



MINISTERIO
DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES
E IGUALDAD

aecosan

agencia española
de consumo,
seguridad alimentaria y nutrición

CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

DETECCIÓN DE ALÉRGENOS: ESTADO ACTUAL, RETOS Y NECESIDADES



Jornadas de Referencia 2017
Majadahonda del 29 al 30 de mayo

M^a Isabel Prieto Santos
Servicio de Biotecnología

Qué tenemos que analizar ?

REGLAMENTO (UE) Nº 1169/2011 (Anexo II): Sustancias que causan alergias o intolerancia

Reglamento (EU) Nº 828/2014



Cereales con gluten

Crustáceos

Huevos

Pescado

Cacahuetes

Soja

Leche

Frutos de cáscara

Apio

Mostaza

Sésamo

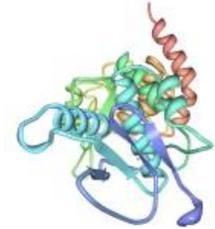
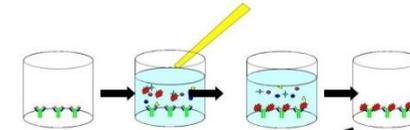
Sulfitos

Altramuces

Moluscos

Métodos de Análisis de Alérgenos Disponibles

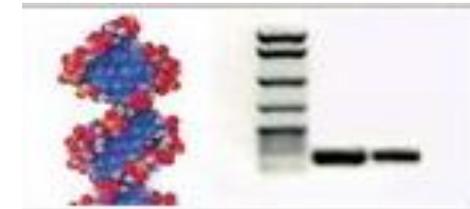
❖ Métodos inmunológicos



Detección proteína o proteínas alergénicas

❖ Métodos Biología Molecular (ADN)

Detección del alimento alergénico



❖ Métodos Cromatográficos

Detección proteína o fracciones de proteínas (péptidos)

Qué buscamos ? Analitos: alérgenos/marcadores

**Alérgeno / proteína
alergénica**

**MÁS Y MEJOR
INFORMACIÓN AL
PACIENTE**

**Marcador: ADN /proteína
del ingrediente alergénico**

**SUFICIENTE PARA
CUMPLIR LA
LEGISLACIÓN**

Deberíamos obtener el mismo resultado no importa dónde, cómo,
y quién hace la medida

1.- Cómo elegimos el método ?

UNE-CEN /TR 16338: 2012 / AOAC, 2010 Información que deben contener los métodos inmunológicos (ELISA)

Información general

- Título
- Descripción del propósito del análisis y su trasfondo científico
- Objetivo y campo de aplicación
- Información sobre el anticuerpo
- Información sobre el material utilizado para la calibración
- Información sobre matrices en las que puede ser aplicado
- Información sobre reactividad cruzada

Información sobre la validación

UNE-CEN /TR 16338: 2012

Validación interna

- PRECISIÓN
- SENSIBILIDAD (LD/ LC)
- EXACTITUD
- ESPECIFICIDAD
- ROBUSTED

Validación (Inter-laboratorio)

- N° de laboratorios
- Datos de eliminación de laboratorios
- r, S_r, RSD_r
- R, S_R, RSD_R



Guía para la selección y utilización de kits de ensayo por los laboratorios acreditados

G-ENAC-20 Rev. 1 Enero 2017

INDICE

1. OBJETO..... 1
2. DIRECTRICES..... 2

1. OBJETO

En determinados campos de análisis la utilización de kits por parte de los laboratorios es una práctica habitual. De hecho, hay situaciones en las que los kits son la única herramienta analítica disponible para aplicar métodos y procedimientos apropiados para los ensayos que realiza el laboratorio.

A los efectos de este documento, se entenderá por kit de ensayo un conjunto de medios y productos suficiente para un determinado fin, de tal forma que su presentación comercial constituye un método de análisis para su aplicación directa.

Por tanto, es fundamental un uso profesional y sistematizado de los kits de ensayo por parte de los laboratorios acreditados para llevar a cabo sus ensayos de manera adecuada al uso previsto, evitando a toda costa una aplicación deficiente o poco fiable de esta herramienta de análisis.

Para ello, los laboratorios deberían establecer políticas y procedimientos que aseguren una selección correcta y objetiva de los kits empleados en cada caso, de forma que los resultados de la validación disponible demuestren el cumplimiento de las especificaciones requeridas y todo ello de acuerdo a lo establecido en la



Guía para la selección y utilización de kits de ensayo por los laboratorios acreditados

G-ENAC-20 Rev. 1 Enero 2017

4) **Kits con validación realizada por el fabricante:** Para seleccionar el kit más adecuado a sus necesidades, el laboratorio debería disponer de una información suficiente sobre la validación del kit, de forma que pueda evaluar su validez y demostrar que ha llevado a cabo la selección de la manera más adecuada. Esta información debería incluir:

a) **Resultados** obtenidos para los diferentes parámetros de la validación (**Nota 1**):

- Declaración sobre el rango de medida. Límites de detección y/o cuantificación (que debería incluir estudios realizados con matriz)
- Estudio de la especificidad
- Estudio de la selectividad (que debería incluir los estudios realizados con matriz)
- Sensibilidad
- Estudio de la Precisión
- Estudio de la Recuperación/Exactitud
- Linealidad (métodos cuantitativos)
- Otras características: Robustez. Variabilidad inter-lote e intra-lote.

Nota 1: Normalmente un kit de ensayo forma parte de un método analítico cuya finalidad es su aplicación para la realización de ensayos en un producto o grupos de productos. La validación aportada por el fabricante debería incluir necesariamente los estudios realizados con matrices reales y los resultados de la validación deberán estar claramente referidos a éstos.



2.-Cómo comprobar la exactitud de los métodos ?

No disponemos de **Materiales de Referencia
Certificados** para alérgenos

Qué podemos utilizar ?

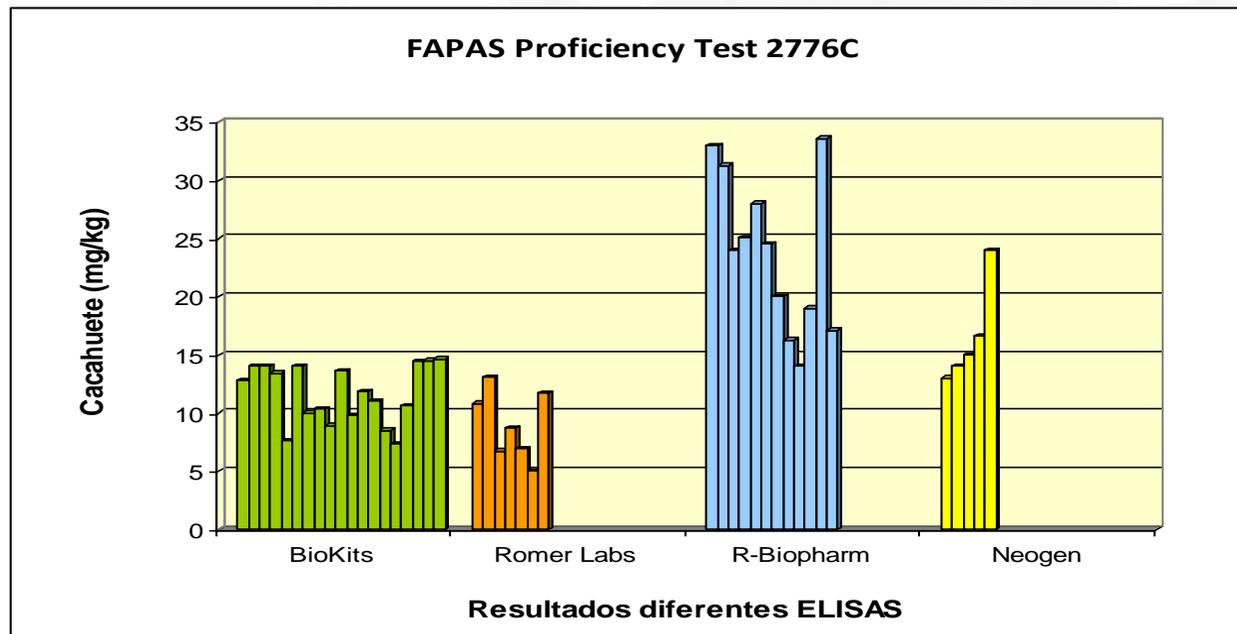
a) Materiales de Referencia. Cuando sea posible

Alérgeno	MATERIAL	PROCEDENCIA	VALOR ASIGNADO	
Huevo	NIST 8445 (Whole egg powder)	NIST	48 % ± 1%	Contenido proteico (ELISA)
Prolamina/Gluten	PWG standar	Prolamin Group		Pureza
Leche	BCR-638	IRMM		Contenido proteico (Kjeldahl)
Leche	NIST 1549a	NIST		
Peanut Butter	NIST 2387	NIST		
Cacahuete	IRMM-481a,IRMM-481b,IRMM-481c,IRMM-481d,IRMM-481e,IRMM-481f (mezcla)	IRMM		

NO para ELISA

b) Sobrantes de ensayos de intercomparación

Valor de Referencia : Valor Asignado en el ensayo
(Con cada Kit ???)



FAPAS 2776- C Cacahuete en chocolate

- Biokits 11,8 mg/kg
- Romer Labs 8,7 mg/kg
- R-Biopharm 24,2 mg/kg
- Neogen 15,0 mg/kg



Fera
Sand Hutton, York, YO41 1LZ
Tel: +44 (0)1904 462100 Fax: +44 (0)1904 500440
info@fapas.com www.fapas.com

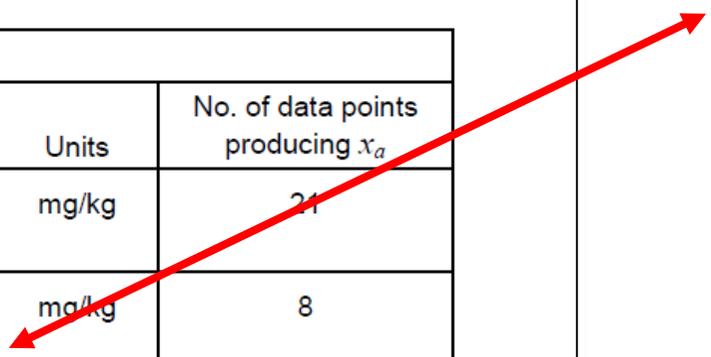
FAPAS QC MATERIAL DATA SHEET	T27177AQC
Matrix	Cake Mix
Weight / Volume of Contents	20 g

Analyte	Qualitative Results
Egg	POSITIVE (100% consensus)

Quantitative Results				
Analyte	Assigned Value, x_a	Range for $ z < 2$	Units	No. of data points producing x_a
R-Biopharm - Ridascreen Fast Ei/Egg Protein (R6402)	58.4	29.2 – 87.7	mg/kg	21
Neogen - BioKits Egg Assay Kit (902072T)	25.4	12.7- 38.1	mg/kg	8

Ambos kits expresan el resultado como huevo entero

Rango de aceptación 50% -150%





c) Materiales de control de la propia casa comercial

- Control interno del kit
- Útiles cuando son en matriz (Controla el proceso de extracción)

d) Utilización de reactivos químicos:

Caseína, β -lactoglobulina, albúmina, ovoalbúmina etc...

e) Utilización del alimento alergénico

Cómo preparar los controles ?

MUESTRAS CONTROL

- **Muestras Fortificadas:** muestra preparada por adición de una determinada cantidad de alérgeno
 - Sobre la matriz
 - Directamente sobre el sobrenadante de extracción
- **“Incurred sample”:** muestra adicionada y sometida a tratamientos similares al procesado





Cómo asignamos el valor ?

- Valor teórico de acuerdo a la concentración
- Valor interno asignado como resultado de una serie de repeticiones
 - Valor medio \pm SD
- Aplicar factores de recuperación (para el control)

Criterio de aceptación aplicado ?

- ✓ Comprobar exactitud de la casa comercial declarada en su informe de validación:
Comprobar en matrices representativas
- ✓ De acuerdo a las normas :
(J. AOAC International Vol.93 No 2, 2010) { Rango Ideal 80 -120 % (spiked sample)
Admite 50 -150 % (incurred sample)

Propuesta :

- Gluten : 80 % -120%
- Alérgenos : 70 % -130 %

3. Límites declarados



	A	B	C	D
Huevo	0,4 mg/kg	0,25 mg/kg	0,5 mg/kg	1 mg/kg
Caseína	0,2 mg/kg	0,25 mg/kg	2,5 mg/kg	1 mg/kg
B-lactoglobulina	10 µg/kg	0,2 mg/kg	5 mg/kg	0,1 mg/kg
Soja	40 µg/kg	0,3 mg/kg	2,5 mg/kg	2,5 mg/kg
Cacahuete	1 mg/kg	1,5 mg/kg	2,5 mg/kg	1 mg/kg

Ejemplos :

◆ Detección de β -lactoglobulina en un alimento :

- ❑ Sistema A Límite de cuantificación de $10 \mu\text{g}/\text{kg}$

RESULTADO $< 10 \mu\text{g}/\text{kg}$

- ❑ Sistema C Límite de cuantificación de $5 \text{mg}/\text{kg}$

RESULTADO $< 5 \text{mg}/\text{kg}$

RESULTADO
NO DETECTADO

Qué pasa entre $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ y $5 \text{mg}/\text{kg}$???

Ejemplos :

◆ Cacahuete en un alimento (1,5 mg/kg) :

❑ Sistema A (LC 1 mg/kg)

RESULTADO 1,5 mg/kg de cacahuete

ETIQUETAR

DETECTADO

❑ Sistema C (LC 2,5 mg/kg)

RESULTADO < 2,5 mg/kg

NO DETECTADO

?

NO ETIQUETAR

Cómo se calcula el Límite de detección declarado ?

Límite de detección (LD): Cantidad o concentración mínima de analito que se puede detectar con confianza, aunque no necesariamente cuantificarse, en la muestra para análisis, demostrado mediante una prueba colaborativa u otro tipo de validación adecuada (EN 15842:2010)

Sensitivity

Limit of Detection (LOD)

The three different zero matrices chocolate, ice cream and cookies have been extracted 10 times each to estimate the **Limit of Detection**. A second order polynomial function was used for the extrapolation of the standard curve to calculate from the OD values of the zero matrices to the respective allergen concentration. The **Limit of Detection** was then estimated by the mean of these concentrations plus 3 times standard deviation. Accordingly, the **Limit of Detection** was estimated to 0.1 mg/kg (ppm) almond (dilution factor of 20 is included).

Table 1: Determination of the Limit of Detection (LOD).

Matrix	Standard 1 (OD*)	Standard 2 (OD*)	Mean of samples (OD*)	Mean (mg/kg)	Standard deviation mean (mg/kg)	Mean + 3x standard deviation (mg/kg)
Chocolate	0.095	0.540	0.085	0.03	-0.02	0.05
Ice cream	0.105	0.572	0.095	0.02	-0.08	-0.01
Cookies	0.095	0.540	0.101	0.05	0.07	0.23
Mean value (mg/kg)						0.1

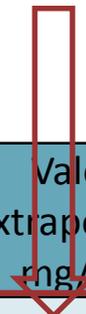
*OD = optical density

Método utilizado para calcular el LD:
Valor obtenido matrices blanco más 3 veces SD

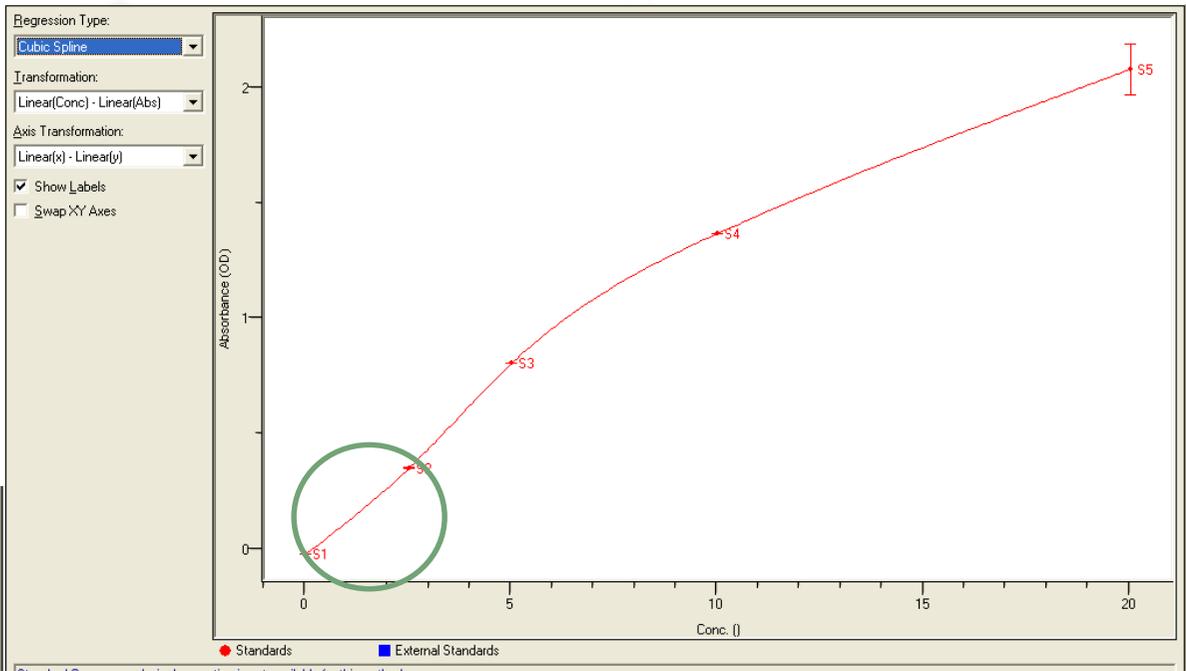
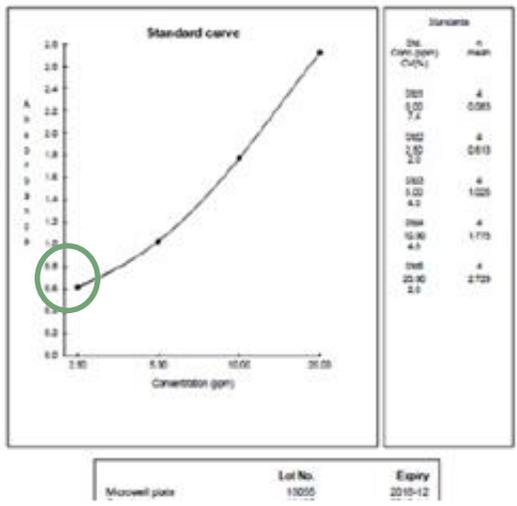
- Al menos 10 determinaciones en matrices relevantes
- LD un nivel de confianza del 95%, α y β se establecen en 0,05.

Límite de detección declarado 1,2 mg/kg
Límite de cuantificación 2,5 mg/kg

R 72%



PRODUCTO	ETIQUETADO	DO S1 0 mg/kg	DO S2 2,5 mg/kg	DO muestra	Resultado mg/kg	Valor extrapolado mg/kg
Cereales		0,060	0,627	0,371	< 2,5	1,81
Helado		0,060	0,627	0,059	< 2,5	
Galletas integrales		0,027	0,524	0,248	< 2,5	1,45
Chocolate	Puede contener trazas de frutos secos	0,051	0,405	0,055	< 2,5	
Galleta	Puede contener almendra	0,051	0,405	1,367	8,8	
Helado	Puede contener trazas de frutos de cascara	0,051	0,405	0,054	< 2,5	
Polvorones	Almendra 20 %	0,027	0,524	3,78	> 20	
Helado	Almendra 3,5 %	0,027	0,524	3,818	> 20	
Crema de almendras	Almendra 10 %	0,027	0,524	3,851	> 20	



MÁS IMPORTANCIA .- Ensayo cualitativo

- Punto de corte : valor S_1 (LD/LC)
Generalmente límite de cuantificación declarado
- Establecer un criterio de tolerancia ($\pm DO S_1$ LC/LD)
(similar a la recuperación pero aplicada a la absorbancia)
- Comprobar detección en distintas matrices (≥ 5)



Cómo se calcula el límite de cuantificación declarado ?

Límite de cuantificación (LC): Cantidad o concentración mínima de analito que se puede detectar cuantitativamente en una muestra para análisis con un nivel aceptable de precisión y exactitud, demostrado mediante una prueba colaborativo u otro medio de validación adecuada. (EN 15842:2010)

CEN/TR 16338:2012

- Calculado sobre muestras fortificadas: (20 determinaciones independientes en muestras conteniendo el analito al nivel estimado)
 - Determinado con un % de RSD aceptable
- J. AOAC International Vol.93 No 2, 2010
- 10 veces SD de matriz blanco

Limit of Quantification (LOQ)

The **Limit of Quantification** or the lowest concentration that can be determined in a sample with acceptable precision (repeatability) and accuracy under the stated conditions of the test was proved to be 2.5 mg/kg (ppm) almond (dilution factor 20 included).

The LOQ is proved by showing the range of samples spiked at the level of standard 2 (2.5 mg/kg almond). Each sample was extracted 10 times and measured in duplicates. The measured sample ranges are similar to the range of standard 2, measured 10 times (see table 2).

Table 2: Determination of the limit of quantification of the RIDASCREEN®FAST Mandel/Almond by extracting spiked samples ten times.

Sample	Measured concentration (mg/kg)	Standard deviation (SD)	Coefficient of variation (%)
Calibrator 2 (n=20)	2.56	0.101	4.0
Cookie (n=10)	2.78*	0.145	5.2
Chocolate (n=10)	2.69*	0.169	6.3

All measured coefficients of variation are within an acceptable range showing that samples with an almond concentration of 2.5 mg/kg can be measured with good precision and accuracy.

Límite de cuantificación declarado
2,5 mg/kg
Comprobado en matriz

Matriz	Valor esperado mg/kg	Valor obtenido mg/kg	Recuperación %
Chocolate con leche	0	< 1	
	10	9,2	92
Helado	0	< 1	
	10	8,3	83
Cereales	0	< 1	
	10	10,68	106,8
Galletas	0	< 1	
	10	7,82	78,2
Espicias	0	< 1	
	10	8,25	82,5

LC declarado 1 mg/kg
Valor experimental comprobado
10 mg/kg

Límite de cuantificación

PUNTO MÁS BAJO DE LA CURVA DE CALIBRADO ?

- No se está teniendo en cuenta el efecto matriz
- No se está teniendo en cuenta el impacto del procesado
- No se corresponde con un límite de cuantificación real en una muestra

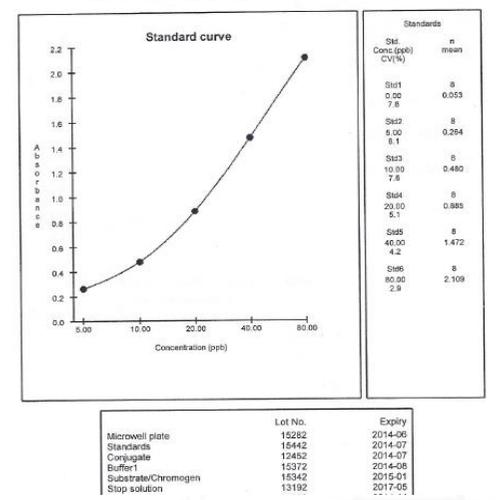
**COMPROBACIÓN
en matriz**

Recuperación
70 % -130 %

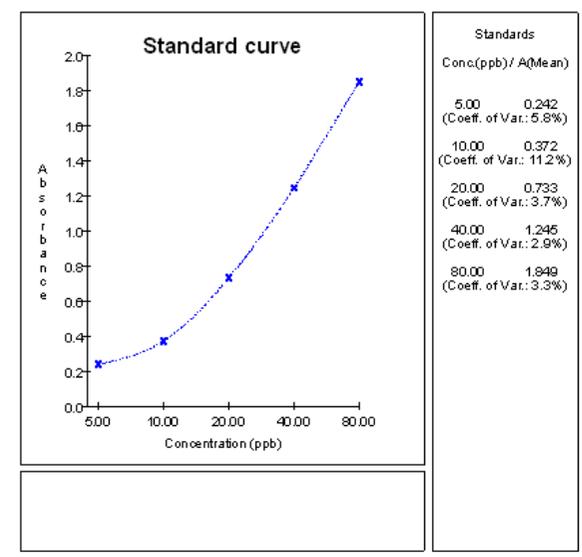
Evaluación de la curva de calibrado

Curvas: “cubic spline”, polinomial, etc

Art. No.: R7001 Lot: 15462 Expiry: 2014-06
R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany certifies that this batch has been approved by the Quality Assurance Department and conforms with specifications

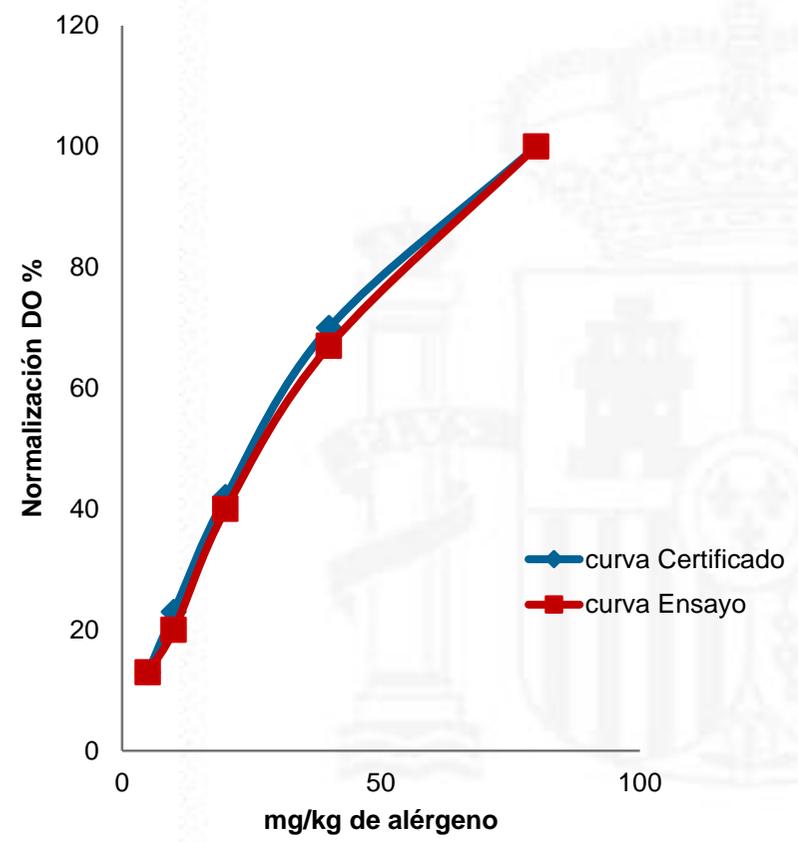


CURVA CERTIFICADO



CURVA ENSAYO

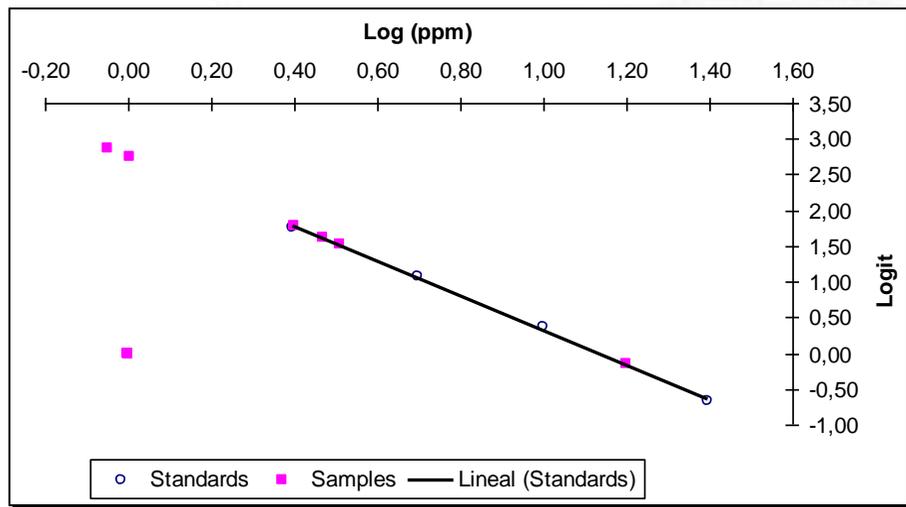
NORMALIZACION CURVA (B/Bmax)



B/Bmax	
Curva certificado	Curva ensayo
13	13
23	20
42	39
70	66

Propuesta:
Variación permitida
25 % - 35%

Curvas Log/logit (regresión lineal)



CURVA	
Coefic. Correlación	0,9987
Pendiente	-2,4255
Intersección Y	2,7507

4.- Diferente expresión de resultados ⇔ diferentes resultados

- Detectan diferentes proteínas (diferente antígeno utilizado para la inmunización)
- Diferente anticuerpos (Monoclonales, policlonales)
- Diferentes calibrantes
- Diferentes unidades de expresión de resultados

Diferente diana



Fera
Sand Hutton, York, YO41 1LZ
Tel: +44 (0)1904 462100 Fax: +44 (0)1904 500440
info@fapas.com www.fapas.com

FAPAS QC MATERIAL DATA SHEET	T27162B
Matrix	Chocolate
Weight / Volume of Contents	20 g

Analyte	Qualitative Results
Hazelnut	POSITIVE (100% consensus)

Quantitative Results				
Analyte	Assigned Value, x_a	Range for $ z \leq 2$	Units	No. of data points producing x_a
R-Biopharm - Ridascreen Fast Hazelnut (R6802)	20.0	10.0 – 30.1	mg/kg	23
Neogen - Veratox for Hazelnut Allergen (8420)	22.7	11.4 – 34.1	mg/kg	11
ELISA Systems – Hazelnut (ESHRD-48)	2.51	1.26 – 3.77	mg/kg	8

R- Biopharm
Neogen-Veratox
Detectan Avellana

ELISA Systems
Proteína de avellana

This data sheet is applicable until 28 Aug 2018

Diferente expresión de resultados

En función de la diana y la solución calibrante utilizada

HUEVO	LECHE	CACAHUETE
mg/kg huevo entero en polvo	mg/kg proteína de leche	Cacahuete
mg/kg proteína clara de huevo	mg/kg leche entera en polvo	Proteína de cacahuete
mg/kg ovomucoide	mg/kg caseína	
	mg/kg β lactoglobulina	

Algunos sistemas proponen conversiones en la expresión de resultados

Precaución: Diferente composición dependiendo de la variedad

Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes, EFSA Journal 2014;12(11):3894, <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3894.pdf>

11.1.1.7. Expression of the results on food allergens obtained by immunological methods

The European standard EN 15633-1 (CEN, 2009), relative to the research on food allergens by immunological methods, requires that results are expressed as total amount of allergenic ingredient per kilogram of food (mg/kg), or as total amount of protein per kilogram of food, using an appropriate factor that allows conversion to the amount of allergenic ingredient per kilogram of food. However, conversion factors are difficult to calculate when the composition of the food is not well known and the amount of protein per kilogram of food may change according to the origin of the ingredient and following technological treatments or cooking. LODs and LOQs are mostly expressed in the literature as milligrams of allergenic protein per kilogram of food or as mg/L in the case of liquid foods or asng/mL of buffer solution.

EFSA Journal 2014;12(11):3894

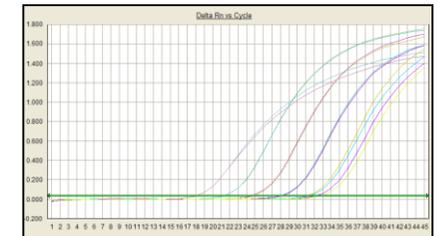
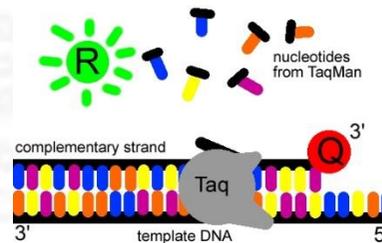
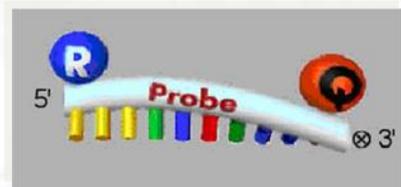
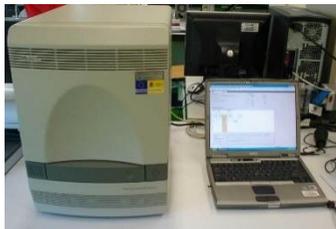
49

Expresión de resultados de acuerdo a la EN 15633-1 :2009, indica que los resultados deben ser expresados como la cantidad total de ingrediente alergénico por kg de alimento (mg/kg), o como la cantidad de proteína alergénica por kg de alimento, utilizando un apropiado factor que permita la conversión a la cantidad de ingrediente alergénico por kilogramo de alimento.

Sin embargo, los factores de conversión son difíciles de calcular cuando la composición del alimento no es bien conocida y la cantidad de proteína por kilo puede variar según el origen de los ingredientes y a los tratamientos sufridos durante el procesado

Métodos Biología Molecular

Métodos Indirecto : Amplificación de un fragmento del **gen del alérgeno** o de alguna **secuencia genética específica** presente en el alimento alergénico





Métodos de detección de ADN

- Qué estamos detectando ? ADN del alimento alergénico
- Cómo informamos el resultado ? Cualitativo / semicuantitativos / cuantitativos ?
 - Cuantificación ng ADN (número de copias)
- Algunos alérgenos no pueden diferenciarse por PCR
 - Carne vacuno /leche
 - aves /huevo
- Diferente distribución entre ADN y proteína
ADN en baja concentración, leche, proteína de clara de huevo, concentrados de proteína: Falsos negativos
- Problemas en la extracción (presencia de inhibición en alimentos procesados)

Cómo expresar los resultados ?

11.2.4. Expression of the results on allergenic ingredients obtained by DNA analysis

The European Standard EN 15634-1:2009 relative to the detection of allergenic ingredients in foodstuffs by molecular biology methods based on DNA analysis establishes that LODs/LOQs must be expressed as the number of copies of DNA equivalent to a total quantity of the allergenic ingredient per kilogram of food (mg/kg). The equivalence should be based on reference materials certified by the EU, but these are not available at present. In most cases, standard materials have been produced in different laboratories independently by means of genomic DNA purified and quantified “*in situ*”. The more recent European Standard EN 15842 (CEN, 2010) provides general considerations on the validation of the methods of the detection (immunochemical, DNA analysis and chromatography) of allergens and allergenic ingredients in foodstuffs. LODs are expressed in the literature in different ways: as number of copies of DNA, as absolute pg of DNA detected, as pg DNA/mg of food, or as percentage of the allergenic ingredient in food (% w/w) when the value is referred to a spiked or incurred preparation. When using biosensors, the LOD is expressed as molarity (M).

11.2. Detection of allergens and allergenic ingredients in processed foods

La equivalencia debe basarse en materiales de referencia certificados por la UE, pero no están disponibles en la actualidad

Norma europea EN 15842 (CEN, 2010) El LD se expresa en la literatura en diferentes formas: como número de copias de ADN, como pg absoluto de ADN detectado, como pg ADN / mg de alimento, o como porcentaje de ingrediente alergénico en los alimentos (% p / p) cuando el valor se refiere a una muestra fortificada.

La norma europea EN 15634-1: 2009 establece que los LD / LC deben expresarse como el número de copias de ADN equivalente a una cantidad total del ingrediente alergénico por kilogramo de alimento (mg / kg).

UNIDAD DE MEDIDA/EXPRESIÓN DE RESULTADOS



PROTEÍNAS



ADN

Cantidad de ingrediente
alergénico o proteína
alergénica por kilo de alimento
(mg/kg)

Cantidad de ADN (nº de
copias) detectado

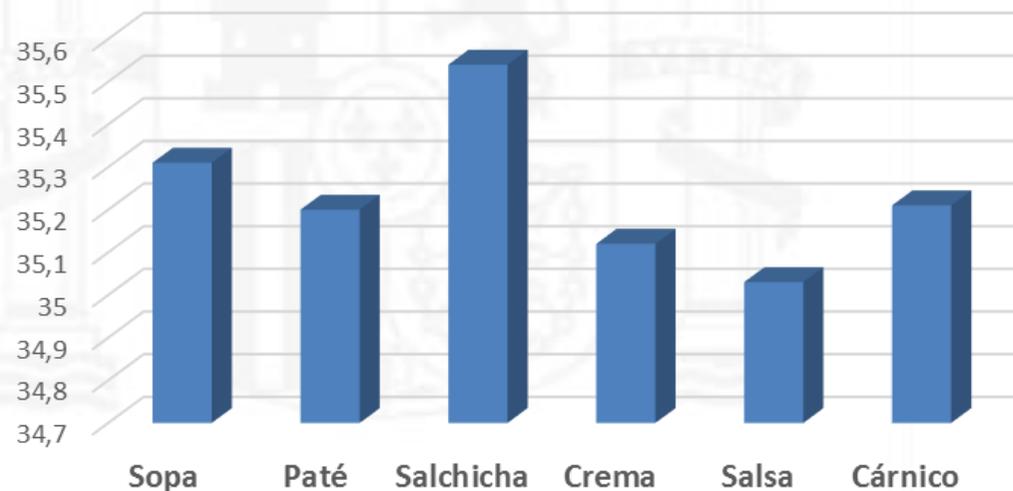


**No se puede establecer una correlación
entre cantidad de PROTEÍNA y cantidad
de ADN**

Necesario:

- ✓ Confirmación Matriz Límite de detección
- ✓ Efecto de la extracción de ADN

Muestras fortificadas con 2,5 mg/kg
de Apio





1.- Cómo elegir el método?

2.- Cómo comprobar la exactitud ?

Qué utilizamos ?

Cómo preparamos la muestra control ?

Cómo asignamos el valor a la muestra control ?

Criterio de aceptación aplicado ?

3.- Límites de detección y cuantificación

4.- Expresión de resultados ?

Diferente diana en métodos inmunológico

Métodos de PCR



Muchas Gracias

Servicio de Biotecnología biotecnologia-CNA@msssi.es

M^a Isabel Prieto Santos mprietos@msssi.es

M^a del Camino Martín Forero mmartinforero@msssi.es

Silvia Gil Alcalde sgil@msssi.es

M^a Isabel Rodríguez Pérez

M^a Luisa Salvador Pulgar

Mercedes Fernandez de la Puebla