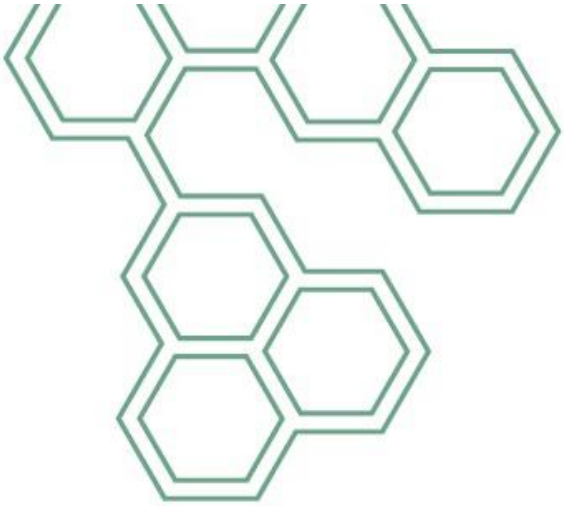
MANUAL DE ALÉRGENOS DE ALIMENTOS

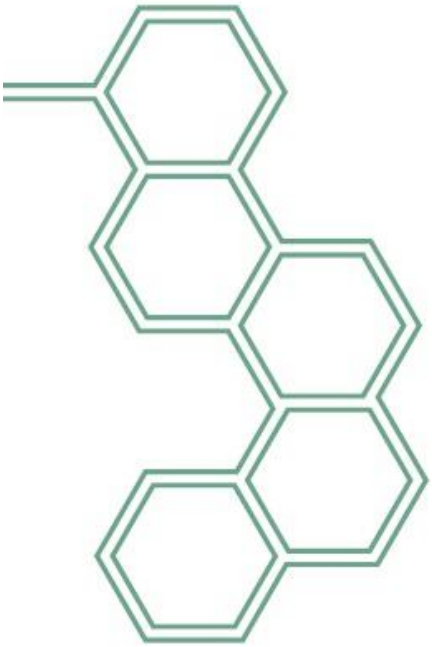
Guía de Pruebas de Alérgenos en Alimentos

NEOGEN®

NEOGEN **desarrolla y comercializa productos y servicios dedicados a la seguridad alimentaria y animal. NEOGEN Seguridad Alimentaria comercializa kits de pruebas de diagnóstico, medios de cultivo, y otros productos para detectar bacterias de origen alimentario, toxinas naturales, modificaciones genéticas, alérgenos en alimentos, residuos de fármacos, enfermedades de plantas, y asuntos de sanitización.**

El Programa de Investigación de Alergias Alimentarias y Recursos de la Universidad de Nebraska (FARRP, según sus siglas en inglés) **forma parte del Departamento de Ciencias y Tecnología de Alimentos. El FARRP constituye una sociedad entre la industria alimentaria y la universidad, formada para herramientas de investigación y recursos para la industria alimentaria en el área de alérgenos alimentarios. Este programa es líder en capacitación y educación de la industria alimentaria en cuestión de alérgenos. Para mayor información, favor de llamar al 402.472.4484.**





CONTENIDO

¿Qué es una Alergia Alimentaria? 07

¿Por qué probar alérgenos en alimentos? 08

Gluten 09

Alérgenos en Alimentos y la Ley 10

Contaminación Cruzada, Estudio de Casos 12

¿Cómo los Ensayos Rápidos Ayudan a Prevenir el Contacto Cruzado de Alérgenos? 13

Resultados de Detección vs Cuantificación 15

Cómo Funcionan los Ensayos de Alérgenos en Alimentos de Neogen® ? 16

Limitaciones de los Ensayos de Alérgenos en Alimentos Fundamentados en la Técnica ELISA 19

Muestreo de Ingredientes, Productos, Líquidos y Enjuagues 20

Muestreo y Extracción de Muestras Ambientales 22

Validación y Verificación de un Plan de Control de Alérgenos 23

Preguntas y Respuestas Referentes a las Pruebas de Alérgenos en Alimentos 25

Apéndice A: Conversión de Resultados a Proteína para las Pruebas Cuantitativas de Alérgenos en Alimentos 30

Ensayos de Alérgenos en Alimentos de NEOGEN 32

Documentos de Apoyo 33

¿QUÉ ES UNA ALERGIA ALIMENTARIA?

Más de 32 millones de personas (el 9% de la población) sólo en Estados Unidos, se sabe que padecen alguna alergia alimentaria, seis millones de los cuales son menores de 18 años. Aunque los investigadores han identificado más de 160 alimentos que contienen proteínas de origen natural que se ha demostrado causan reacciones alérgicas. Se estima que el 90% de las reacciones de alergia alimentaria son causadas por solamente ocho alimentos comunes (conocidos como los 8 Grandes): cacahuate, huevo, leche, soya, trigo, crustáceos, pescado y nueces de árbol (como nuez de castilla, avellanas, almendras, nuez de la india (o castaña de cajú), pistaches, nuez pecana, etc.).

Los alérgenos alimentarios son proteínas encontradas en algunos alimentos, que pueden inducir una respuesta inmunitaria en individuos alérgicos. La experiencia actual indica que se puede disparar una respuesta alérgica al comer alimentos que contienen cantidades diminutas de un alérgeno, en donde la cantidad específica necesaria para inducir la respuesta varía de un individuo a otro.

Una vez ingeridos, los alérgenos de alimentos pueden causar una variedad de síntomas, que van desde una leve urticaria, hasta graves síntomas gastrointestinales y respiratorios, que incluyen náusea, vómito, inflamación de la garganta, asma y dificultad respiratoria. La reacción alérgica alimentaria más grave es el choque anafiláctico, que es una reacción intensa de choque que puede incluir cualquiera de los síntomas ya mencionados y también una peligrosa caída de la tensión arterial y a veces arritmia cardiaca. El choque anafiláctico puede poner en peligro la vida si no se trata de inmediato.

Además, la proteína gluten encontrada en el trigo, centeno, cebada y especies relacionadas, se ha identificado como uno de los principales agentes causales de una variedad de trastornos. La enfermedad celiaca es el más notable de ellos. A diferencia de una alergia al trigo, que es una respuesta inmunitaria específica contra el gluten, la enfermedad celiaca es una reacción crónica a las proteínas del gluten que causa una deficiente absorción de nutrientes en el intestino delgado, debido a una constante respuesta inflamatoria.

¿POR QUÉ PROBAR ALÉRGENOS EN ALIMENTOS?

Las pruebas protegen al público: Los productores de alimentos protegen a aquellos que padecen alergias alimentarias al etiquetar claramente sus productos con una lista de ingredientes. Analizar la presencia de alérgenos de alimentos junto con un robusto programa de control de alérgenos, le asegura a los productores de alimentos que ningún ingrediente no etiquetado –y potencialmente peligroso– se ha colado a un producto alimenticio.

Las pruebas protegen la reputación de una empresa: Las pruebas proporcionan certeza de que los alérgenos presentes en las instalaciones de la empresa están siendo controlados según las expectativas y que se cumple con el Plan de Seguridad Alimentaria de la Compañía. Las pruebas en las soluciones de Limpieza en el Lugar (LEL), en producto final y en el equipo luego de haber concluido la limpieza, pueden identificar fuentes de contacto cruzado y verificar la limpieza antes de un cambio de turno o producto. Las pruebas ayudan a proteger contra los costos exorbitantes y daño a la reputación de las empresas, asociados con una recolección de producto mal etiquetado.

Las pruebas pueden simplificar el etiquetado del producto: Las pruebas pueden ayudar con el etiquetado precautorio. El Etiquetado Precautorio de Alérgenos es una advertencia común y voluntaria al consumidor, que se incluye después de la lista de ingredientes. Su propósito es indicar que un producto que no se tiene la intención que contenga uno o más alérgenos específicos, esporádicamente podría contener ese o esos alérgenos debido al contacto cruzado no intencional e inevitable. Por ejemplo, algunas empresas incluyen un consejo de prudencia tal como "puede contener cacahuate y productos de cacahuate" en los ingredientes de la etiqueta, incluso cuando hay una baja probabilidad de que el producto contenga cacahuate. Si realizan pruebas, en conjunto con una evaluación integral de riesgos, las empresas podrían ser capaces de minimizar el uso de consejos de prudencia.

Las pruebas mejoran la eficiencia: En empresas que utilizan un producto de empuje para limpiar el equipo entre un producto y otro, las pruebas pueden permitir que la compañía determine con exactitud cuánto producto de empuje es necesario para alcanzar el nivel de limpieza requerido para los alérgenos alimentarios. Las pruebas pueden eliminar el trabajo de prueba y error, y ahorrar producto que tendría que ir a la basura o ser reprocesado.

El análisis de una sola o una cantidad limitada de muestras, podría no ser suficiente para garantizar la seguridad del producto. Es importante garantizar que se ha establecido un riguroso plan de muestreo en las instalaciones antes de realizar cualquier prueba. Favor de referirse a la sección de muestreo en páginas posteriores de este manual, para obtener tips y sugerencias apropiadas sobre el muestreo.

GLUTEN

El gluten es un caso único debido a su complejidad epidemiológica adicional. El gluten no es la única proteína alergénica del trigo; sin embargo, como se describió anteriormente en este manual, el gluten es el agente causal de la enfermedad celiaca. El gluten consiste de dos clases de proteínas (prolaminas y gluteninas). La Gliadina es uno de los principales componentes de prolamina del gluten.

Otras prolaminas con estructura similar incluyen la secalina, encontrada en el centeno; y la hordeína, encontrada en la cebada. La mayoría de las pruebas de alérgenos del trigo, incluida la de NEOGEN®, están diseñadas para detectar estas prolaminas. Esta es la razón de por qué los fabricantes de kits de prueba de alérgenos a menudo comercializan sus kits de prueba de trigo como "gliadina" o "gluten". Como la gliadina representa aproximadamente el 50% del gluten, las pruebas que reportan sus resultados en ppm de gliadina, se pueden convertir a ppm de gluten al multiplicar por dos.

Las personas con alergia al trigo o enfermedad celiaca deben evitar el consumo de gluten y confían en el correcto etiquetado de los alimentos para realizar la elección apropiada y segura de sus alimentos. Además de las implicaciones del alérgeno del trigo, los procesadores de alimentos que voluntariamente etiquetan un producto como "libre de gluten" deberán asegurar que su producto cumpla con esa afirmación. El Codex Alimentarius en su Revisión del 2008, normaliza el valor a 20 ppm (10 ppm de gliadina). El 2013, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) estableció una reglamentación final que define el término "libre de gluten" para propósitos de etiquetado de alimentos. La regla define que el término "libre de gluten" significa que el alimento está inherentemente libre de gluten o que el contenido de gluten es menor de 20 ppm.

ALÉRGENOS DE ALIMENTOS Y LA LEY

Diferentes países han establecido distintas listas de alérgenos prioritarios con base en investigaciones globales y regionales. La FDA ha priorizado a los 8 Grandes como alérgenos de alta preocupación. Otras agencias reguladoras como Salud Canadá y el Consejo de Información Alimentaria (FIC) de la Unión Europea, incluyen diferentes alérgenos aparte de los 8 Grandes que se han identificado como prioritarios en sus jurisdicciones, tales como la mostaza y el ajonjolí.

En los Estados Unidos, la Ley de Etiquetado de Alérgenos Alimentarios y Protección al Consumidor (FALCPA) del 2004, exige el etiquetado de la fuente del alérgeno en términos simples en inglés, cuando el producto contenga algún alérgeno prioritario en su formulación. En otras palabras, los alérgenos de importancia deberán ser etiquetados de una manera clara y entendible (p.ej., etiquetar "leche" en vez de "caseína"). Para la mayoría de las compañías, la ley exige una encuesta de investigación completa de todos los ingredientes menores de sus productos, para determinar cuáles contienen alérgenos e implantar prácticas de segregación aceptables. A partir de Septiembre del 2009, el Congreso ordena que las empresas procesadoras de alimentos reporten cuando haya una probabilidad razonable de que el consumo o exposición a cualquier alimento o materia prima (diferente de los suplementos dietéticos y fórmulas infantiles) cause consecuencias adversas para la salud graves o la muerte. El reporte se deberá realizar dentro de un período de 24 horas luego del hallazgo. Los alérgenos alimentarios no documentados en un producto caerían dentro de esta clasificación y es probable que necesiten ser reportados a la FDA. Visite el sitio web FDA.gov/ReportableFoodRegistry para mayores detalles.

Como parte de la Ley de Modernización de la Seguridad Alimentaria (FSMA), las instalaciones procesadoras de alimentos nacionales y foráneas que sea requerido que se registren según la sección 415 de la Ley de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos, deberán cumplir con los requerimientos de controles preventivos basados en riesgos exigidos por la FSMA, así como con las Buenas Prácticas de Manufactura Actuales (CGMP) de esta regla.

Esta regla, que se tornó definitiva en Septiembre del 2015, exige que las instalaciones de procesamiento de alimentos cuenten con un plan de seguridad alimentaria que incluya análisis de riesgos, incluyendo alérgenos, y controles de prevención basados en riesgos, para minimizar o prevenir los riesgos identificados. Esta regla proporciona lineamientos para establecer los requerimientos de BPMA, y análisis de riesgos y controles de prevención basados en riesgos (HARPC) para alimentos de consumo humano.

Como parte de esta regulación se requiere del establecimiento de un plan de seguridad alimentaria documentado. Esto incluye análisis de riesgos, controles de prevención, monitoreo, acciones correctivas, y procedimientos de verificación y mantenimiento de registros. Las instalaciones que fabrican productos que contienen alérgenos deberán desarrollar un Plan de Control de Alérgenos (PCA) como parte de su Plan de Seguridad Alimentaria. Un PCA minimiza el riesgo de enviar al mercado productos mal etiquetados o con contaminación cruzada.

Aunque el uso de pruebas de alérgenos en alimentos no está específicamente abordado en la legislación, existen valiosas herramientas para evaluar y respaldar la efectividad del PCA. En una encuesta reciente de grandes procesadores de alimentos, el uso de pruebas de alérgenos en alimentos se ha tornado en un "estándar de cuidado" en la evaluación y validación de la limpieza.

Para mayor información sobre cómo implantar, validar y verificar un PCA, favor de contactar a su representante de NEOGEN® para obtener una copia del Manual de las Mejores Prácticas para la Validación y Verificación de Alérgenos en Alimentos.

CONTAMINACIÓN CRUZADA, ESTUDIO DE CASOS

A continuación se lista un par de ejemplos recientes de productos con contaminación inesperada por alérgenos. Estos ejemplos muestran la importancia de la implantación de controles estrictos para segregar los ingredientes alergénicos y contar con procedimientos en el lugar para minimizar el riesgo de contacto cruzado. Los Avisos al Consumidor de la FDA 2015-16 sobre comino contaminado con residuos de cacahuate, constituyen un ejemplo que demuestra que un producto que no se espera que contenga ciertos alérgenos, de hecho puede estar contaminado. Esto puede ser accidental (p.ej., el uso de equipo de cosecha compartido, contenedores de embarque o de almacenamiento) o puede ser una adulteración intencional.

En Noviembre de 2015, la FDA publicó un aviso al consumidor acerca de algunos productos alimenticios recolectados que contenían comino, que también contenían una proteína de cacahuate no declarada. Como parte de dicho aviso, la FDA recomendó enfáticamente que las personas que fueran altamente alérgicas al cacahuate, consideraran evitar el consumo de productos que tuvieran comino en polvo. En total, más de 500 productos individuales SKU que contenían la especia comino fueron recolectados del mercado. La causa de raíz todavía se desconoce, pero una posibilidad es la adulteración del comino en polvo, a causa de las altas concentraciones de proteína de cacahuate encontradas en el comino en polvo asociado con este problema.

En Junio del 2016, la FDA publicó un aviso al consumidor acerca de varios productos que contenían harina de trigo, que estaban contaminados con residuos de cacahuate. La FDA fue notificada primero por el fabricante en Abril, acerca de que el muestreo de un cliente encontró residuos de cacahuate en galletas. El subsiguiente análisis determinó que el harina de trigo de este proveedor en particular, era la fuente de los residuos de cacahuate. Se hicieron más de 13 recolecciones de productos del mercado que contenían harina de este proveedor.

UMBRALES EN ALIMENTOS

Aparte del gluten, no existen umbrales globalmente aceptados de cualquier otro de los principales alérgenos, que los productores tengan que cumplir con el fin de que su producto se considere libre del alérgeno. No obstante, existen algunas excepciones regionales; por ejemplo, Japón tiene un límite regulatorio de 10 ppm de proteína alérgica para propósitos de etiquetado.

Además el programa Etiquetado Voluntario de Alérgenos Traza Incidentales (VITAL, según sus siglas en inglés), que es un programa de evaluación voluntaria de riesgo de alérgenos para la industria alimentaria, ya publicó su tercera edición de dosis de referencia recomendadas para varios de los principales alérgenos. Debido a la falta de dosis de referencia globalmente reconocidas o armonizadas para la mayoría de los principales alérgenos, cada vez más empresas y agencias reguladoras están refiriéndose a VITAL 3.0 como guía para la evaluación de riesgos y para la toma de decisiones sobre el manejo de riesgos.

¿CÓMO LAS PRUEBAS RÁPIDAS AYUDAN A PREVENIR EL CONTACTO CRUZADO DE ALÉRGENOS?

Las pruebas de diagnóstico de alérgenos les proporcionan a las empresas un método para determinar con facilidad si su producto ha estado sujeto a contacto cruzado, y una herramienta de investigación para determinar cómo y cuándo ocurrió el contacto cruzado. Las compañías pueden usar las pruebas en materias primas antes que ingresen a producción, o en equipo o producto en cualquier punto del proceso de producción. La flexibilidad de las pruebas y la facilidad de uso, le permiten al usuario detectar y eliminar posibles riesgos de contacto cruzado.

Nota: como el efecto de matriz puede causar variación de los resultados, es imperativo que cualquier kit de prueba adquirido sea validado con un control positivo en sus instalaciones, para confirmar la compatibilidad de la prueba con el producto. Un control positivo es una muestra que contiene la fuente alergénica de interés, lo cual le permite al usuario determinar si la prueba es adecuada para sus propósitos (p.ej., si se observa un resultado positivo como se esperaba).

RESULTADOS DE DETECCIÓN vs CUANTIFICACIÓN

NEOGEN® es líder en pruebas de diagnóstico rápido de alérgenos en alimentos y es parte del programa de Solución Total de Alérgenos de NEOGEN, el cual combina las pruebas de detección rápida y cuantificación de alérgenos, pruebas de detección general de proteínas, y un excelente soporte técnico que incluye los servicios de pruebas por contrato con un laboratorio acreditado según la Norma ISO-17025 y experiencia práctica. Favor de contactar a su representante de NEOGEN para mayor información sobre nuestro portafolio de Soluciones Totales de Alérgenos.

Este manual se enfocará en pruebas de alérgenos. Las pruebas rápidas de alérgenos vienen en dos formatos, el de detección (cualitativa) y el cuantitativo, dependiendo de las necesidades de la empresa. Las pruebas de detección, tales como las líneas de productos Reveal® / Reveal 3-D de NEOGEN, están diseñadas para ser simples, fáciles de usar y rápidas para determinar la presencia o ausencia de un alérgeno dado. Las pruebas de cuantificación, tales como las líneas de productos Veratox® / BioKit de NEOGEN, utilizan la tecnología de ELISA para determinar la cantidad exacta en partes por millón (ppm) de un alérgeno dado. Al final de este manual podrá encontrar una tabla completa de productos que NEOGEN pone a su disposición.

ENSAYOS DE DETECCIÓN

Reveal 3-D: La línea de productos Reveal 3-D permite la detección rápida de la presencia de cantidades bajas de alérgeno en aguas de enjuague de Limpieza en el Lugar (LEL), hisopos ambientales, y productos alimenticios, sin equipo adicional. Las pruebas de alérgeno 3-D utilizan una innovadora lectura de tres líneas: una línea de control confirma que el método ha sido ejecutado con éxito, y otras dos líneas que diferencian entre una cantidad no detectable, una contaminación baja y una contaminación alta.

Reveal Multi-Treenut: Reveal Multi-Treenut está diseñado para detectar seis alérgenos de nueces de árbol (almendra, nuez de la india, avellana, nuez pecana, pistache y nuez (de castilla)) simultáneamente en hisopos ambientales y agua de enjuague de LEL. El dispositivo detecta niveles de 5-10 ppm con resultados en 10 minutos. Es ideal para una decisión rápida previa a las operaciones y requiere un mínimo tiempo-hombre y de equipo.

ENSAYOS CUANTITATIVOS

Veratox®/BioKit: Las líneas de productos Veratox y BioKit son pruebas de ELISA que determinan una cantidad exacta del alérgeno alimentario de interés, en un tiempo de aproximadamente 30 minutos (Veratox) a 90 minutos (BioKit) posteriores a la extracción. El mecanismo entre estos dos kits es un poco diferente, pero el procedimiento de prueba es muy similar.

¿CÓMO FUNCIONAN LOS ENSAYOS DE ALÉRGENOS EN ALIMENTOS DE NEOGEN?

Reveal® 3-D / Reveal® Multi-Treenut

El formato Reveal® 3-D de NEOGEN® para la detección de alérgenos en alimentos, es una prueba inmunocromatográfica de flujo lateral de un solo paso. El alérgeno alimentario de interés es extraído y diluido, y luego aplicado a la membrana del dispositivo, en donde se une con anticuerpos específicos contra ese alérgeno. La prueba arrojará los resultados en un formato de tres líneas, como se describe a continuación:

1. **Una línea de prueba: Confirma la presencia o ausencia del alérgeno de interés.**
2. **Una línea de sobrecarga: Esta innovadora característica desaparecerá en casos en los que se observa una gran contaminación, protegiendo contra resultados falsos negativos.**
3. **Una línea de control: Le asegura al usuario que la prueba funcionó apropiadamente.**

La prueba Reveal para Múltiples Nueces de Árbol (Multi-Treenut) de NEOGEN es similar a Reveal 3-D. Sin embargo, no cuenta con línea de sobrecarga. Esta prueba muestra los resultados en dos líneas, en donde la línea de prueba confirma un resultado positivo o negativo, y la línea de control asegura que la prueba funcionó apropiadamente.

Veratox® / BioKit

Las pruebas Veratox de NEOGEN son inmunoensayos de enzima ligada en emparedado (S-ELISA, según sus siglas en inglés). La línea BioKit de NEOGEN cuenta con pruebas de ELISA indirecta competitiva o pruebas de S-ELISA, dependiendo del alérgeno de interés. La proteína alergénica alimentaria de interés es extraída de las muestras y diluida en micropozos recubiertos con anticuerpo. Después de una serie de pasos, los pozos son analizados en un lector de micropozos, para determinar la cantidad extraída del alérgeno de interés, en ppm.

Para detalles adicionales sobre cómo funcionan los ensayos de flujo lateral y ensayos de ELISA de NEOGEN, favor de escanear los códigos QR de la siguiente página o busque los ensayos directamente en YouTube.

Cómo Funciona Reveal: youtube.com/watch?v=HkSXXUfDAkM

Alérgenos por ELISA en Emparedado: youtube.com/watch?v=UN7rM6Olipl&t=13s

La Ciencia Interior: Cómo Funciona Reveal®

La Ciencia Interior: ELISA en Emparedado del Alérgeno

LIMITACIONES DE LAS PRUEBAS BASADAS EN ELISA

Las pruebas de alérgenos en alimentos basadas en ELISA no son apropiadas para utilizarse en ciertas aplicaciones. Las pruebas se fundamentan en una reacción de un anticuerpo con una proteína alergénica extraída; la proteína en la muestra deberá estar casi en su estado natural y ser fácilmente extraíble. Aunque normalmente este es el caso, en ciertos casos la prueba podría no arrojar resultados totalmente indicativos del potencial de la muestra para producir una reacción alérgica en clientes susceptibles. Como se mencionó anteriormente, el efecto matriz puede causar que los resultados varíen y es imperativo probar un control positivo que contenga el alérgeno de interés para determinar si la prueba es adecuada para su propósito. El usuario no puede suponer que si una proteína es indetectable, no es alergénica. Algunos de estos casos incluyen (pero no se limitan a):

- **Proteínas hidrolizadas y proteolizadas (p.ej., HVP, proteína del huevo hidrolizada)**
- **Productos fermentados y cultivos (p.ej., gomas de guara, gomas de xantano y salsa de soya)**
- **Alimentos con altos niveles de taninos y/o fenólicos, tales como el chocolate, cacao y vino**
- **Cultivos probióticos**
- **Enzimas Proteasas**
- **Algunos aditivos, colorantes y saborizantes concentrados de alimentos**
- **Algunos ingredientes oleosos (p.ej., aceite, lecitina, saborizantes solubles en aceite, etc.)**
- **Alimentos que han sido sometidos a rigurosos métodos de procesamiento**

Asimismo, las pruebas de alérgenos en alimentos pueden reportar los resultados en ppm, con base en el alimento total o con base en la cantidad de proteína presente. El Apéndice A muestra un diagrama que ilustra cómo convertir de unos a otros, para los principales alérgenos.

Los kits de prueba de NEOGEN® por lo general reportan los resultados en el alimento total, pero por favor asegúrese de revisar el instructivo inserto del kit para mayores detalles, ya que los parámetros de reporte pueden variar.

MUESTREO DE INGREDIENTES, PRODUCTOS, LÍQUIDOS Y ENJUAGUES

La experiencia de NEOGEN® es que la mayoría de los errores asociados con las pruebas de alimentos pueden ser atribuidos a cómo se obtuvo la muestra original. Tomar medidas para asegurar que la muestra por ser analizada es representativa del producto, incrementará la confianza en los posteriores resultados de las pruebas. Para mayores detalles sobre las técnicas de muestreo apropiadas, favor de escanear el código QR en la siguiente página o ver directamente en YouTube.

INGREDIENTES Y PRODUCTO SECOS, MEZCLADOS O TERMINADOS

A continuación se presentan algunos lineamientos generales para el muestreo de ingredientes y producto. Favor de contactar a NEOGEN si tiene dudas acerca de la adaptabilidad de los lineamientos a las necesidades de pruebas específicas.

1. **Obtenga una muestra de 500 g del ingrediente o producto por ser probado y colóquela en un recipiente limpio.**
2. **Mezcle bien la muestra de 500 g con una espátula limpia o en una mezcladora (o licuadora) durante al menos 30 segundos.**
3. **Tome una submuestra de 50 g de la muestra de 500 g.**
4. **Si el producto tiene un tamaño de partícula grande, coloque los 50 g en una trituradora o molino y triture hasta obtener un tamaño de partícula muy fino.**
5. **Mezcle bien la submuestra con una espátula o en una mezcladora (licuadora) durante al menos 30 segundos.**
6. **De los 50 g, tome la cantidad apropiada de muestra para realizar la prueba con alguna de las pruebas de alérgenos en alimentos de NEOGEN.**
7. **Limpie bien la trituradora o licuadora y los utensilios entre una muestra y otra.**

LÍQUIDOS Y ENJUAGUES DE LEL

Para líquidos homogéneos no es necesario tomar una gran cantidad de muestra. Simplemente tome la muestra de producto o enjuague por ser analizada con alguna de las pruebas de alérgenos en alimentos de NEOGEN y agréguela a la solución de extracción.

NOTA: NEOGEN recomienda guardar por lo menos 10 mL del producto o enjuague para realizar pruebas confirmatorias en caso de detectar algún alérgeno alimentario.

Variabilidad de Muestreo: Cómo tomar muestras que arrojen los mejores resultados

MUESTREO Y EXTRACCIÓN AMBIENTAL

El muestreo ambiental para la detección de alérgenos en alimentos se debe realizar luego que el equipo haya sido lavado a conciencia y antes de iniciar la producción del siguiente lote. El muestreo ambiental requiere el uso de hisopos y una extracción especializada de los posibles alérgenos de los hisopos. Si no está utilizando un hisopo ambiental de NEOGEN, deberá probar los hisopos alternativos para asegurar que no hagan reacción cruzada con las pruebas de alérgenos en alimentos de NEOGEN. No use hisopos para muestreo microbiano que contengan medio de cultivo. No use esponjas.

Ya sea que use hisopos de NEOGEN o no, el muestreo deberá incluir áreas que se sabe son difíciles de limpiar en el ambiente que se va a probar. Esto puede incluir equipo y rincones y grietas de bandas transportadoras, superficies de trabajo desgastadas o cualquier área en donde la acumulación de residuos de alimentos constituya una preocupación. El frotamiento con el hisopo deberá abarcar un área de 10 x 10 cm, mediante un patrón de líneas cruzadas, tal como se muestra en el dibujo que se presenta a continuación. Los hisopos deberán ser humedecidos de acuerdo con el instructivo del kit para el muestreo de superficies secas. No prehumedezca los hisopos para muestrear superficies mojadas.

VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN

DE UN PCA

La definición de validación según el Codex Alimentarius "Lineamientos para la Validación de Medidas de Control de Seguridad Alimentaria" (2008) dice: "Obtener evidencia de que una medida de control o combinación de medidas de control, si son apropiadamente implementadas, son capaces de controlar el peligro hasta la obtención de un resultado especificado". En este caso, el proceso se refiere a la limpieza de las instalaciones después de una corrida de producción que contenga ingredientes alergénicos. La meta subyacente del proceso de limpieza en un ambiente de producción de alimentos, es la eliminación efectiva de todo material alergénico hasta alcanzar un nivel predeterminado seguro y satisfactorio. La validación es la comprobación de que la meta se puede alcanzar. Deberá fundamentarse en inferencias lógicas y resultados medibles, y dichos resultados deberán ser traducibles a normas (estándares) que se puedan utilizar para el monitoreo rutinario durante el ciclo normal de producción. La validación típicamente se emprende hasta que se alcanzan los resultados esperados y luego se repite de manera programada o cuando alguna condición usada para la validación haya cambiado (por ejemplo, modificaciones en la formulación del producto, cambios en el procesamiento, cambio o modificaciones del equipo, etc.).

La Verificación, tal como se define en el Codex Alimentarius, es la aplicación de métodos, procedimientos, pruebas, y otras evaluaciones, además del monitoreo, para determinar si una medida de control opera o ha estado operando de la manera pretendida. Esta actividad normalmente se realiza después de cada evento de limpieza y los resultados se comparan con los niveles de desempeño obtenidos durante el proceso de validación. Aunque se recomienda utilizar pruebas específicas de alérgenos durante el proceso, se pueden emplear pruebas rápidas de proteínas genéricas como parte del programa de verificación. Los resultados que caen fuera del estándar validado, indican que uno o más componentes del proceso de limpieza ha fallado. Todas las fallas deberán ser confirmadas mediante una prueba específica del alérgeno. El proceso de verificación de las instalaciones típicamente está incorporado en los Procedimientos Normalizados de Operación de Sanitación (PNOS; SSOPs según sus siglas en inglés). NEOGEN puede contribuir con la implementación, validación, verificación y mantenimiento del plan de control de alérgenos individual de sus instalaciones, mediante muestras Soluciones Totales de Alérgenos.

Para detalles adicionales del uso de los ensayos de NEOGEN para la validación y verificación de un PCA, favor de contactar a su representante de ventas de NEOGEN, para obtener una copia del cuaderno de trabajo de Las Mejores Prácticas para la Validación y Verificación de Alérgenos Alimentarios.

"Obtener evidencia de que una medida de control... es capaz de controlar el peligro" hasta llegar a un resultado especificado

Lineamientos de Validación de Medidas
de Control de Seguridad de Alimentos
Codex Alimentarius

P y R

PRUEBA DE ALÉRGENOS EN ALIMENTOS

¿Puedo probar un producto en las pruebas Reveal® 3-D?

Todas las pruebas Reveal® 3-D están validadas para usarse en hisopos ambientales y enjuagues. Sin embargo, varias pruebas han sido validadas para medir el contenido de alérgenos en productos e ingredientes alimentarios. Para mayores detalles, favor de contactar a su representante de NEOGEN.

¿Cuál es la diferencia entre "leche" y "leche total"?

"Leche" es un término general para un producto que puede o no incluir las dos proteínas principales de lácteos – proteína del suero de leche y caseína. Ya que tanto la caseína como la proteína del suero de leche pueden ser alergénicas, NEOGEN emplea el término "leche total" en su prueba, para indicar que se pueden detectar tanto caseína como proteína del suero de leche, mediante el uso de la misma prueba.

¿Puedo hacer más sensible mi prueba cuantitativa?

Los límites de detección de las pruebas cuantitativas de NEOGEN pueden ser ajustados cuidadosamente con base en los niveles más prácticos determinados por la indust4ria alimentaria, las autoridades reguladoras y consultores expertos. Los métodos se pueden ajustar para proporcionar sensibilidad adicional. No obstante, esto puede incrementar la posibilidad de respuestas falsas positivas debido a interferencias en la matriz. Favor de consultar a su representante de NEOGEN para mayores detalles.

¿La limpieza del laboratorio puede afectar los resultados de las muestras?

Las condiciones del laboratorio pueden afectar los resultados de las pruebas. Las pruebas de NEOGEN están diseñadas para realizarlas en el sitio; sin embargo, son extremadamente sensibles y pueden detectar de manera no intencional proteínas que pudieran existir en un ambiente de laboratorio. Por lo tanto, se recomienda ampliamente que las áreas de preparación y prueba de las muestras y todos los instrumentos, sean limpiados con regularidad. Además, el mantenimiento de condiciones constantes del laboratorio, incluyendo factores como la temperatura, dentro de una norma razonable, reducirá la potencial varianza de los resultados.

¿Cuánto tiempo se pueden almacenar los extractos e hisopos de las muestras antes de realizar las pruebas?

Los hisopos se pueden almacenar hasta por 24 horas a 4°C después de tomada la muestra, siempre y cuando todavía no hayan sido sometidos a extracción. Una vez sometidas a extracción, las muestras de los hisopos se tendrán que evaluar dentro de un período de cuatro horas. Todos los demás extractos de muestras se deberán probar dentro de un período de cuatro horas.

¿Cuáles son los mejores lugares para muestrear el ambiente con hisopos?

Para obtener los mejores resultados que reflejen las condiciones ambientales, se deben tomar muestras no sólo de las superficies de contacto con alimentos, sino que también de esquinas o rincones, áreas de trabajo desgastadas, cabezas de tornillos y otras áreas en donde haya una potencial acumulación de residuos de alimentos.

¿Cuándo se deben probar las soluciones de enjuague de LEL?

En algunos sistemas cerrados en donde no es posible el muestreo ambiental con hisopos, el agua del enjuague final de la LEL podría ser la única otra opción, que la prueba de producto, para verificar la limpieza de la sanitación.

¿Por qué la prueba de ATP no es efectiva para monitorear alérgenos en alimentos?

El ATP (trifosfato de adenosina) es una sustancia presente en toda materia orgánica, viva o muerta, y por lo tanto no es suficientemente específica para la verificación de alérgenos. Independientemente de cuán sensibles reclamen ser las pruebas de ATP, no hay ninguna manera de diferenciar el ATP proveniente de un alimento alergénico, de aquél encontrado en cualquier otra fuente de ATP. Asimismo, muchos alimentos alergénicos contienen cantidades muy bajas de ATP medible, lo cual causaría potenciales resultados falsos negativos, si se usa un método de ATP para probar un alérgeno en un alimento.

¿Cuáles son las limitaciones de la prueba de proteínas en general, en el monitoreo de alérgenos en alimentos?

Las pruebas de proteínas en general no tienen como objetivo proteínas alergénicas específicas y no son apropiadas para el desarrollo, implementación y validación de PCAs. Las empresas deben utilizar pruebas de alérgenos específicas para implementar y validar un PCA. Se recomienda el uso de pruebas de alérgenos para verificación siempre que sea posible, pero las pruebas de proteínas en general (tales

como AccuClean® Advanced de NEOGEN®), pueden constituir una herramienta efectiva como parte de la verificación de un PCA. Se pueden emplear para la verificación de puntos, para determinar que el PCA validado y los PNOS sigan siendo efectivos. Las pruebas de alérgenos se deben usar para confirmar cualquier resultado positivo de una prueba de proteínas. Además, cualquier cambio en el Plan de Control de Alérgenos en las instalaciones a causa de un producto o procesamiento diferente, deberá ser validado con el uso de pruebas de alérgenos.

¿El procesamiento con calor cómo afecta la recuperación de alérgenos alimentario en las pruebas de NEOGEN?

NEOGEN ha diseñado cuidadosamente sus pruebas para detectar proteínas alergénicas en una amplia variedad de productos alimentarios, tanto procesados como no procesados. En raras ocasiones podrían no ser detectables algunas proteínas altamente refinadas. Los expertos técnicos de NEOGEN pueden contribuir mediante la sugerencia de los productos que se ajusten mejor a sus instalaciones.

¿Cuál es la función del "aditivo" en el proceso de extracción?

Un aditivo de extracción tiene dos funciones simultáneas – mejora la solubilidad y estabilidad de la proteína alergénica y elimina interferencia de fondo causada por la matriz del alimento que está siendo probado.

¿Existen métodos analíticos confirmatorios para las pruebas de alérgenos?

En la actualidad no existen métodos confirmatorios aparte de la técnica de ELISA. Sin embargo, para confirmar los resultados de las pruebas hay numerosos laboratorios terceros que llevan a cabo métodos de ELISA cuantitativos. Aunque existen métodos instrumentales como PCR, y LC/MS/MS, éstos no están actualmente reconocidos más allá que para propósitos de investigación solamente.

¿Por qué las pruebas de Reveal® 3-D están ajustadas a 5 ppm?

Con excepción del gluten, las agencias reguladoras no han establecido umbrales reales para los alérgenos. La industria alimentaria ha aplicado un enfoque proactivo de autorregulación y ha elegido estas cantidades. Éstas son importantes para minimizar el riesgo al consumidor, sin tener que aplicar una "tolerancia cero" como umbral.

¿Qué significa el término "límite de detección"? ¿Es diferente del límite de cuantificación?

El Límite De Detección (LDD) se refiere a la concentración más baja en la que la prueba recoge una señal que puede ser diferenciada de un blanco y que no es causada por "ruido de fondo". Éste por lo general está por debajo de la curva estándar y no se considera un resultado válido. El LDD se determina como la media de diez evaluaciones de una muestra negativa conocida, más dos desviaciones estándar. Un Límite De Cuantificación (LDC) constituye el punto más bajo en el que el resultado es cuantificable mediante la prueba en una curva estándar. La mayoría de los productos cuantitativos lo identifican como el primer control no cero en esa prueba. Los resultados por debajo del LDC pero por arriba del LDD generalmente se consideran no cuantitativamente válidos, pero pueden tener validez desde un punto de vista cualitativo. Sin embargo, es crucial asegurar que los resultados positivos cualitativos aparentes no sean debidos a ruido de fondo proveniente de la matriz de la muestra que se está analizando.

¿Cuántas ppm se pueden detectar en un enjuague?

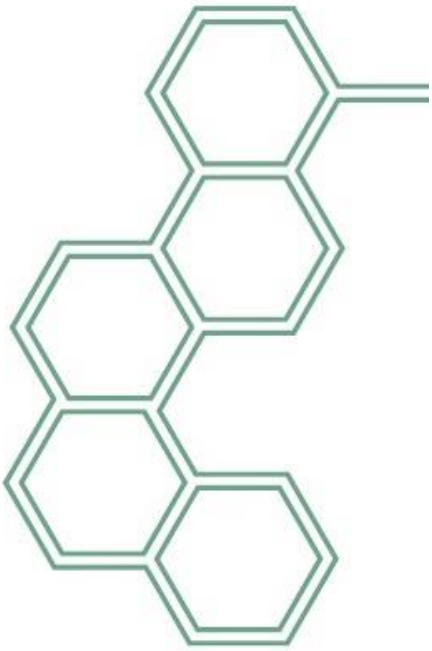
En general, la sensibilidad de las pruebas 3-D para enjuagues varía de 5 a 10 ppm; sin embargo, este valor puede fluctuar con base en el tipo y concentración de las sustancias químicas de limpieza y sanitizantes encontrados en el agua de enjuague. Se recomienda probar únicamente las aguas del enjuague final, ya que algunas sustancias químicas y sanitizantes pueden tener efecto sobre la prueba. Favor de referirse al reporte de validación de cada producto individual para mayor información.

¿Cuántas ppm se pueden detectar en un hisopo?

No es posible discutir la sensibilidad de un hisopo de superficie, ya que este tipo de análisis no tiene un tamaño de muestra definido. Por definición, las ppm son los mg de contaminante por kg de muestra. Debido a que el tamaño de muestra fluctúa ampliamente, dependiendo de la cantidad de material capturado en la superficie del hisopo, no se puede aplicar la definición de ppm. En vez de eso, es apropiado definir la sensibilidad en términos de µg de contaminante encontrados en una superficie de 100 cm^2 (se usó una superficie de 10 x 10 cm durante la validación). Dada esta definición, se pueden lograr de 5 a 20 µg de alérgeno por 100 cm^2; no obstante, esto puede variar dependiendo de la superficie y del tipo y concentración de las sustancias químicas o sanitizantes presentes en ella.

¿Cuántas ppm se pueden detectar en una muestra de alimento?

En general, la sensibilidad de las pruebas 3-D que tienen capacidad de analizar alimentos, varía entre 5 y 10 ppm. Sin embargo, esto puede fluctuar dependiendo de la matriz que se está probando. NEOGEN® alienta a las plantas de producción a validar su matriz con el respectivo kit 3-D necesario. Para mayor información, favor de referirse al reporte de validación de cada producto individual, o contacte a su representante de NEOGEN.



APÉNDICE A

RESULTADOS DE CONVERSIÓN A PROTEÍNA PARA LOS ENSAYOS DE ALÉRGENOS EN ALIMENTOS DE NEOGEN

Generalidades:

La sensibilidad de las pruebas de detección de alérgenos no es sólo función de la sensibilidad mencionada en la etiqueta del kit de prueba, sino que también se basa en la escala del sistema contra el que se está calibrando. Es vital que el usuario entienda qué representan en realidad los resultados de las pruebas de alérgenos, para garantizar que se alcanzó la sensibilidad deseada.

Varias escalas de contenido del alérgeno tienen sensibilidades equivalentes cuando se relacionan apropiadamente unas con otras. Quienes prefieren convertir sus resultados de ppm de alimento alergénico total a ppm de proteína alergénica, lo pueden hacer fundamentándose en el contenido de proteína promedio de estos alimentos, el cual está incluido en la tabla que se presenta a continuación. Recuerde – no todas las pruebas se crean igual. La escala es tan importante como los resultados en la determinación de residuos de alérgenos.

Tipo de Alimento	Contenido Promedio de Proteína*	LDC del kit Veratox® en Escala de ppm de Alimento Alergénico Total	LDC del kit Veratox en Escala de ppm de Proteína	Límite de Detección de Reveal® / Reveal® 3-D en Escala de ppm de Alimento Alergénico Total	Límite de Detección de Reveal® / Reveal® 3-D en Escala de ppm de Proteína
Almendra	21%	2.5 ppm de almendra	0.53 ppm de proteína	5 ppm de almendra	1.1 ppm de proteína
Caseína	36%	2.5 ppm de LDP	0.91 ppm de proteína	N/A	N/A
Nuez de la india	18%	N/A	N/A	5 ppm (múltiples nueces de árbol)	1 ppm de proteína
Crustáceos	20%	2.5 ppm de camarón	0.50 ppm de proteína	5 ppm de camarón	1 ppm de proteína
Huevo	48%	2.5 ppm de huevo	1.20 de proteína	5 ppm de huevo	2.4 ppm de proteína
Avellana	15%	2.5 ppm de avellana	0.37 de proteína	5 ppm de avellana	0.7 ppm de proteína
Leche	33%	2.5 ppm de LDP	0.91 de proteína	5 ppm de LDP	1.8 ppm de proteína
Mostaza	26%	2.5 ppm de mostaza	0.65 de proteína	5 ppm de mostaza	1.3 ppm de proteína
Cacahuate	26%	2.5 ppm de cacahuate	0.65 de proteína	5 ppm de cacahuate	1.3 ppm de proteína

LDP, leche descremada en polvo

Tipo de Alimento	Contenido Promedio de Proteína*	LDC del kit Veratox® en Escala de ppm de Alimento Alergénico Total	LDC del kit Veratox en Escala de ppm de Proteína	Límite de Detección de Reveal® / Reveal® 3-D en Escala de ppm de Alimento Alergénico Total	Límite de Detección de Reveal® / Reveal® 3-D en Escala de ppm de Proteína
Nuez pecana	11%	N/A	N/A	10 ppm (múltiples nueces de árbol)	1 ppm de proteína
Pistache	20%	N/A	N/A	10 ppm (múltiples nueces de árbol)	2 ppm de proteína
Ajonjolí	17%	2.5 ppm de ajonjolí	0.42 ppm de proteína	5 ppm de ajonjolí	0.8 ppm de proteína
Soya	51%	2.5 ppm de harina de soya	1.29 ppm de proteína	5 ppm de harina de soya	2.6 ppm de proteína
Nuez	15%	2.4 ppm (BioKit)	0.40 ppm de proteína	1 ppm (múltiples nueces de árbol)	0.2 ppm de proteína

*Contenido de proteína basado en la Base de Datos Nacional de Nutrientes del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Edición 28. Las variedades y cultivares pueden variar en el contenido de proteína. No se incluyen los ensayos que detectan coco y gliadina / gluten ya que, por su diseño, solamente reportan en escala de ppm de proteína.

¿CÓMO INTERPRETO LA LECHE TOTAL, COMO CASEÍNA O COMO SUERO DE LECHE?

Si desea realizar la conversión de leche total a caseína, recuerde que los kits de leche total de NEOGEN® se basan en una escala de Leche Descremada en Polvo (LDP). La LDP contiene 35% de proteína, 80% de la cual es caseína. Esto significa que 2.5 ppm de Alérgeno de Leche Total Veratox® equivale a 0.7 ppm de caseína. En el caso del suero de leche o β-lactoglobulina (BLG), el 20% de la proteína de la LDP es suero de leche. Esto significa que 2.5 ppm de leche total equivalen a 0.2 ppm de suero de leche.

Material Objetivo	Cantidad de LDP	% de Proteína	% del Material Objetivo	Resultado
LDP	2.5 ppm	N/A	N/A	2.5 ppm de LDP
Caseína	2.5 ppm	35%	80%	0.7 ppm de caseína
Suero de leche	2.5 ppm	35%	20%	0.2 ppm de suero de leche

¿POR QUÉ LA SOYA ES ÚNICA?

La soya puede ser procesada de varias maneras, cada una de las cuales afecta la funcionalidad y concentración de proteína. Se debe saber cómo convertir el material adulterante en concentración de proteína con exactitud. Generalmente se aplican los siguientes niveles de proteína:

- Harina de soya > 50% de proteína
- Concentrado de proteína de soya > 65% de proteína
- Proteína de soya aislada > 90% de proteína

APÉNDICE B

PRODUCTOS DE PRUEBA DE DIAGNÓSTICO DE ALÉRGENOS EN ALIMENTOS DE NEOGEN®

Ensayos Cualitativos (Detección)		Ensayos Cuantitativos	
Producto	**Artículo #**	**Producto**	**Artículo #**
Reveal® Multi-Treenut (para Múltiples Nueces de Árbol)	8555	BioKit para Ensayo de BLG	902061Y
Reveal 3-D para Almendra	902086G	BioKit para Ensayo de Nuez	902085J
Reveal 3-D para Coco	8565	Veratox® para Almendra	8440
Reveal 3-D para Crustáceos	902081S	Veratox® para Caseína	8460
Reveal 3-D para Huevo	8450	Veratox® para Crustáceos	8520
Reveal 3-D para Gluten	8505	Veratox® para Huevo	8450
Reveal 3-D para Avellana	902087E	Veratox® para Gliadina	8480
Reveal 3-D para Leche Total	8479	Veratox® para Gliadina R5	8510
Reveal 3-D para Mostaza	8405	Veratox® para Avellana	8420
Reveal 3-D para Cacahuate	901041L	Veratox® para Leche Total	8470
Reveal 3-D para Ajonjolí	8535	Veratox® para Mostaza	8400
Reveal 3-D para Soya	902093K	Veratox® para Cacahuate	8430
		Veratox® para Ajonjolí	8530
		Veratox® para Soya	8410

DOCUMENTOS DE APOYO

- **NEOGEN® Corporation,** 517.372.9200; NEOGEN.com
  Kits de Prueba, pruebas de laboratorio confidenciales de alérgenos .
- **FARRP,** 402.472.4484; www.farrp.org
  Consulta de alérgenos alimentarios, estrategias de control de alérgenos, pruebas de laboratorio confidenciales, videos de capacitación.
- **FDA,** fds.gov
- **Codex Alimentarius Normas Internacionales de Alimentos de la OMS-FAO,** fao.org/fao-who-codexalimentarius
- **Investigación y Educación sobre Alergias Alimentarias (FARE),** foodallergy.org
- **Asociación de Marcas de Consumo,** consumerbrandsassociation.org
- **Salud Canadá,** 613.957.2991; hc-sc.gc.ca
- **Asociación de Salsas y Guarniciones,** dressings-sauces.org
- **Instituto de Tecnólogos en Alimentos,** ift.org
- **Instituto Norteamericano de Horneado (AIB),** 800.633.5137; AIBonline.org
- **Oficina de Alérgenos del Programa VITAL,** allergenbureau.net/vital

© NEOGEN Corporation, 2020. NEOGEN, AccuClean, Reveal y Veratox son marcas registradas de NEOGEN Corporation.
Todas las demás marcas y nombres de producto son marcas o marcas registradas de sus respectivas empresas.