 4	Promedio	LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3	LOTE 4	Promedio
Alérgeno															
Leche	42	68	22	65	49	83	39	79	50	63	51	0	-47	52	14
Huevo	96	94	96	99	96	94	97	95	99	96	95	94	95	98	95