

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre proteínas lácteas, alergias y sus métodos de análisis

Miembros del Comité Científico

Andreu Palou Oliver, Juan José Badiola Díez, Arturo Anadón Navarro, Albert Bosch Navarro, Juan Francisco Cacho Palomar, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Lucas Domínguez Rodríguez, Rosaura Farré Rovira, Manuela Juárez Iglesias, Francisco Martín Bermudo, Manuel Martín Esteban, Albert Más Barón, Teresa Ortega Hernández-Agero, Andrés Otero Carballeira, Perfecto Paseiro Losada, Daniel Ramón Vidal, Elías Rodríguez Ferrí, M^a Carmen Vidal Carou, Gonzalo Zurera Cosano

Secretario

Jesús Campos Amado

Número de referencia: AESAN-2010-009

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 28 de septiembre de 2010

Grupo de Trabajo

Francisco Martín Bermudo (Coordinador)
Juan Francisco Cacho Palomar
Alberto Cepeda Sáez
Manuela Juárez Iglesias
Manuel Martín Esteban
Elena Molina Hernández (C. Externa)
Isabel Prieto Santos (CNA-AESAN)

37

Resumen

La leche es un alimento complejo con un 3,3% de proteínas en su composición. Estas proteínas están distribuidas en diferentes fracciones, especialmente las caseínas y las seroproteínas. Sus proteínas son, en general, resistentes a los tratamientos tecnológicos a los que se somete la leche.

La leche es el primer antígeno alimentario conocido con el que las personas entran en contacto. En su composición proteica existen varias proteínas con potencial alergénico. Entre ellas destacan la β -lactoglobulina, las caseínas y la α -lactalbúmina.

Esta situación hace que su consumo pueda desencadenar reacciones alérgicas, que en la mayoría de las ocasiones están mediadas por inmunoglobulina E (IgE). Esta alergia es de tipo inmediato y sus síntomas pueden ser leves y limitarse al sitio de contacto o de carácter general e intensidad variable, llegando incluso a producir reacciones anafilácticas graves. Su prevalencia en España no es superior al 2% y en el 80% de los casos desaparece al alcanzar los 4-5 años. El mejor tratamiento en la actualidad es la eliminación de cualquier alimento que contenga leche en su composición.

La dieta de eliminación es muy difícil de conseguir en la vida real y para poder seguirla es necesario conocer los ingredientes de los alimentos de elaboración industrial. En este sentido, la legislación nacional y europea obliga a reflejar en el etiquetado de un alimento cualquier componente que pueda ser considerado como alérgeno. No obstante, en ocasiones el problema se mantiene porque pueden encontrarse en los alimentos trazas de proteínas lácteas debido a contaminaciones accidentales o adulteraciones.

Actualmente, los métodos para la detección de las proteínas alergénicas de la leche se pueden clasificar en dos grandes grupos: i) métodos basados en la detección directa de las proteínas lácteas mediante técnicas inmunológicas (test radioalergoabsorbente, ELISA, inmunoelectroforesis, ensayo cohete de inmunoelectroforesis, tiras de flujo lateral, *microarrays* y biosensores) o no inmunológicas (espectrometría de masas y cromatografía líquida-espectrometría de masas en tandem) y ii) métodos

indirectos basados en el reconocimiento específico de fragmentos de ADN que codifican una determinada proteína. De todos los métodos disponibles son básicamente los métodos inmunológicos concretamente, los enzimoimmunoensayo tipo ELISA los más recomendables para ser usados por la industria alimentaria. Las razones son que es una técnica: i) rápida; ii) de bajo coste; iii) no requiere personal altamente cualificado; iv) su sensibilidad es muy alta (0,2-1 ppm) y v) su especificidad es elevada.

Palabras clave

Leche, proteínas lácteas, alergias alimentarias, técnicas analíticas, ELISA.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) on milk proteins, allergies and methods of analysis.

Abstract

Milk is a complex food with a 3.3% of proteins in its composition. Milk proteins are classified as caseins and whey proteins. Milk technological treatments usually have a small effect on the antigenic/allergenic potential of milk proteins.

Milk is the first food known antigen that contacts people. Milk contains several proteins that can potentially be involved in allergic sensitization but only a few of them are recognized as being major allergenic, specially β -lactoglobulin, caseins and α -lactalbumin.

This issue implicates that milk consumption generates food allergies. This allergic reaction is characterized by a rapid onset of the symptoms and is mediated by allergen-specific immunoglobulin E. The symptoms can be moderated and limited to the contact site or general and life-threatening. In Spain the prevalence is lower than 2% and disappears in the 80% of the sensitized kids before five years old. Currently, the only effective treatment for milk allergy is avoidance of allergen-containing food.

However total avoidance is sometimes difficult for the allergic individuals since processed food products contain a large variety of ingredients. In this sense national and European legislation elaborated some directives intended to ensure that all consumers are informed of the complete contents of foods and enable them to identify any allergenic ingredient that may be present. Nevertheless, sometimes food products can be contaminated with trace amounts of milk proteins due to fraud or cross-contaminations.

Nowadays, there are several technical possibilities for the detection of milk allergen proteins. The methods employed are either targeting the protein itself or DNA fragments. The first ones are based on immunology techniques (radioallergosorbent test, ELISA, immunoblotting, rocket immunoelectrophoresis, lateral flow test strips, microarrays and biosensors) or not immunological techniques (mass spectrometry and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry). Presently, ELISA technique is the most commonly method used in laboratories of the food industry. The reasons are its high precision (0.2-1 ppm), simple handling and speed, low cost, good potential for standardization and high specificity.

Key words

Milk, milk proteins, food allergies, analytical methods, ELISA.

Introducción

La leche es un componente fundamental de la alimentación a lo largo de toda la vida y especialmente durante la infancia. Además, muchos productos alimenticios y algunos medicamentos contienen leche como ingrediente alimentario.

Las proteínas lácteas pueden desencadenar reacciones alérgicas. Estas reacciones, aunque no son muy frecuentes y, además, suelen ir desapareciendo en los primeros años de vida, sin embargo pueden llegar a ser graves, produciendo incluso en algunos casos episodios anafilácticos.

Ante la importancia de la potencial gravedad de estas reacciones alérgicas, la leche, sus componentes y derivados son ingredientes o sustancias que deben aparecer obligatoriamente en el etiquetado de los alimentos, cualquiera que sea su cantidad, y así lo recogen las normativas españolas y europeas.

Hasta ahora, el método más efectivo que existe para evitar las reacciones alérgicas producidas por el consumo de alimentos y medicamentos que contengan proteínas lácteas es eliminar de la dieta la ingesta de estos productos. Esto pone en evidencia la importancia que tiene para un individuo alérgico a estas proteínas conocer si un alimento las contiene. En este sentido, hay que ser especialmente cuidadoso porque, a veces, pueden encontrarse en los alimentos, de forma no intencionada, trazas de proteínas lácteas. La presencia de estos denominados "Alérgenos Ocultos" puede afectar a la seguridad de los productos alimenticios, ya que puede suponer una amenaza para la salud del consumidor alérgico. Por lo tanto, es necesario disponer de técnicas específicas y lo suficientemente sensibles que permitan detectar cantidades trazas de proteínas lácteas en los alimentos y medicamentos. En este sentido, es importante avanzar en el desarrollo de estas técnicas para que puedan ser empleadas por la industria alimentaria.

El objetivo del presente informe es, fundamentalmente, revisar cual es la situación actual en referencia a los métodos de análisis que existen para detectar las trazas de proteínas lácteas.

Composición de la leche

La leche es una mezcla en equilibrio de proteínas, grasa, carbohidratos, sales y otros componentes menores dispersos en agua en forma de emulsiones, suspensiones coloidales y soluciones verdaderas. La grasa y las vitaminas liposolubles se encuentran en forma de emulsión. Las proteínas se encuentran en dos fases: las caseínas se encuentran dispersas en forma de partículas no sedimentables, llamadas micelas y permanecen en suspensión coloidal y el resto de proteínas (seroproteínas y algunas caseínas solubles), vitaminas hidrosolubles y la lactosa se encuentran en la fase soluble de la leche (Huppertz y Kelly, 2009). La composición media de la leche se muestra en la Tabla 1 (Walstra et al., 2006), aunque varía considerablemente con la raza, lactación, alimentación, época del año y muchos otros factores (Juárez, 1985).

Tabla 1. Composición media de la leche

Componente	%
Agua	87,1
Grasa	3,1
Proteínas	3,3
Caseínas (CAS)	2,60*
Proteínas de suero (PS)	0,40*
Lactosa	4,0
Sólidos totales	8,9
Sustancias minerales	0,7
Ácidos orgánicos	0,17

*Porcentaje referido al valor de proteína.

1. Composición proteica de la leche

La leche contiene una media de 0,5% de nitrógeno (3-3,5% de proteínas), distribuido en diferentes fracciones, de importancia variada desde el punto de vista de la tecnología láctea y la nutrición: caseínas, proteínas solubles o seroproteínas y sustancias nitrogenadas no proteicas. Las proteínas lácteas se presentan en dos fases diferentes: i) una fase micelar inestable constituida por partículas sólidas, que forman micelas en suspensión, que difunden la luz y dan a la leche el aspecto blanco opaco. Son las caseínas y ii) otra fase soluble, constituida por diferentes polímeros proteicos hidrófilos y que se denominan seroproteínas. La composición media de las proteínas lácteas se refleja en la Tabla 2.

Tabla 2. Contenido en proteínas de la leche

	g/Kg	% de proteína total
Proteína total	33,0	100,0
Caseína total	26,0	79,5
α _{s1} -caseína	10,0	30,6
α _{s2} -caseína	2,6	8,0
β-caseína	9,3	28,4
γ-caseína	0,8	2,4
κ-caseína	3,3	10,1
Proteínas de suero	6,3	19,3
α-lactoalbúmina	1,2	3,7
β-lactoglobulina	3,2	9,8
Seroalbúmina	0,4	1,2
Inmunoglobulinas	0,7	2,1
Varias (incluida proteosa-peptona)	0,8	2,4
Proteínas de la membrana del glóbulo graso	0,4	1,2

Fuente: (Walstra et al., 2006) (Fox y McSweeney, 2003).

2. Proteínas lácteas y sus modificaciones durante los procesos tecnológicos

La leche es un alimento muy complejo desde el punto de vista de su composición molecular. Sin embargo, tal y como se señala en la Tabla que a continuación se detalla (Tabla 3), sus proteínas son en general resistentes a la mayoría de los tratamientos tecnológicos a los que se somete la leche, por lo que su potencial alergénico no se ve muy modificado por dichos tratamientos. No obstante, varios procesos de fabricación como el calentamiento, el tratamiento químico o enzimático, los procesos de alta presión o la fermentación, entre otros, pueden alterar su potencial alergénico (Paschke y Besler, 2002).

Tabla 3. Tipos de proteínas más abundantes en la leche, características y efectos de los tratamientos tecnológicos

Tipo de proteína	Características y efectos de los tratamientos tecnológicos
α_{s1} -caseína	Mayoritaria en la leche de vaca (aproximadamente el 34% del total de la proteína de la leche). Es una molécula hidrofóbica que forma parte del interior las micelas y es esencial en la incorporación de Ca a las mismas. Resistente a tratamientos térmicos y sensible a precipitación ácida o enzimática.
α_{s2} -caseína	Menos abundante que la α_{s1} -caseína (aproximadamente el 8% del total de la proteína de la leche). También forma parte del interior de las micelas. Resistente a tratamientos térmicos y sensible a precipitación ácida o enzimática.
β -caseína	Aproximadamente el 25% del total de la proteína. Es la más hidrofóbica de todas las caseínas. Responsable de que durante la refrigeración aumente la hidratación y volumen de las micelas de caseínas.
κ -caseína	Aproximadamente el 12% del total de la proteína de la leche. Responsable de la regulación del tamaño de las micelas de caseínas y de su estabilidad. Es la proteína atacada por el cuajo durante la coagulación enzimática. Es la más sensible a los tratamientos térmicos de todas las caseínas, y la que interactúa con las proteínas séricas desnaturalizadas durante estos tratamientos.
α -lactoalbúmina	Aproximadamente el 4% del total de la proteína de la leche. Es termolábil con tratamientos térmicos severos. Forma agregados con las β -lactoglobulinas.
β -lactoglobulinas	Aproximadamente el 9% del total de la proteína de la leche. Es termolábil y juega un papel muy importante en los tratamientos térmicos por ser la responsable del sabor característico que adquiere la leche tratada térmicamente.
Proteosas-peptonas	Aproximadamente el 2% del total de la proteína de la leche. Presentan acción enzimática y juegan un importante papel digestivo. Son estables a los tratamientos térmicos moderados y a la acción de los ácidos.
Inmunoglobulinas	Aproximadamente el 2% del total de la proteína de la leche. No son específicas de la leche, ya que se encuentran presentes en todos los fluidos corporales. Presentan una función defensiva. Son muy termosensibles.
Seroalbúminas	Representan aproximadamente el 1% del total de proteínas de la leche. Son un grupo muy heterogéneo que presenta la facultad de ligarse de forma reversible dependiendo de las condiciones a diversas sustancias.

1. La alergia a la leche

Aunque se ha demostrado que la leche de varios mamíferos causa reacciones alérgicas, la más frecuente y mejor estudiada es la leche de vaca. En la especie humana, la leche, o una fórmula derivada, suele ser el primer alimento no homólogo que el individuo recibe en cantidades importantes. Esto quiere decir que también es el primer antígeno alimentario con que el ser humano entra en contacto de forma conocida. Por ello, no es de extrañar que sea el alimento que produce mayor número de reacciones adversas en la primera infancia, si bien, aunque en pocas ocasiones, pueden presentarse en cualquier época de la vida, incluso en lactantes con lactancia materna exclusiva.

No todas las reacciones adversas a la leche son reacciones alérgicas. Siguiendo la nomenclatura europea de 2001 (Johansson et al., 2001), refrendada por la *World Allergy Organization* (WAO) (Johansson et al., 2004), bajo el término "hipersensibilidad a leche de vaca" se incluyen tanto la hipersensibilidad no alérgica, conocida tradicionalmente como "intolerancia a leche de vaca", como la hipersensibilidad alérgica a la leche de vaca, o "alergia a la leche de vaca". Esta última situación requiere que en su producción haya un mecanismo inmunológico subyacente.

En la mayoría de los casos, la alergia a la leche es mediada por inmunoglobulina E (IgE), por lo que también se conoce como "alergia inmediata" y se considera como una expresión fenotípica más de la atopía, asociada o no con dermatitis atópica, rinitis alérgica o asma. Sin embargo, un subgrupo de pacientes tiene una alergia a la leche no mediada por IgE ("alergia retardada") (probablemente mediada por células) que presentan principalmente signos y síntomas gastrointestinales en relación con la ingestión de leche. Se incluyen en este grupo una serie de situaciones, generalmente subagudas o crónicas, mediadas principalmente por células T. Algunas pueden, además, asociarse con la presencia de IgE específica (Sampson y Anderson, 2000). Entre las primeras se encuentran las enterocolitis y enteropatías y entre las segundas la colitis alérgica o eosinofílica.

2. Alergia inmediata, mediada por IgE, a la leche

Hay muy pocos datos de incidencia y prevalencia de alergia a alimentos, al contrario de lo que ocurre en otras enfermedades alérgicas, como la rinitis o el asma. Esta situación es tal vez más evidente en el caso de alergia a la leche.

La percepción por la población de la alergia a la leche es mucho más frecuente que la alergia a la leche de vaca confirmada. En un reciente meta-análisis disponible en este campo (Rona et al., 2007), la prevalencia de alergia a leche percibida por el paciente oscila entre 1-17,5% en niños preescolares, 1-13,5% en niños de 5 a 16 años y 1-4% en adultos. Estos valores disminuyen, respectivamente, a 0,5-2, 0,5% y menos de 0,5%, cuando se confirma la situación mediante las técnicas diagnósticas apropiadas. En España los pocos datos publicados muestran una incidencia entre 0,36% y 1,9% de alergia a la leche en el primer año de vida (Sanz et al., 2001) (García-Ara et al., 2003).

La alergia a la leche comienza casi siempre en los primeros meses de vida y pocas veces persiste en el adulto. Aproximadamente, el 50% de los pacientes toleran la leche de vaca al cabo de un año de evolución y el 80% alcanzan su tolerancia hacia los 3 ó 4 años (García-Ara et al., 2004) (Vanto et al., 2004).

Los síntomas y signos son los típicos de cualquier reacción alérgica mediada por IgE. Pueden limitarse al sitio de contacto de la leche o una fórmula derivada, por ejemplo, la orofaringe (síndrome de alergia oral), el tracto gastrointestinal (alergopatía gastrointestinal), la piel (urticaria y dermatitis de contacto por proteínas) o el tracto respiratorio a continuación de una exposición a productos volátiles procedentes del vapor de leche hirviendo (rinoconjuntivitis, asma) (Roberts et al., 2003). Sin embargo, es más frecuente la aparición de reacciones generales a distancia, de intensidad y localización variables, en las que los órganos principalmente involucrados son la piel (urticaria, angioedema) y, en menor grado, el tracto gastrointestinal. Menos frecuente es la afectación del tracto respiratorio o de otros aparatos y sistemas. Ocasionalmente pueden aparecer reacciones graves, como angioedema laríngeo (edema de glotis) o con compromiso cardiovascular, hipotensión y pérdida de conciencia (choque anafiláctico).

En cualquier caso, suelen ser signos y síntomas de aparición inmediata, muchas veces instantánea, casi siempre antes de transcurrida una hora de la ingestión de la leche o un derivado y en clara relación con ella, con evidencia de anticuerpos específicos de la clase IgE, demostrables por pruebas cutáneas y métodos "in vitro". Otra característica a tener en cuenta es que la intensidad de los síntomas no está en relación con la cantidad de leche ingerida, ni con el grado de sensibilización que muestran pruebas cutáneas o la tasa de IgE específica sérica (Allen et al., 2009). Igualmente, en un mismo individuo, la localización, intensidad y duración de los signos y síntomas puede ser cambiante en diferentes episodios. Tampoco una reacción leve o moderada excluye que el paciente pueda tener un grave choque anafiláctico en una siguiente exposición. Los datos publicados sobre la leche como causa de anafilaxia varían entre el 11 y el 28% de los episodios anafilácticos diagnosticados en población pediátrica (Jarvinen et al., 2008). En un estudio en el Reino Unido, la ingestión de leche fue causa de muerte por anafilaxia en 4 de los 8 casos mortales producidos durante 10 años en niños de 0 a 15 años de edad y estuvo involucrada en el 10,9% de episodios anafilácticos mortales o casi mortales ocurridos (Macdougall et al., 2002).

Ante la importancia de la potencial gravedad de sus reacciones alérgicas, la leche, sus componentes y derivados son ingredientes o sustancias que deben aparecer obligatoriamente en el etiquetado de los alimentos, cualquiera que sea su cantidad (anexo III bis de la Directiva 2003/89/CE (UE, 2003)). También existe la posibilidad de anafilaxia con la ingestión de ciertos medicamentos, que contienen en su excipiente leche, como es el caso de algunos preparados de hierro (Larramendi et al., 2006) y de probióticos (Bruni et al., 2009). Además, puede ocurrir lo mismo con medicamentos de uso tópico y cosméticos (Codreanu et al., 2006).

Como en la alergia a otros alimentos, el diagnóstico de la alergia a leche mediada por IgE, se basa en tres elementos (AESAN, 2007): i) una historia clínica cuidadosa; ii) búsqueda y demostración de la presencia de IgE específica para proteínas de leche, bien por prueba cutánea o por inmunoanálisis y iii) comprobación de que los signos y síntomas recogidos en la historia clínica están en relación evidente con la administración de leche, mediante prueba de provocación controlada, siempre que no esté contraindicada.

3. Alérgenos de la leche

Cabe señalar que las proteínas de la leche están reconocidas como importantes alérgenos, y la leche utilizada como ingrediente está afectada por el Real Decreto 1334/1999 y sus posteriores modificaciones (Real Decreto 1245/2008), así como, por la Directiva Comunitaria 2000/13/CE (UE, 2000), posteriormente modificada por la Directiva 2007/68/CE (UE, 2007), que obligan a reflejar en el etiquetado del alimento la presencia de cualquier sustancia empleada en la producción de un alimento que permanezca en el producto final, cuando éste sea considerado material alérgico.

Cualquiera de las proteínas de la leche puede actuar como antígenos en humanos. La β -lactoglobulina (β -LG) es la proteína que con mayor frecuencia induce respuestas clínicas, seguida de caseínas, α -lactalbúmina (α -LA) y, mucho menos frecuente, de seroalbúmina bovina (BSA). Puede haber diferencias en relación con la población estudiada y en la mayoría de casos hay más de un alérgeno involucrado (Wal, 1998). Se ha postulado que se podrían formar nuevos alérgenos durante la digestión enzimática de las proteínas, pero no existe suficiente evidencia que sustente esta teoría. La importancia alérgica de otras proteínas de la leche, como transferrina y gammaglobulina bovina es mínima (Bernhisel-Broadbent et al., 1991).

La β -LG es termolábil, pero relativamente resistente a la hidrólisis ácida y a la digestión por proteasas, lo que permite que algunas moléculas queden intactas después de la digestión y sean absorbidas, estimulando el sistema inmunitario. Al haberse detectado en la leche materna, en la que no existe una proteína homóloga, se cree que puede inducir sensibilización y/o sintomatología en niños que reciben lactancia materna exclusiva (Wal, 2004).

La mayoría de los pacientes alérgicos a caseína están sensibilizados a los cuatro tipos de caseína (Restani et al., 1995). Se ha observado que la sensibilización a determinados epítomos secuenciales de caseínas α_{s1} , α_{s2} y κ , constituye un marcador de persistencia de la alergia a leche (Järvinen et al., 2002).

La albúmina bovina sérica (BSA) es la misma proteína que se encuentra en la carne de vacuno, por lo que los pacientes sensibilizados pueden presentar reacciones al comer este tipo de carne, especialmente si está cruda o poco hecha, ya que la BSA es una proteína termolábil y se desnaturaliza durante el cocinado. Se ha comprobado reacción a la carne de vaca entre el 13-20% de personas alérgicas a leche (Martelli et al., 2002).

La leche de vaca tiene reacción cruzada con las de otros bóvidos, como cabra y oveja, debido a la homología existente entre sus proteínas, especialmente la β -LG. La mayor parte de los alérgicos a leche de vaca no toleran la leche de estas especies, pero también se han descrito reacciones alérgicas selectivas a leche de cabra o de oveja con buena tolerancia clínica a leche de vaca (Martins et al., 2005). La homología es mucho menor con la de suidos (cerda), équidos (yegua y burra) y camélidos (camella, dromedario), así como la leche humana. Es interesante señalar que la leche de camella y dromedaria, igual que la leche humana, no contienen β -LG.

Clínicamente, la persistencia de la alergenidad en leche tratada térmicamente se confirma por el hecho de que en algunos niños se presenta alergia a leche después de la ingestión de leche tratada de esta forma. Además, el calentamiento sólo puede modificar epítomos conformacionales, que podrían perder su capacidad de enlace para la IgE específica, mientras que los epítomos secuenciales o estructurales mantienen su potencial alérgico incluso después del calentamiento. Las proteínas

de la leche contienen ambos tipos de epítomos, pero parece que los epítomos de β -LG y de la caseína son más estructurales que conformacionales (Ball et al., 1994) (Kohno et al., 1994), y, aunque con el calentamiento puede observarse una ligera reducción de la alergenicidad de las proteínas de suero de leche, es insignificante con las caseínas.

Para complicar aún más el cuadro, el calentamiento intenso, tal como el utilizado para determinados procesos de esterilización y UHT (*Ultra-high temperature*), así como el menos drástico de pasteurización, han demostrado que incrementan algunas características alergénicas (Roth-Walter et al., 2008). Además, las proteínas de la leche pueden oxidarse durante el tratamiento industrial, resultando en la formación de residuos de aminoácidos modificados, particularmente en la β -LG, que pueden ser responsables del desarrollo de nuevas estructuras inmunorreactivas (Fenaille et al., 2005).

4. Tratamiento de la alergia a la leche

Puesto que la dieta es fundamental en el manejo del individuo con alergia a alimentos, cualquier transgresión, voluntaria o involuntaria, puede conducir a una respuesta clínica de intensidad imprevisible. Por ello, es necesario:

1. La eliminación de la leche, de derivados y de otros alimentos con reacción cruzada conocida en los que se haya comprobado que producen síntomas.
2. Educación del paciente y su familia, acerca de la dieta de eliminación y posibles fuentes ocultas para evitar su ingestión accidental.
3. Tratamiento de los síntomas ante su ingestión accidental.
4. Consejos nutricionales para asegurar una alimentación adecuada.

La dieta de eliminación que parece fácil, económica y cómoda de llevar a cabo, es muy difícil de conseguir en la vida real (Nowak-Wegrzyn et al., 2001), por lo que la aparición de episodios agudos por ingestión accidental es frecuente (Boyano-Martínez et al., 2009).

La tarea de prevenir totalmente la ingestión o el contacto con leche y derivados, obliga a una serie de restricciones que no solo consisten en la simple exclusión directa del alérgeno por el paciente, sino que se extienden al entorno del alérgico, de su familia y de su círculo social. Para seguir una dieta de exclusión correcta es necesario conocer los ingredientes de los alimentos de elaboración industrial (Warner, 2005) y sus denominaciones y cuidar las contaminaciones entre alimentos. Todo ello dificulta la compra de alimentos elaborados, lleva a restringir las actividades sociales como las comidas fuera de casa, la asistencia a fiestas infantiles o de otras actividades de ocio. En ocasiones, estos niños pueden sufrir dificultades para ser admitidos en comedor escolar o para participar en actividades extraescolares donde no puede garantizarse un estricto control de los alimentos (Bollinger et al., 2006). A ello hay que unir la ansiedad generada por el miedo de las familias a que su hijo presente una reacción adversa por confusión, inadvertencia, accidente y/o falta de suficiente vigilancia. La normativa sobre etiquetado (Real Decreto 1334/1999) solo facilita parcialmente la tarea diaria, ya que la nota precautoria de "puede contener" como elemento protector del fabricante limita aun más de lo estrictamente necesario las opciones de consumo. En ocasiones, en sensibilizaciones graves, las familias optan por estrategias más drásticas y el alimento implicado no entra en el domicilio familiar o se duplican utensilios de cocina, almacenaje, etc., para evitar confusiones.

En el terreno de los contactos, además de la manipulación más o menos voluntaria o inadvertida, entran en juego situaciones relacionadas con la afectividad como besos o caricias que son causa de urticaria local por haber tomado o tocado otra persona el alimento alergénico. Este hecho es referido frecuentemente por las familias, en relación a besos tras tomar leche o por aplicar crema o peinar o asear al niño con un lavado insuficiente de las manos tras manipular alimentos. Igualmente frecuentes son los síntomas por contaminación a través de instrumentos de cocina, equivocación de cubiertos, confusión con servilletas, etc. que motivan una atención continua y estresante por parte de los familiares de pacientes anafilácticos (Teufel et al., 2007). Es frecuente la aparición de episodios en relación con juegos infantiles de arrojarse comida, vómitos de otros niños, estornudos que dispersan leche, contactos a través de manos en fiestas infantiles, etc.

Ante estas dificultades, la dieta de eliminación sería más fácil de seguir con la ayuda del conocimiento de las dosis umbral, reactiva y no reactiva, para cada individuo, que permitirían conocer el riesgo de cada paciente en la eventualidad de una posible transgresión. Sin embargo, los datos disponibles son muy variables, por lo que resulta difícil realizar pronósticos personalizados de riesgo de reacción (Moneret-Vautrin y Kanny, 2004). Además, la utilidad de conocer la dosis que no provoque efectos alergénicos resultaría fundamental para regular normativas industriales basadas en la disponibilidad de métodos de detección suficientemente sensibles y específicos para determinar el contenido de proteínas de leche en los alimentos y su indicación en el etiquetado.

Afortunadamente, están surgiendo nuevas posibilidades de tratamiento y control de la alergia alimentaria, mediante procedimientos de inmunomodulación, dirigidos preferentemente a pacientes de alto riesgo (Burks et al., 2008). Entre ellos, los que se encuentran más avanzados y con resultados muy aceptables son la inmunoterapia sublingual y la desensibilización oral o inducción de tolerancia (Zapatero et al., 2008). También están en fase experimental nuevas estrategias que incluyen aspectos como la inmunoterapia con proteínas mutadas, la inmunoterapia con péptidos, la inmunización con ADN y otros, todos ellos dirigidas a disminuir las respuestas Th2 nocivas.

Métodos para la detección de proteínas lácteas en cantidades trazas

El método más efectivo hasta ahora para evitar las reacciones alérgicas producidas por el consumo de sustancias alergénicas, como por ejemplo las proteínas de la leche, como se ha mencionado anteriormente, es evitar el consumo del alimento que causa la alergia. De ahí la importancia que tiene para un individuo alérgico conocer si un alimento contiene el o los ingredientes que causan su alergia, para así poder evitar su consumo. Esta necesidad queda recogida en varios Reales Decretos y Directivas Europeas, donde se obliga a reflejar en el etiquetado de un alimento cualquier componente que pueda ser considerado como alérgeno. Sin embargo, el problema se mantiene debido a que en muchos casos trazas de ingredientes alergénicos pueden encontrarse en los alimentos de forma no intencionada, como consecuencia de adulteraciones o debido a contaminaciones accidentales durante el transporte o procesado. La presencia de estos denominados "Alérgenos Ocultos" puede afectar a la seguridad de los productos alimenticios, ya que puede suponer una amenaza para la salud del consumidor alérgico.

Se han detectado proteínas ocultas de leche en diversos productos como, mermelada, jamón cocido, salchichas, cereales, galletas, dulces, conservas, atún, chocolate, café, vinos, queso de soja vegetariano y

polvo de guantes de látex (Gern et al., 1991) (Giovannacci et al., 2004). Por lo tanto, es necesario disponer de técnicas específicas y lo suficientemente sensibles para poder asegurar su detección en los alimentos. El reto de hoy, es la detección y la cuantificación de pequeñas cantidades, "trazas" de alérgenos en mezclas de alimentos que, sin embargo, son capaces de provocar reacciones alérgicas a veces graves.

Actualmente, los métodos para la detección de las proteínas alergénicas de la leche al igual que para el resto de alérgenos, se pueden clasificar en dos grandes grupos: métodos basados en la detección directa de las proteínas lácteas mediante técnicas electroforéticas, cromatográficas y espectrométricas de alta resolución, y técnicas inmunoquímicas y métodos indirectos, basados en el reconocimiento específico de fragmentos de ADN que codifican una determinada proteína, en este caso alergénica, mediante técnicas genéticas. Sin embargo, del rango de métodos disponibles para esta finalidad, son básicamente los métodos inmunológicos concretamente, los enzimoimmunoensayo tipo ELISA y recientemente los métodos basados en técnicas genéticas PCR, los más utilizados en los análisis de rutina para la detección y cuantificación de alérgenos, mientras que el resto de métodos son, hoy por hoy, sólo aplicables en el campo de investigación.

1. Técnicas inmunológicas

Estas técnicas están basadas en el reconocimiento de una determinada proteína por los anticuerpos específicos generados frente a ella. Las principales ventajas de estas técnicas son su elevada sensibilidad y especificidad, por lo que son muy apropiadas para analizar una proteína minoritaria contenida en una mezcla compleja.

Radioalergosorbent test (RAST) y enzimoalergosorbent test (EAST)

La mayoría de las técnicas de diagnóstico de alergias alimentarias en pacientes utilizan las propiedades del suero sanguíneo de los individuos alérgicos. El suero contiene anticuerpos IgE que reconocen específicamente y se unen a los antígenos (alérgeno). Métodos inmunológicos basados en la utilización de anticuerpos IgE como *radioalergosorbent test* (RAST) y *enzimoalergosorbent test* (EAST), pueden ser también utilizados en la detección y cuantificación de alérgenos en alimentos.

Existen varias referencias sobre la utilización de estas técnicas en la detección de alérgenos de la leche (Walsh et al., 1987) (Adams et al., 1991) (Frémont et al., 1996). Para su aplicación al análisis de alimentos, ha sido necesario realizar algunas modificaciones como, por ejemplo, una primera etapa en la que se lleva a cabo una preincubación de los sueros humanos con las proteínas extraídas de los respectivos alimentos y, posteriormente, la determinación de la disminución de la cantidad de anticuerpos específicos IgE que se une a la fase sólida donde se encuentra fijado el alérgeno (método de inhibición de RAST/EAST). Mediante este sistema, Frémont et al. (1996) fueron capaces de detectar niveles de 1 µg de α-LA en 1 gramo de alimento (1 ppm), en una papilla infantil de cereales contaminada con proteínas de leche y responsable de un brote de respuesta alérgica.

Sin embargo, la utilización de estas metodologías para la detección de alérgenos en la industria alimentaria es muy limitada. En primer lugar, debido a la gran variabilidad que existe en la producción de IgE, dependiendo del individuo y en consecuencia de la dificultad que supone poder estandarizar estos sistemas y segundo, a la falta de disponibilidad de sueros en pacientes alérgicos.

En conclusión, los métodos RAST y EAST se pueden considerar una herramienta ideal para la caracterización de las propiedades de los epítomos para IgE de los alérgenos alimentarios y comprobar su actividad en distintas formas como extractos de proteínas crudas, preparaciones de alérgenos purificados, actividad alérgica de diferentes variedades o especies y en varios alimentos (Besler et al., 2001), pero no pueden considerarse un sistema de elección para su aplicación a la detección de alérgenos en alimentos.

Métodos ELISA

De todos los métodos inmunológicos disponibles, el sistema más utilizado para la detección de alérgenos en alimentos es el ensayo de inmunoenzimología (ELISA). Son varios los trabajos publicados sobre métodos ELISA para la detección de la presencia de alérgenos de la leche en alimentos. Para el desarrollo de estos sistemas se han utilizado sueros o anticuerpos, policlonales o monoclonales, obtenidos a partir de animales inmunizados con proteínas lácteas. Los sistemas descritos, han mostrado una clara preferencia por la obtención de anticuerpos policlonales, debido a que estos reaccionan frente a diferentes epítomos de la proteína, lo que permite el reconocimiento en diferentes grados de desnaturalización (Gern et al., 1991) (Mäkinen-Kiljunen y Palosuo, 1992) (Venien et al., 1997) (Hefle y Lambrecht, 2004).

El primer paso en el diseño de los métodos de detección de ingredientes alérgicos en los alimentos requiere la selección e identificación del analito diana. En el caso de la leche, como ya se ha indicado, todas las proteínas (caseínas, α -LA, β -LG, etc.) poseen capacidad alérgica (Monaci et al., 2006), por lo que el desarrollo de los métodos inmunológicos se ha dirigido indistintamente a la utilización como base del método de anticuerpos obtenidos bien frente a proteínas individuales como caseínas o β -LG o bien anticuerpos obtenidos frente a las proteínas totales de la leche. Así, podemos encontrar entre los trabajos publicados varios sistemas ELISA que utilizan anticuerpos obtenidos frente a β -LG, debido a que las β -LG son el principal alérgeno presente en el suero de leche y representan el 0,2-0,4% de la leche bovina. Como ejemplos podemos citar, el ELISA tipo sándwich desarrollado para la detección de niveles bajos de leche en alimentos infantiles, con una sensibilidad capaz de detectar niveles de 1-2 μ g/l (Mäkinen-Kiljunen y Palosuo, 1992), un ELISA indirecto con anticuerpos monoclonales frente a β -LG (Venien et al., 1997) y, recientemente, varios trabajos sobre el desarrollo y evaluación de sistemas ELISA capaces de detectar niveles bajos de β -LG, en alimentos, consiguiendo niveles de detección entre 0,2-1 ppm (De Luis et al., 2009) (Frantisek et al., 2009) (Peláez-Lorenzo et al., 2010).

Simultáneamente, se han desarrollado y validado sistemas ELISA basados en la utilización de anticuerpos frente a las caseínas. Por ejemplo: i) un ELISA para la detección de contaminaciones de leche en alimentos mediante anticuerpos policlonales anticaseína, con una sensibilidad capaz de detectar niveles de 0,5 ppm de caseína (Hefle y Lambrecht, 2004); ii) un ELISA capaz de detectar niveles del orden de 1-1,5 ppm de caseína en alimentos procesados como purés de patatas, sopas deshidratadas, mezcla de harinas y mezclas de especias (Sletten et al., 2005); o iii) estudios de colaboración para la validación de kits comerciales ELISA sándwich desarrollados para detectar caseína y proteínas totales de leche en alimentos (Matsuda et al., 2007). Recientemente, se ha publicado un estudio sobre la aplicación de un método ELISA indirecto para la detección de residuos de caseína y

caseinatos en vinos, debido a la permanencia de estas sustancias, como consecuencia de tratamientos en las distintas etapas del procesado (Patrick et al., 2009).

También es necesario tener en cuenta que la matriz influye sobre los límites de detección que se pueden alcanzar en los productos procesados, lo que depende de una serie de parámetros tales como el contenido graso, la intensidad del tratamiento térmico, el estado de maduración del alimento, etc. por lo que pueden variar de un producto a otro.

Actualmente, se pueden encontrar disponibles en el mercado diversos kits ELISA desarrollados por distintas casas comerciales, destinados a la detección de residuos de leche en todo tipo de alimentos. Estos sistemas ELISA diseñados en formato directo o ELISA sándwich, utilizando anticuerpos frente a β -LG y/o caseínas, aseguran la detección de proteínas nativas y proteínas procesadas de la leche y declaran límites de detección del orden de 0,2 a 1 ppm. Aunque sería conveniente tener en cuenta que estos métodos estén correctamente contrastados. No obstante, actualmente los métodos de ELISA son los más recomendables para ser usados por la industria alimentaria. Las razones son que es una técnica: i) rápida; ii) de bajo coste; iii) no requiere personal altamente cualificado; iv) su sensibilidad es muy alta (0,2-1 ppm) y v) su especificidad es elevada.

Métodos de inmunolectroforesis "Inmunoblotting"

Otros métodos inmunoquímicos que incluyen la separación electroforética de las proteínas de los alimentos han sido también utilizados en la detección de residuos de proteínas lácteas en alimentos. Están basados en la separación electroforética de las proteínas alergénicas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), bien, de acuerdo a su peso molecular (geles 1D) o simultáneamente de acuerdo a su peso molecular y a su punto isoelectrónico (geles 2D). Las proteínas una vez separadas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa o polivinilpirrolidona y, posteriormente, revelado por inmunodetección mediante la incubación de la membrana con anticuerpos específicos monoclonales. Estos sistemas tienen como ventaja la capacidad de separar y revelar los componentes proteicos tanto en alimentos crudos como ligeramente cocinados, además la separación de las proteínas garantiza una mayor especificidad del método cuando analizamos muestras complejas. Sin embargo, la aplicación de estos métodos en alimentos fuertemente termostatizados o en productos esterilizados no es muy eficiente, ya que en ellos las proteínas se encuentran desnaturizadas y formando agregados, lo que dificulta su separación. Además, el desplegado proteico causado por el SDS en la técnica PAGE puede ocasionar la pérdida conformacional de los epítomos; esto representa una desventaja que unida a la dificultad que conlleva la realización de esta técnica, hace que en estos momentos no sea considerado un método de elección para su aplicación a los análisis rutinarios. Sin embargo, podemos encontrar publicaciones sobre su utilización como, el estudio de antígenos y alérgenos de la leche (Kim et al., 2002), y la comparación de métodos *immunoblotting* y ELISA para la detección de residuos de caseína en vinos (Patrick et al., 2009).

La transferencia *blotting* después de isoelectroenfoque (IEF), puede también utilizarse en la detección de alérgenos. En esta técnica, las proteínas se separan en geles de agarosa por IEF y una vez transferidas a membranas se sondan utilizando técnicas de inmunodetección. En contraste con el SDS-PAGE, esta técnica sí preserva la conformación de los epítomos. Estos sistemas se utilizaron para

la detección de alérgenos alimentarios (leche y del huevo), utilizando sueros humanos (Demeulemester et al., 1997).

Rocket Inmunolectroforesis (RIE)

Este método inmunolectroforético se basa en la aplicación de la corriente eléctrica a la inmunodifusión simple, obteniéndose resultados que se pueden cuantificar. Los anticuerpos se añaden sobre un medio gelificado que se somete a un campo eléctrico, perpendicularmente al sentido de la corriente eléctrica, sobre el que se disponen pocillos que contienen las muestras problema. La difusión electroforética del antígeno a través del gel que contiene el anticuerpo permite la aparición de líneas de precipitado en forma de conos o cohetes. La distancia entre el pocillo y la punta del cono (altura del cohete) es directamente proporcional al logaritmo de la concentración del antígeno presente en la muestra.

El método RIE fue utilizado para detectar la presencia de caseína en guantes de látex de caucho natural. La caseína se utiliza como estabilizador en la producción de guantes de látex y puede producir alergias de contacto en individuos alérgicos a las proteínas de la leche (Ylitalo et al., 1999).

En 2003 se desarrolló un método RIE utilizando un antisuero anticaseína, disponible comercialmente. Con este método, se consiguió la cuantificación de cantidades desconocidas de caseína en muestras de alimentos como resultado de establecer una correlación lineal entre la altura de los precipitados de los obtenidos y la cantidad de caseína aplicada (Moen et al., 2003). En este estudio, mediante la técnica RIE se alcanzó un límite de detección de 10 ppm para la caseína y se describió como una técnica menos cara que los kits comerciales de ELISA. A pesar de sus posibilidades, la RIE es una técnica que requiere mucho tiempo y anticuerpos de alta calidad, y que necesita, igualmente personal entrenado y especializado en este campo, por lo que no se considera un método práctico para su aplicación a la industria alimentaria.

Tiras de flujo lateral

El ensayo mediante las tiras de flujo lateral es una versión simplificada del ELISA con una tira membranosa generalmente, de nitrocelulosa, *nylon* o polivinildifluorido en la que se fijan los inmunorreactivos, antígenos o anticuerpos y sobre la que posteriormente se aplican los reactivos que van a reaccionar inmunológicamente. Estos métodos son muy sencillos en cuanto a su manejo y puede interpretarse visualmente o de una forma semicuantitativa, por ejemplo, mediante un densitómetro.

Durante la última década son muchos los sistemas desarrollados para la detección de los distintos alérgenos y existen disponibles en el mercado sistemas para la detección de otros alérgenos alimentarios como gluten, avellana y cacahuete (Hsiao-Wei et al., 2005) (Martin-Röder et al., 2009). La finalidad de estos sistemas, es su utilización como sistemas cualitativos de detección, debido a su rapidez y facilidad de manejo. Actualmente, se están desarrollando estos sistemas como indicadores de posibles contaminaciones en las instalaciones industriales.

Microarrays

El avance en el desarrollo de los sistemas *microarrays* se ha visto conducido por la necesidad del desarrollo de nuevas tecnologías, rápidas y sensibles y que necesiten la menor cantidad de muestra. Los *microarrays* consisten en microchips de reducidas dimensiones en los que se han inmovilizado

elementos moleculares específicos (por ejemplo, anticuerpos específicos a ciertos alérgenos o proteínas marcadoras de alimentos) mediante microimpresión o microinstrucción, formando una superficie conocida. Tras poner en contacto dicha superficie con los anticuerpos específicos, estos se fijan a los componentes y posteriormente se detectan revelando con precisión el perfil obtenido. Distintos sistemas de lectura, análisis de datos y *software* de procesado de imagen están disponibles para varias técnicas dependiendo del uso analítico de *microarray*.

El desarrollo de la tecnología de los *arrays* ha supuesto un gran avance en el diagnóstico de las alergias alimentarias, sobre todo, en el conocimiento de la reactividad cruzada entre alérgenos y de la selectividad de las sensibilizaciones, ya que es posible un análisis múltiple y rápido de los productos alergénicos de los alimentos (Talapatra et al., 2002) (Moreno-Bondi et al., 2003). Por el momento es impensable su uso de forma estandarizada por la industria alimentaria.

Harwanegg et al. (2007) han desarrollado un sistema de *microarrays* para el diagnóstico de IgE específica frente a proteínas de leche y de huevo basado en un *multiplex* biochip inmunoensayo.

Esta técnica, también asociada a la detección por infrarrojos, ha sido utilizada para el estudio de los principales alérgenos de la leche (Gaudin et al, 1991).

Biosensores

Una de las tecnologías emergentes en las últimas décadas ha sido la utilización de biosensores. Los biosensores son dispositivos de análisis compactos que incorporan un elemento de reconocimiento, biológico o biomimético, asociado a un sistema de transducción que permite amplificar y registrar en tiempo real la señal producida por la interacción específica entre el elemento de reconocimiento y el analito. La molécula diana (proteína o fragmento de ADN) es inmovilizada sobre la superficie de un sensor, la actividad producida como consecuencia de la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito puede ser medida cuantitativamente. Existen distintos tipos de traductores y su elección se hace en función de cual sea la variación en las propiedades físico-químicas que se produzcan como consecuencia de la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento. Los principales tipos son electroquímicos (detectan cambios en el potencial o pH), ópticos (variaciones en la resonancia de absorción (REA)), fluorescencia, luminiscencia o transductores de resonancia de plasmones superficiales (SPR), ondas de evanescencia, acústicos, termométricos y nanomécanicos.

En los últimos años se ha producido un incremento en la aplicación de biosensores al análisis de alimentos y, concretamente, en la detección de alérgenos. En 2006, Malmheden Yman et al. describen el desarrollo de un biosensor para ser utilizado con sistemas de enzimoensayo directo y sándwich para la detección de proteínas de leche y otros alérgenos como cacahuete, mariscos y sésamo en muestras de alimentos.

Un biosensor óptico basado en REA con un inmunoensayo directo fue desarrollado, como un sistema rápido de detección de β -LG en matrices de alimentos, por Hohensinner et al. en 2007.

2. Técnicas no inmunológicas

Espectrometría de masas

El desarrollo de la espectrometría de masas ha jugado un papel fundamental en el estudio e identificación de las proteínas mediante el empleo del denominado "mapeo de masas" o huella

peptídica, englobada en el área denominada como proteómica. Es el método más utilizado hasta el momento en estudios de proteómica debido a su compatibilidad con el análisis de mezclas, su extensa aplicabilidad y la relativa sencillez de interpretación de los resultados.

Actualmente, existe una potente herramienta no inmunológica (la espectrometría de masas, MALDI/TOF-MS) que, a diferencia de los métodos ELISA y otros métodos inmunológicos, permite identificar proteínas alergénicas sin necesidad de utilizar anticuerpos específicos frente a ellas. La tecnología MALDI/TOF-MS (espectrometría de masas por tiempo de vuelo con desorción e ionización con láser asistida por matriz) es una herramienta no inmunológica fiable para la detección de alérgenos en los alimentos. El método se basa en la comparación de los perfiles de las proteínas extraídas del alimento frente a los perfiles característicos (espectros de masas) de las diferentes proteínas extraídas de estándares del alérgeno. Mediante este método es posible la identificación y cuantificación del alérgeno en alimentos. El método es rápido, el manejo e interpretación rutinarios de los espectros es relativamente sencillo, la manipulación de la muestra fácil y reproducible y el costo del análisis es bajo. Sin embargo, el equipo es costoso, no accesible a cualquier laboratorio y requiere instalaciones amplias, siendo complejo el proceso de elaboración de librerías de perfiles de espectros y la calibración del equipo.

Sistema de cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (cuádruplo-cuádruplo-tiempo de vuelo)

En los últimos años, el proceso de análisis en proteómica implica una sistemática de acuerdo a la cual una mezcla inicial de proteínas es separada mediante electroforesis en geles de una o dos dimensiones; posteriormente, el gel se digiere con tripsina y, por último, el digerido se analiza directamente mediante espectrometría de masas. En la mayoría de los casos, el digerido se suele analizar empleando una única técnica de ionización, siendo la ionización de electrospray (ESI) o la ionización por desorción con láser asistida por una matriz (MALDI) las más utilizadas, por tratarse de ionizaciones de tipo suave. Sin embargo, esta técnica puede verse afectada puntualmente por efectos de supresión, limitando el número de péptidos identificados en una muestra. Por ello, además de la ionización suave de un sistema de espectrometría de masas adecuado a estudios de proteómica, también se requiere la posibilidad de poder inducir fragmentaciones superiores que posibiliten el análisis de secuencias peptídicas. En este sentido, la información secuencial producida por el MALDI mediante PSD se ve superada por el empleo de ESI, o *nanospray* que acoplada a un espectrómetro de masas híbrido de cuadrupolo-cuadrupolo-tiempo de vuelo ortogonal produce una información secuencial de mejor calidad. Además, es capaz de detectar péptidos que han podido quedar suprimidos en los espectros de MALDI, lo que resulta ideal en los estudios de proteómica.

Podemos encontrar la aplicación de estas metodologías en el campo analítico de los alérgenos de la leche, en estudios para la detección y cuantificación de las proteínas del suero (Hubber y Premstaller, 1999), el sistema de cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas utilizando ionización por *nanoelectrospray* con cuadrupolo tiempo de vuelo para la detección de caseína en alimentos (Weber et al. 2006), o un método desarrollado de espectrometría de masas, utilizando extracción en fase sólida para detectar trazas de alérgenos de leche en muestras de zumos de frutas (Monaci y Van Hengel, 2008).

3. Técnicas basadas en la detección de ADN

Como alternativa a los métodos de detección de las proteínas alergénicas, se pueden utilizar métodos basados en la detección de dianas que no poseen potencial alergénico, pero que podrían servir como marcadores indirectos para la detección de ingredientes alergénicos en productos alimentarios.

Se han descrito métodos para la detección de ADN de leche mediante PCR en productos alimentarios, pero sobre todo los métodos de biología molecular se han utilizado para la identificación de la procedencia de la leche entre las distintas especies (Plath et al., 1997).

Así pues, los métodos de PCR pueden ser considerados una herramienta para la detección de la presencia de leche en mezclas de alimentos, pero en la práctica no están adaptados para la detección de los alérgenos de la leche. Por tanto, su aplicación para este fin es cuestionable, primero por la posibilidad de aparición de falsos positivos ya que, por ejemplo, la presencia de carne de vaca podría ocasionar reacciones de amplificación y segundo debido a que muchos productos contienen sólo fracciones concentradas y/o purificadas de la leche, como proteína o grasas, lo que podrían llevar a la obtención de resultados negativos en el análisis por PCR (Poms y Anklam, 2004).

A pesar de estos inconvenientes, actualmente algunas casas comerciales han desarrollado kits comerciales para la detección de alérgenos, entre ellos de leche, mediante PCR en alimentos, los cuales son de utilidad cuestionable.

Conclusiones del Comité Científico

1. Las trazas de proteínas lácteas pueden desencadenar reacciones alérgicas de potencial gravedad en las personas sensibilizadas a las mismas. Así pues se hace necesario utilizar unos métodos de análisis adecuados que permitan detectar un nivel mínimo de presencia de proteínas lácteas.
2. En la actualidad existen numerosos métodos para la detección de alérgenos lácteos.
3. De todos ellos los más recomendables para ser usados, en la actualidad, por la industria alimentaria son los métodos de ELISA. Las razones son que es una técnica: i) rápida; ii) de bajo coste; iii) no requiere personal altamente cualificado; iv) su sensibilidad es muy alta (0,2-1 ppm) y v) su especificidad es elevada. No obstante, es conveniente tener siempre en cuenta que los kits de ELISA empleados estén correctamente contrastados.
4. El hecho de disponer de tecnologías que permiten medir la presencia de trazas de proteínas lácteas no asegura la ausencia de problemas.

Referencias

- Adams, S.L., Barnett, D., Walsh, B.J., Pearce, R.J., Hill, D.J. y Howden, M.E. (1991). Human IgE-binding synthetic peptides of bovine beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin. In vitro cross-reactivity of allergens. *Immunology and Cell Biology*, 69, pp: 191-197.
- AESAN (2007). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición sobre Alergias Alimentarias. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 5, pp: 19-76. Disponible en: http://www.aesan.msps.es/AESAN/web/publicaciones_estudios/subdetalle/revista_aesan_5.shtml [acceso: 10-9-10].
- Allen, K.J., Davidson, G.P., Day, A.S., Hill, D.J., Kemp, A.S., Peake, J.E., Prescott, S.L., Shugg, A., Sinn, J.K. y Heine,

- R.G. (2009). Management of cow's milk protein allergy in infants and young children: an expert panel perspective. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 45, pp: 481-486.
- Ball, G., Shelton, M.J., Walsh, B.J., Hill, D.J., Hosking, C.S. y Howden, M.E. (1994). A major continuous allergenic epitope of bovine betalactoglobulin recognized by human IgE binding. *Clinical and Experimental Allergy*, 24, pp: 758-764.
- Bernhisel-Broadbent, J., Yolken, R.H. y Sampson, H.A. (1991). Allergenicity of orally administered immunoglobulin preparations in food-allergic children. *Pediatrics*, 87, pp: 208-214.
- Besler, M., Steinhart, H. y Paschke, A. (2001). Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *Journal of Chromatography*, 756, pp: 207-228.
- Bollinger, M.E., Dahlquist, L.M., Mudd, K., Sonntag, C., Dillinger, L. y McKenna, K. (2006). The impact of food allergy on the daily activities of children and their families. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 96, pp: 415-421.
- Boyano-Martínez, T., García-Ara, C., Pedrosa, M., Díaz-Pena, J.M. y Quirce, S. (2009). Accidental allergic reactions in children allergic to cow's milk proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123, pp: 883-838.
- Bruni, F.M., Piacentini, G.L., Peroni, D.G., Bodini, A., Fasoli, E. y Boner, A.L. (2009). Cow's milk allergic children can present sensitisation to probiotics. *Acta Paediatrica*, 98, pp: 321-323.
- Burks, A.W., Laubach, S. y Jones, S.M. (2008). Oral tolerance, food allergy and immunotherapy: implications for future treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121, pp: 1344-1350.
- Codreanu, F., Morisset, M., Cordebar, V., Kanny, G. y Moneret-Vautrin, A. (2006). Risk of allergy to food proteins in topical medicinal agents and cosmetics. *Allergy and Immunology*, 38, pp: 126-130.
- De Luis, R., Lavilla, M., Sánchez, L., Calvo, M. y Pérez, M.D. (2009). Development and evaluation of two ELISA formats for the detection of β -lactoglobulin in model processed and commercial foods. *Food Control*, 43, pp: 235-246.
- Demeulemester, C., Leduc, V., Polack, B., Huneau, J.F., Le Guern, L., Guizard, C. y Peltre, G. (1997). Antigenes et allergenes de lait, de blanc d'oeuf, de soja. 2 - Dans les produits carnés. *Annales des Falsifications de l'Expertise Chimique et Toxicologique*, M9 (940), pp: 235-246.
- Fenaille, F., Parisod, V., Tabet, J.C. y Guy, P.A. (2005). Carbonylation of milk powder proteins as a consequence of processing conditions. *Proteomics*, 5, pp: 3097-3104.
- Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H. (2003). *Advanced Dairy Chemistry. Vol. 2: Proteins*. Nueva York. Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Frémont, S., Kanny, G., Bieber, S., Nicolas, J.P. y Moneret-Vautrin, D.A. (1991). Identification of a masked allergen, α -lactalbumin, in baby-food cereal flour guaranteed free of cow's milk protein. *Allergy*, 51, pp: 749-754.
- García-Ara, M.C., Boyano, M.T., Díaz Pena, J.M., Martín Muñoz, F., Pascual, C., García Sánchez, G. y Martín Esteban, M. (2003). Incidencia de alergia a leche de vaca y su repercusión en el consumo de hidrolizados. *Anales de Pediatría*, 58, pp: 100-105.
- García-Ara, M.C., Boyano, M.T., Díaz Pena, J.M., Martín Muñoz, M.F. y Martín Esteban, M. (2004). Cow's milk-specific immunoglobulin E levels as predictors of clinical reactivity in the follow-up of the cow's milk allergy infants. *Clinical and Experimental Allergy*, 34, pp: 866-870.
- Gaudin, J.C., Rabesona, H., Choiset, Y., Yeretssian, G., Chobert, J.M., Sakanyan, V., Drouet Gern, J.E., Yang, E., Evrard, H.M. y Sampson, H.A. (1991). Allergic reactions to milk contaminated "nondairy" products. *The New England Journal of Medicine*, 324, pp: 976-979.
- Gern, J.E., Yang, E., Evrard, H.M. y Sampson, H.A. (1991). Allergic reactions to milk-contaminated "nondairy" products. *The New England Journal of Medicine*, 324 (14), pp: 976-979.
- Giovannacci, I., Guizard, C., Carlier, M., Duval, V., Martin, J.L. y Demeulemester, C. (2004). Species identification of meat products by ELISA. *The International Journal of Food Science & Technology*, 39, pp: 863-867.
- Harwanegg, C., Hutter, S. y Hiller, R. (2007). Allergen microarrays for the diagnosis of specific IgE against

- components of cow's milk and egg in a multiplex biochip-based immunoassay. *Methods in Molecular Biology*, 385, pp: 145-157.
- Hefle, S.L. y Lambrecht, D.M. (2004). Validated sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for casein and its application to retail and milk-allergic complaint foods. *Journal of Food Protection*, 67, pp: 1933-1938.
- Hohensinner, V., Maier, I. y Pittner, F. (2007). A 'gold cluster-linked immunosorbent assay': Optical near-field biosensor chip for the detection of allergenic β -lactoglobulin in processed milk matrices. *Journal of Biotechnology*, 130, pp: 385-388.
- Hsiao-Wei, W., Wlodzimierz, B.W., DeCory, T.R. y Durst, R.A. (2005). Development of a competitive liposome-based lateral flow assay for the rapid detection of the allergenic peanut protein Ara h1. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, pp: 1217-1216.
- Huber, C.G. y Premstaller, A. (1999). Evaluation of volatile eluents and electrolytes for high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry of proteins. I. Liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 849, pp: 161-173.
- Huppertz, T. y Kelly, A.L. (2009). Properties and constituents of cow's milk. En libro: A.Y. Tamime, Ed., *Milk Processing and Quality Management*. Nueva Delhi, India: Blackwell Publishing.
- Järvinen, K.M., Beyer, K., Vila, L., Chatchatee, P., Busse, P.J. y Sampson, H.A. (2002). B-cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110, pp: 293-297.
- Järvinen, K.M., Sicherer, S.H., Sampson, H.A. y Nowak-Wegrzyn, A. (2008). Use of multiple doses of epinephrine in food-induced anaphylaxis in children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122, pp: 133-138.
- Johansson, S.G., Hourihane, J.O. y Bousquet, J. (2001). A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*, 56, pp: 813-824.
- Johansson, S.G., Bieber, T. y Dahl, R. (2004). Revised nomenclature for allergy for global use: report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, 2003. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113, pp: 832-836.
- Juárez, M. (1985). Composición y factores de variabilidad de la leche. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 4, pp: 47-56.
- Kim, T.E., Park, S.W., Noh, G. y Lee, S. (2002). Comparison of skim prick test results between crude allergen extracts from foods and commercial allergen extracts in atopic dermatitis by double-blind placebo-controlled food challenge for milk, egg, and soybean. *Yonsei Medical Journal*, 43, pp: 613-620.
- Kohno, Y., Honma, K., Saito, K., Shimojo, N., Tsunoo, H., Kaminogawa, S. y Niimi, H. (1994). Preferential recognition of primary protein structures of alpha-casein by IgG and IgE antibodies of patients with milk allergy. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 73, pp: 419-422.
- Larramendi, C.H., Marco, F.M., García-Abujeta, J.L., Mateo, M., de la Vega, A. y Sempere, J.M. (2006). Acute allergic reaction to an iron compound in a milk-allergic patient. *Pediatric Allergy and Immunology*, 17, pp: 230-233.
- Maccougall, C.F., Cant, A.J. y Colver, A.F. (2002). How dangerous is food allergy in childhood? The incidence of severe and fatal allergic reactions across the UK and Ireland. *Archives of Disease in Childhood*, 86, pp: 236-239.
- Mäkinen-Kiljunen, S. y Palosuo, T. (1992). A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of bovine β -lactoglobulin in infant feeding formulas and in human milk. *Allergy*, 47, pp: 347-352.
- Malmheden-Yman, I., Eriksson, A., Johansson, M.A. y Hellenas, K.E. (2006). "Food Allergen Detection with Biosensor Immunoassay" *The Journal of AOAC International*, 89 (3), pp: 856-861.
- Martelli, A., De Chiara, A., Corvo, M., Restani, P. y Fiocchi, A. (2002). Beef allergy in children with cow's milk allergy; cow's milk allergy in children with beef allergy. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 89, pp: 38-43.
- Martin-Röder, S., Vieths, S. y Holzauser, T. (2009). Commercial lateral flow devices for rapid detection of peanut (*Arachis hypogaea*) and hazelnut (*Corylus avellana*) cross-contamination in the industrial production of cookies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, pp: 103-109.

- Martins, P., Borrego, L.M., Pires, G., Pinto, P.L., Afonso, A.R. y Rosado-Pinto, J. (2005). Sheep and goat's milk allergy-a case study. *Allergy*, 60, pp: 130-131.
- Matsuda, R., Yoshioka, Y., Akiyama, H., Aburatani, K., Watanabe, Y., Matsumoto, T., Morishita, N., Sato, H., Mishima, T., Gamo, R., Kihira, Y. y Maitani, T. (2007). Interlaboratory Evaluation of Two Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits for the Detection of Egg, Milk, Wheat, Buckwheat, and Peanut in Foods. *The Journal of AOAC International*, 89, pp: 856-861.
- Moen, L.H., Plassen, C., Miller, I., Gutleb, A.C. y Egaas, E. (2003). Rocket immunoelectrophoresis (RIE) as a tool to identify trace amounts of casein in food-an old method that out passes a modern commercial ELISA. XXII Congreso de la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica; Paris, June 7-11, 603.
- Monaci, L., Tregoa, V., Van Hengel, A.J. y Anklam, E. (2003). Milk allergens, their characteristics and their detection: A review. *European Food Research and Technology*, 223, pp: 149-179.
- Monaci, L. y Van Hengel, A.J. (2008). Development of a method for the quantification of whey allergen traces in mixed-fruit juices based on liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1192, pp: 113-120.
- Moneret-Vautrin, D.A. y Kanny, G. (2004). Update on threshold doses of food allergens: implications for patients and the food industry. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 4, pp: 215-219.
- Moreno-Bondi, M.C., Alaire, J.P. y Vo-Dinh, T. (2003). Multi-analyte analysis system using an antibody-based biochip. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375, pp: 120-124.
- Nowak-Wegrzyn, A., Conover-Walker, M. y Wood, R.A. (2001). Food-Allergic Reactions in Schools and Preschools. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 155, pp: 790-795.
- Paschke, A. y Besler, M. (2002). Stability of bovine allergen during food processing. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 89, pp: 16-20.
- Patrick, W., Hans, S. y Angelika, P. (2009). Determination of the bovine food allergen casein in white wines by quantitative indirect ELISA, SDS-PAGE, Western blot and immunostaining. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, pp: 8399-8405.
- Peláez Lorenzo, C., Díez-Masa, J.C., Vasallo, I. y de Frutos, M. (2010). Development of an optimized ELISA and a sample preparation method for the detection of beta-lactoglobulin traces in baby foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, pp: 1664-1671.
- Plath, A., Krause, I. y Einspanier, R. (1993). Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung*, 14, pp: 437-441.
- Poms, R.L. y Anklam, E. (2004). Polymerase Chain Reaction Techniques for Food Allergen Detection. *Journal of AOAC International*, 87, pp: 1391-1397.
- Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio, por el que se aprueba la Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. BOE 202 de 24 de agosto de 1999, pp: 31410-31418.
- Real Decreto 1245/2008, de 18 de julio, por el que se modifica la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios, aprobada por el Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio. BOE 184 de 31 de julio de 2008, pp: 32976-32978.
- Restani, P., Velonà, T., Plebani, A., Ugazio, A.G., Poiesi, C., Muraro, A. y Galli, C.L. (1995). Evaluation by SDS-PAGE and immunoblotting of residual antigenicity in hydrolysed protein formulas. *Clinical and Experimental Allergy*, 25, pp: 651-658.
- Roberts, G., Patel, N., Levi-Schaffer, F., Habibi, P. y Lack, G. (2003). Food allergy as a risk factor for life-threatening asthma in childhood: a case-controlled study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112, pp: 168-174.
- Rona, R.J., Keil, T., Summers, C., Gislason, D., Zuidmeer, L., Sodergren, E., Sigurdardottir, S.T., Lindner, T., Goldhahn, K., Dahlstrom, J., McBride, D. y Madsen, C. (2007). The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120, pp: 638-646.
- Roth-Walter, F., Berin, M.C., Arnaboldi, P., Escalante, C.R., Dahan, S., Rauch, J., Jensen-Jarolim, E. y Mayer, L.

- (2008). Pasteurization of milk proteins promotes allergic sensitization by enhancing uptake through Peyer's patches. *Allergy*, 63, pp: 882-890.
- Sampson, H.A. y Anderson, J.A. (2000). Summary and recommendations: Classification of gastrointestinal manifestations due to immunologic reactions to foods in infants and young children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 30, pp: 87-94.
- Sanz, J., Martorell, A., Michavila, A., Nieto, A. y Grupo de Trabajo para Alergia Alimentaria. (2001). Estudio de la incidencia mediada por IgE frente a la proteína de leche de vaca en el primer año de vida. *Anales de Pediatría*, 53, pp: 536-539.
- Sletten, G.B., Lovberg, K.E., Moen, L.H., Skarpeid, H.J. y Egaas, E. (2005). A comparison of time-resolved fluoroimmunoassay and ELISA in the detection of casein in foodstuffs. *Food and Agricultural Immunology*, 16, pp: 235-243.
- Talapatra, A., Rouse, R. y Hardiman, G. (2002). Protein microarrays: challenges and promises. *Pharmacogenomics*, 3, pp: 527-536.
- Teufel, M., Biedermann, T., Rapps, N., Hausteiner, C., Henningsen, P., Enck, P. y Zipfel, S. (2007). Psychological burden of food allergy. *World Journal of Gastroenterology*, 13, pp: 3456-3465.
- UE (2000). Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de marzo de 2000, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. DO L 109 de 6 de mayo de 2000, pp: 29-42.
- UE (2003). Directiva 2003/89/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 10 de noviembre de 2003, en lo que respecta a la indicación de los ingredientes presentes en los productos alimenticios. DO L 308 de 25 de noviembre de 2003, pp: 15-18.
- UE (2007). Directiva 2007/68/CE de la Comisión, de 27 de noviembre de 2007, que modifica el anexo III bis de la Directiva 2000/13/EC del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que se refiere a determinados ingredientes alimentarios. DO L 310 de 28 de noviembre de 2007, pp: 11-14.
- Vanto, T., Helpplä, S., Juntunen-Backman, K., Kalimo, K., Klemola, T., Korpela, R. y Koskinen, P. (2004). Prediction of the development of tolerance to milk in children with cow's milk hypersensitivity. *Journal of Pediatrics*, 144, pp: 218-222.
- Venien, A., Leveux, D., Astier, C., Briand, L., Chobert, J.M. y Haertle, T. (1997). Production and Epitopic Characterization of Monoclonal Antibodies Against Bovine β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 80, pp: 1977-1987.
- Wal, J.M. (1998). Cow's milk allergens. *Allergy*, 53, pp: 1013-1022.
- Wal, J.M. (2004). Bovine milk allergenicity. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 93, pp: 2-11.
- Walsh, B.J., Elliot, C., Baker, R.S., Barnett, D., Burley, R.W., Hil, D.J. y Howden, M.E. (1987). Allergenic cross-reactivity of egg-white and egg-yolk proteins. An in vitro study. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 84, pp: 228-232.
- Walstra, P., Wouters, J.T.M. y Geurts, T.J. (2006). *Dairy Science and Technology*, Part I, 2ª ed. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Warner, J.O. (2005). European Food Labelling Legislation. A nightmare for food manufacturers and allergy sufferers alike. *Pediatric Allergy and Immunology*, 16, pp: 1-2.
- Weber, D., Raymond, P., Ben-Rejeb, S. y Lau, B. (2006). Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method using capillary liquid chromatography and nanoelectrospray ionization-quadrupole time-of-flight hybrid mass spectrometer for the detection of milk allergens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, pp: 1604-1610.
- Ylitalo, L., Mäkinen-Kiljunen, S., Turjanmaa, K., Palosuo, T. y Reunala, T. (1999). Cow's milk casein, a hidden allergen in natural rubber latex gloves. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104, pp: 177-180.
- Zapatero, L., Alonso, E., Fuentes, V. y Martínez, M.I. (2008). Oral desensitization in children with cow's milk allergy. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 8, pp: 389-96.