

Com s'ha d'abordar l'anàlisi d'al·lèrgens i la interpretació dels seus resultats?

RESUM: Aquest article recull principalment la presentació que amb el mateix títol es va realitzar a l'Institut Químic de Sarrià de Barcelona, en el marc del XI Food Studies: Focus on Food Allergens, el 22 de novembre de 2007. Es fa una revisió de les tècniques analítiques disponibles per a la detecció d'al·lèrgens i es discuteix la necessitat real i urgent d'homogeneïtzació de criteris, tècniques i estàndards.

SUMMARY: The present paper corresponds to the referenced title lecture given within the XI Food Studies: Focus on Food Allergens, November 22nd, 2007, at the Institut Químic de Sarrià in Barcelona. Available analytic techniques for allergen detection are reviewed and an actual and urgent need for homogenization of approaches, techniques and standards is discussed.

PARAULES CLAU: ingredients al·lèrgens, tècniques analítiques (mètode ELISA, mètode PCR), kits de selecció.

PER QUÈ ANALITZEM AL·LÈRGENS?

En els últims anys, s'ha detectat un augment progressiu de la incidència de les al·lèrgies a productes i ingredients alimentaris. Dades recents apunten que prop d'un 2 % dels adults i entre un 6 % i un 8 % de la població infantil pateix alguna al·lèrgia alimentària. Però la reacció al·lèrgica de cada individu és extremament variable, podent anar des de símptomes lleus i que pràcticament passen desapercebuts fins a possibles xocs anafilàctics de greus conseqüències. Així, doncs, és molt difícil establir uns patrons de conducta al respecte, així com realitzar treballs de diagnòsi i investigació. És per això que la principal eina de la qual es disposa per evitar situacions de risc és

la informació: cada vegada es fa més evident la necessitat per part d'aquests individus afectats de conèixer la realitat dels aliments que consumeixen i, d'aquesta manera, evitar la seva exposició a proteïnes al·lèrgiques de manera inadvertida.

Des de l'any 2003,¹ la Unió Europea va imposar la necessitat d'indicar en l'etiquetatge dels productes la possible presència dels ingredients al·lèrgens següents o dels seus derivats:

- a) cereals que continguin gluten,
- b) fruits de closca,
- c) crustacis,
- d) api,

1. Directiva 2003/89, traslladada al nostre país pel Reial decret 2220/2004 i modificada posteriorment per la Directiva 2006/142.

Kits ELISA: el gran avantatge d'aquest mètode analític és la seva capacitat de detectar directament la proteïna al·lèrgènica

- e) ous,
- f) mostassa,
- g) peix,
- h) sèsam,
- i) cacauets,
- j) anhídrid sulfurós i sulfits,
- k) soja,
- l) tramussos,
- m) llet i derivats (inclosa la lactosa),
- n) mol·luscs.

Si no s'implanten i validen els sistemes de control adequats, existeix la possibilitat de contaminació amb ingredients al·lèrgènics no desitjats en algun moment de la llarga cadena productiva. En efecte, hem de tenir present el recorregut que realitzen els ingredients alimentaris fins que els ingerim:

a) Recollida i transport de matèries primeres en un món globalitzat en el qual pot ser habitual traslladar en un mateix mitjà de transport ingredients al·lèrgènics i d'altres que no ho són.

b) Emmagatzematge i fabricació en indústries de transformació que no sempre tenen o no sempre poden tenir línies dedicades exclusivament a la fabricació de productes sense risc al·lèrgic.

c) Neteja de línies.

d) Utilització d'ingredients, additius o aromes que contenen l'al·lèrgen de manera inadvertida.

Per aquestes raons, en els últims anys, l'anàlisi i la detecció d'al·lèrgens en aliments ha experimentat

un fort desenvolupament, amb l'aparició al mercat de nous sistemes de detecció i ampliant la seva aplicabilitat a noves matrius i nous ingredients.

COM ELS ANALITZEM?

Existeixen en l'actualitat nombrosos sistemes de detecció en funció de l'al·lèrgen o matriu a analitzar. Els mètodes més habituals serien:

a) Mètodes de tipus ELISA, que detecten una proteïna o fragment proteic.

b) Mètodes de PCR, que detecten la presència d'ADN que pot produir les proteïnes al·lèrgèniques.

c) Mètodes químics específics per a la lactosa (cromatografia o mètode enzimàtic) i per als sulfits (destil·lació i valoració).

Tanmateix, podem citar altres tècniques més específiques i de menor aplicació avui dia, però que poden ser habituals per a determinades combinacions anàlit-matriu:

a) Immunoassaig de flux lateral (tests qualitius de presència/absència), força utilitzat en el cas del gluten.

b) PCR-ELISA, una combinació de les tècniques citades anteriorment.

c) Western-blot i altres tècniques d'electroforesi.

d) Biosensors o «xips», una tècnica força recent i encara en desenvolupament.

Ens centrarem a continuació en les dues tècniques més utilitzades, descrivint-ne les característiques principals:

a) **Kits ELISA:** el gran avantatge d'aquest mètode analític és la seva capacitat de detectar directament la proteïna al·lèrgènica. Es tracta d'una tècnica senzilla, fàcilment implantable en un laboratori, ràpida i que, a més, permet quantificar la presència de la proteïna al producte analitzat. Molt breument, el seu funcionament podria resumir-se de la manera següent:

1) Extracció de la fracció proteica.

2) Contacte i reacció específica de la proteïna (antigen) amb un anticòs marcat enzimàticament.

3) Detecció del compost antigen-anticòs mitjançant reacció colorimètrica.

4) Quantificació respecte el senyal d'un estàndard.

Però el gran problema que planteja aquesta tècnica és que no existeixen criteris uniformes pel que fa als seus paràmetres de funcionament entre els diferents productes disponibles al mercat, podent portar de vegades a interpretacions confuses dels seus resultats, tal com es descriurà més endavant. D'altra banda, els kits ELISA no estan disponibles per a tots els al·lèrgens, atès que, per al seu desenvolupament, és necessari disposar d'antígens i anticòs molt específics de les proteïnes a detectar, cosa que no sempre és possible. Com ja hem indicat al principi, la investigació en el camp de les reaccions al·lèrgiques és complexa i difícil, i no sempre es coneixen les proteïnes responsables de la reacció.

b) **PCR (Polymerase Chain Reaction):** a diferència de la tècnica anterior, detecta un fragment de l'ADN. En ser aquest més resistent tèrmicament que les proteïnes, permet detectar la presència de substàncies al·lèrgiques fins i tot si les proteïnes han quedat desnaturalitzades. A més, és aplicable a un gran nombre de matrius i d'al·lèrgens.

El PCR (Polymerase Chain Reaction) detecta un fragment de l'ADN

Esquemàticament, el protocol de treball seria:

- 1) Extracció i purificació.
- 2) Multiplicació d'una part (sequència) de l'ADN mitjançant PCR.
- 3) Marcatge del fragment amplificat amb un compost fluorescent que permet la seva detecció.

Els principals inconvenients d'aquesta tècnica són el seu preu, la seva complexitat instrumental i la seva incapacitat per quantificar de manera absoluta l'anàlit detectat al producte analitzat. Els resultats solen expressar-se com a còpies de l'ADN detectat i amplificat, i no hi ha correlació directa entre aquesta dada i els mil·ligrams d'al·lergen per quilo de producte analitzat. D'altra banda, la presència d'ADN d'una varietat al·lèrgica no implica necessàriament que la o les proteïnes causants de les reaccions al·lèrgiques hagin de ser codificades i puguin, en conseqüència, provocar els problemes.

Però, independentment del mètode escollit, a l'hora de dur a terme una anàlisi d'al·lèrgens, és singularment important disposar d'un protocol de mostreig adequat i representatiu, en funció del tipus de mostra que ens disposem a analitzar:

a) En matèria primera: la mostra ha de ser representativa del lot rebut. És habitual analitzar lots importants formats per nombrosos envasos, per la qual cosa s'haurà de garantir que la mostra presa no vingui únicament d'una secció parcial del lot.

b) En producte acabat: en una indústria que produeixi, en una ma-

A l'hora de dur a terme una anàlisi d'al·lèrgens, és singularment important disposar d'un protocol de mostreig adequat i representatiu

teixa línia, productes amb i sense al·lèrgens, sempre s'hauran d'analitzar les primeres unitats del producte sense al·lergen fabricades després de la producció amb al·lergen, perquè seran les unitats amb més risc de contaminació.

c) En aigües de rentat o desinfecció: sempre s'hauran d'analitzar les últimes abans d'iniciar la producció per tal de garantir que no queda rastre de producte conflictiu abans de començar a produir.

d) En superfícies: és igualment aconsellable controlar les superfícies de treball, podent prendre una mostra mitjançant tampons.

QUÈ ÉS EL QUE MASUREM?

Uns dels principals reptes a resoldre en el futur, esperem que immediat, és la interpretació i l'homogeneïtzació dels resultats analítics obtinguts mitjançant l'ús de la tècnica ELISA, la més utilitzada actualment.

A tall d'exemple i endinsant-nos una mica més en la qüestió analítica, es recullen a les taules 1 i 2 les dades de tres fabricants diferents de

kits ELISA per a la detecció i la quantificació de presència de cacauet i llet en aliments, respectivament.

Podem observar clarament l'absoluta heterogeneïtat dels principals paràmetres de l'assaig, això és, la molècula detectada (anticòs), l'expressió de resultats (estàndard) i les quantitats mínimes quantificables (LOQ).

Per exemple, a la taula 1 (*kits de detecció de cacauet*), els fabricants B i C no analitzen la mateixa proteïna, amb la qual cosa els resultats no seran comparables. En aquest cas concret, les dues proteïnes citades no tenen el mateix comportament pel que fa a la seva resistència al tractament tèrmic, i la seva anàlisi en producte acabat pot portar a resultats molt dispars, si bé ambdós assaigs tracten de detectar presència de cacauet en productes alimentaris.

A més, l'expressió de resultats és variable en funció del fabricant. Així, es pot veure que el fabricant A utilitza un límit expressat en mil·ligrams de cacauet i el C, en mil·ligrams de proteïna de cacauet, per no parlar del B, que utilitza com a re-

TAULA 1. Comparativa de kits de detecció de cacauet

	Fabricant A	Fabricant B	Fabricant C
Anticòs	Policlonal específic de proteïnes de cacauet (incloses Ara h1, Ara h2)	Policlonal específic de Conarachina (Ara h1)	Específic d'Ara h2
Estàndard	Extracte de cacauet en solució aquosa	Conarachina purificada	Proteïna de cacauet
LOQ	2,5 mg/kg de cacauet	1 mg/kg de NIST SRM2387 mantega de cacauet	1 mg/kg de proteïna de cacauet

TAULA 2. Comparativa de kits de detecció de llet

	Fabricant A		Fabricant B	Fabricant C
Anticòs	Caseïna bovina	B-lactoglobulina	B-lactoglobulina	? (B-L + CAS ?)
Estàndard	Llet en pols	B-lactoglobulina desnatada	B-lactoglobulina en solució	Llet en pols desnatada en solució
LOQ	1 mg/kg de llet en pols	0,1 mg/kg de b-lactoglobulina (segons matriu)	0,2 - 5 mg/kg de b-lactoglobulina	2,5 mg/kg de llet en pols desnatada

ferència un producte acabat, com ara una mantega de cacauet. Utilitzar, doncs, la frase «El mètode ha de detectar menys d'1 ppm (mg/kg)» és, en aquest cas, clarament insuficient, atès que s'hauria d'especificar «1 ppm (mg/kg) de què?».

En el cas de la llet i els seus al·lèrgens, la situació és més complexa, ja que ens trobem davant de dos tipus de fraccions proteïques al·lèrgèniques, les lactoglobulines i les caseïnes, i també de la lactosa, que està igualment inclosa entre les substàncies a declarar en l'etiquetatge dels productes. La primera pregunta ha de ser: què volem analitzar? Caseïna, lactoglobulina o lactosa? Les dues primeres sí poden detectar-se i quantificar-se mitjançant la tècnica ELISA, però no la tercera, per a la qual haurem d'optar per un mètode cromatogràfic o enzimàtic.

Respecte a les dades recollides a la taula 2, hi detectem des de falta d'informació de la o les proteïnes detectades (fabricant C) fins a l'existència, en el cas del fabricant A,

d'un *kit* per a cada al·lèrgen i l'expressió de resultats, en un cas en mg/kg del mateix al·lèrgen i en l'altre en mg/kg de llet en pols.

És, doncs, necessari disposar en tot moment de la informació clara i concisa del que s'està analitzant, ja que, si no, podem arribar a situacions incongruents en les quals s'estiguin comparant resultats que formalment tenen el mateix objectiu analític, però els anàlisis dels quals (molècules detectades) siguin diferents.

En contraposició amb aquesta situació, podem destacar el cas de l'anàlisi de gluten (al·lèrgen del blat). Per la incidència de la malaltia celíaca, és potser l'al·lèrgen que s'analitza de manera més habitual des de fa més temps, i això fa que, almenys a Espanya, existeixi un «consens» sobre l'anticòs i l'estàndard a utilitzar. Es tracta de l'anticòs R5, desenvolupat i patentat pel doctor Méndez de la Unitat de Gluten del Centro Superior de Investigaciones Científicas, i de l'estàndard certificat del Prolamin

Working Group. Aquest mètode analític, a més, ha estat adoptat, després de llargs anys de discussions, per la Comissió de Mètodes del Codex Alimentari, donant-se per primera vegada «oficialitat» a un mètode de detecció d'al·lèrgens. I, tanmateix, l'anticòs R5 també té els seus detractors, i als Estats Units o en alguns països del nord d'Europa no gaudeix del reconeixement unànime de la comunitat científica.

CONCLUSIONS

Les tècniques analítiques per a la detecció d'al·lèrgens es troben en ple desenvolupament, però existeix una necessitat real i urgent d'homogeneïtzació de criteris, tècniques i estàndards. Es tracta d'una tasca àrdua i difícil, atesa la gran variabilitat amb què les al·lèrgies afecten a la població. I des del punt de vista dels assaigs analítics que trobem al mercat, també és evident que una unificació de paràmetres pot arribar a ser difícilment compatible amb el desenvolupament de noves tècniques o nous anticòsos en l'àmbit industrial per part de les empreses fabricants.

Tota aquesta situació porta a la necessitat de disposar sempre de personal expert i de l'assessorament de tècnics especialistes per poder planificar amb eficàcia, eficiència i rigor els controls que han de permetre controlar la presència d'al·lèrgens en productes alimentaris i facilitar així, als individus afectats, un major control de la seva alimentació i, en definitiva, una major seguretat alimentària.

Les tècniques analítiques per a la detecció d'al·lèrgens es troben en ple desenvolupament, però existeix una necessitat real i urgent d'homogeneïtzació de criteris, tècniques i estàndards