



## **ANEXO 13**

---

# MÉTODOS DE VALIDACIÓN PARA LIMPIEZAS ALERGÉNICAS

# ANEXO 13 | MÉTODOS DE VALIDACIÓN PARA LIMPIEZAS ALERGÉNICAS

## MÉTODOS DIRECTOS:

Basados en la detección de proteínas o de fragmentos de proteínas alergénicas.

### 1. Técnicas inmunológicas:

Utilizan anticuerpos dirigidos contra las principales proteínas alergénicas, por ejemplo:

Aplicación	Ventajas	Desventajas
<b>Inmunoblotting o Western Blott</b> Detección y cuantificación de proteínas alergénicas agregadas intencionalmente a la formulación de un alimento Puede utilizarse como método confirmatorio frente a un SDS-PAGE que se sospecha falso negativo	Mayor sensibilidad que SDS-PAGE, por tratarse de un inmunoensayo Dada su alta sensibilidad, en algunos casos puede usarse como método confirmatorio de un resultado positivo de ELISA	Requiere que previamente se realice la extracción y separación de las proteínas por SDS-PAGE Requiere un analista capacitado y con experiencia
<b>Inmunocromatografía de Flujo Lateral LFD</b> Método para validar procesos de Sanitización y Limpieza Método cualitativo ó semicuantitativo No requiere equipamiento Lectura visual Control de sanitización Control de superficies y de ambiente Se pueden guardar como documento	Económicos Simples de fácil manejo No requieren equipamiento No requieren personal altamente especializado	Cualitativo o semicuantitativo Efecto Hook (falsos negativos)
<b>ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)</b> Para validar materias primas y productos terminados Método cuantitativo Tipo sandwich o competitivo: dependiendo del tipo de antígeno a analizar Análisis de Materias primas Análisis de Productos terminados Hay que conocer la especificidad de los anticuerpos utilizados Validar los ensayos para cada matriz: muestras procesadas pueden tener alterado el alérgeno: hidrólisis, alteración de estructuras secundarias y terciarias	Cuantitativos Ensayos muy validados Alta especificidad y sensibilidad Rápidos No muy costosos No requiere personal altamente. Especializado	Puede ser necesario más de un kit por alérgeno (productos altamente procesados) Un sólo alérgeno por largada Necesidad de larga curva de calibración en cada ensayo
<b>Microarrays y Biosensores</b> Método cuantitativo Todavía en desarrollo Análisis de Materias primas Análisis de Productos terminados		

Tabla 1. Técnicas inmunológicas

### 2. Técnicas no inmunológicas:

Aplicación	Ventajas	Desventajas
<b>Cromatografía líquida – Espectrometría de masas en tándem LC-MS/MS</b> Para validar materias primas y productos terminados Detectan fragmentos polipeptídicos pertenecientes a las proteínas alergénicas Equipamiento costoso Método cualitativo No hay estándares certificados - no puede compararse con otras metodologías No está validado para diferentes matrices	Método de referencia – Gold Standard EuroPrevall-MoniQa-iFAAM Muy sensibles Varios alérgenos por largada	Equipamiento muy costoso Requiere personal altamente capacitado Cualitativo (salvo por secuenciación de los fragmentos) No hay estándares No es práctico para análisis rutinario

Tabla 2. Técnicas no inmunológicas

## MÉTODOS INDIRECTOS:

Basados en el reconocimiento específico de fragmentos de ADN que codifican una determinada proteína.

Aplicación		Ventajas	Desventajas
PCR Tradicional o en Tiempo Real (RT PCR)	<p>Para validar materias primas y productos terminados</p> <p>Basados en el reconocimiento específico de fragmentos de ADN que codifican una determinada proteína: PCR Tradicional, RT-PCR Detecta DNA y no proteínas Puede ser cualitativo o cuantitativo</p>	<p>Cuantitativos o cualitativos</p> <p>Alta sensibilidad y especificidad</p> <p>Se utilizan como métodos confirmatorios</p>	<p>Equipos más costosos</p> <p>Personal más calificado</p> <p>Se detecta ADN y no proteínas</p> <p>Difícil correlación con concentración de proteínas alergénicas</p> <p>Sensible a los bajos pH</p>

Tabla 3. Métodos indirectos

## MÉTODOS NO ESPECÍFICOS:

Método utilizado para detectar ATP de fuentes biológicas para comprobar la efectividad de la sanitización de manera rápida y económica, realizada “in-situ”, sin embargo, detecta todas las proteínas no sólo las alérgicas.

Aplicación		Ventajas	Desventajas
PCR Tradicional o en Tiempo Real (RT PCR)	<p>Para validar materias primas y productos terminados</p> <p>Basados en el reconocimiento específico de fragmentos de ADN que codifican una determinada proteína: PCR Tradicional, RT-PCR Detecta DNA y no proteínas Puede ser cualitativo o cuantitativo</p>	<p>Cuantitativos o cualitativos</p> <p>Alta sensibilidad y especificidad</p> <p>Se utilizan como métodos confirmatorios</p>	<p>Equipos más costosos</p> <p>Personal más calificado</p> <p>Se detecta ADN y no proteínas</p> <p>Difícil correlación con concentración de proteínas alergénicas</p> <p>Sensible a los bajos pH</p>

Tabla 4. Métodos no específicos