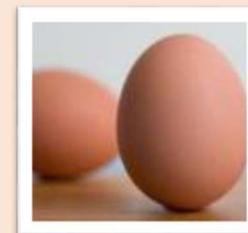


Celebración del Día Mundial de la Metrología Mediciones para dar soporte al sistema alimentario mundial

El desafío de las mediciones de alérgenos en alimentos



Prof. Dra. LAURA B. LOPEZ
Cátedra de Bromatología
Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA



e-mail: laulop@ffyb.uba.ar

**DECLARACIÓN DE ALERGENOS EN EL
ROTULADO DE LOS ALIMENTOS
INCORPORADO AL CAPÍTULO V DEL CAA (Art. 235
séptimo).
VIGENTE DESDE 2018.**

1- Los alérgenos y sustancias capaces de producir reacciones adversas en individuos susceptibles indicados en el presente artículo deberán ser declarados a continuación de la lista de ingredientes del rótulo, siempre que ellos o sus derivados estén presentes en los productos alimenticios envasados listos para ofrecerlos a los consumidores, ya sean añadidos como ingredientes o como parte de otros ingredientes:

1.1- Trigo, centeno, cebada, avena, o sus cepas híbridas, y productos derivados, excepto:

- a) jarabes de glucosa a base de trigo, incluida la dextrosa;
- b) maltodextrinas a base de trigo;
- c) jarabes de glucosa a base de cebada;
- d) cereales utilizados para hacer destilados alcohólicos, incluido el alcohol etílico de origen agrícola.



1.2- Crustáceos y productos derivados;



1.3- Huevos y productos derivados;



1.4- Pescado y productos derivados, excepto:

- a) gelatina de pescado utilizada como soporte de vitaminas o preparados de carotenoides;
- b) gelatina de pescado o ictiocola utilizada como clarificante en la cerveza y el vino.



1.5- Maní, y productos derivados;



1.6- Soja, y productos derivados, excepto:

- a) aceite y grasa de semilla de soja totalmente refinados;
- b) tocoferoles naturales mezclados (INS 306), d-alfa tocoferol natural, acetato de d-alfa tocoferol natural y succinato de d-alfa tocoferol natural derivados de la soja;
- c) fitosteroles y ésteres de fitosterol derivados de aceites vegetales de soja;
- d) ésteres de fitostanol derivados de fitosteroles de aceite de semilla de soja.



1.7 - Leche y productos lácteos, excepto:

- a) lactosuero utilizado para hacer destilados alcohólicos, incluido el alcohol etílico de origen agrícola;
- b) lactitol.



1.8 - Frutas secas (indicando la/s que corresponda/n de acuerdo al Artículo 894 del presente Código*) y productos derivados, excepto: las frutas secas utilizadas para hacer destilados o alcohol etílico de origen agrícola para bebidas alcohólicas.

*Almendra; Avellana; Castaña; Castaña de Cajú; Castaña o Nuez de Pará o nuez de Brasil o Bacurí; Nuez; Pecán; Pistacho.



1.9 - Dióxido de azufre y sulfitos presentes en concentraciones iguales o mayores a 10 ppm.

2- Se deberá declarar de la siguiente forma, completando el espacio en blanco con el nombre de la/s sustancia/según corresponda de acuerdo al listado precedente:

'**Contiene...**', ó

'**Contiene derivado/s de...**', ó

'**Contiene... y derivado/s de...**'.

Cuando una sustancia listada en el punto 1- no forme parte de los ingredientes del alimento pero exista la posibilidad de contaminación accidental durante el proceso de elaboración, aun habiendo aplicado las BPM, deberá constar en el rótulo la frase de advertencia:

'**Puede contener...**', ó

'**Puede contener derivado/s de...**', ó

'**Puede contener... y derivado/s de...**'.

En todos los casos completando el espacio en blanco con el nombre de la/s sustancia/s, según corresponda de acuerdo al listado del punto 1-, a continuación de la frase 'Contiene...', 'Contiene derivado/s de...', o 'Contiene...y derivado/s de...' si corresponde.

Para autorizar el uso de la frase de advertencia la empresa deberá presentar ante la Autoridad Sanitaria una nota con carácter de declaración jurada que consigne la siguiente frase 'que aun habiendo aplicado las BPM, existe la posibilidad de contaminación accidental durante el proceso de elaboración debido a...',completando con la correspondiente justificación que demuestre tal condición, quedando a criterio de la Autoridad Sanitaria la aprobación de uso de la frase de advertencia de conformidad con el párrafo anterior.

3 - Presentación de la información:

Las declaraciones exigidas en el punto 2 deben estar **agrupadas inmediatamente después o debajo de la lista de ingredientes** y con **caracteres legibles** que cumplan con los siguientes requisitos de declaración:

3.1 **Mayúscula**

3.2. **Negrita**

3.3. **Color contrastante con el fondo del rótulo**

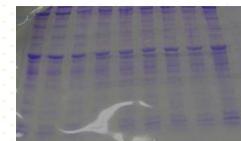
3.4. **Altura mínima de 2 mm y nunca inferior a la altura de la letra utilizada en la lista de ingredientes.**

4 - **Las declaraciones no pueden estar ubicadas en lugares cubiertos, removibles por la apertura del lacre o de difícil visualización, como áreas de sellado y de torsión.**

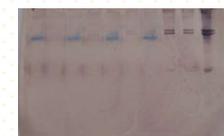
5 - **En el caso de envases con un área visible para el rotulado igual o inferior a 100 cm², la altura mínima de los caracteres es de 1 mm.**

La metodología utilizada internacionalmente para la detección de alérgenos en alimentos comprende:

* SDS-PAGE / inmunoblotting



** Métodos ELISA sándwich y ELISA



competitivo con anticuerpos poli o monoclonales



** Inmunocromatografía



** Real time PCR.



* Espectrometría de masa ** DISPONIBLES COMERCIALMENTE

Para que se utilizan los métodos de análisis de alérgenos

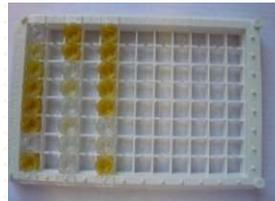
- Evaluar la eficacia de un plan de control de alérgenos
 - Control de las materias primas en la industria
 - Control de producto final (cumplimiento del etiquetado)
 - Investigar en caso de queja de consumidores
 - Realizar validación de limpieza
 - Realizar controles por Autoridad sanitaria
-

Detecta proteínas.

Técnica versátil: se pueden combinar diferentes tipos de anticuerpos (Ac) con distintas especificidades, distintos tipos de ensayos, competitivos o sandwich, diferentes buffers de ensayo, diferentes buffers de extracción*

* Buffers de extracción: algunos contienen agentes desnaturizantes y reductores que permiten solubilizar agregados de proteínas. En principio son incompatibles con el ensayo (afectan a los Ac y a la unión Ag-Ac) pero se los utiliza muy diluidos y no afectan la performance del ensayo.

****Métodos ELISA sándwich y ELISA competitivo con anticuerpos poli o monoclonales**



Técnica Cuantitativa:
Cuantificación de concentraciones sugeridas como seguras (los límites de cuantificación de los kits están por debajo de los umbrales clínicos)

Como ensayo biológico es sensible a modificaciones en la estructura del alérgeno.

Ac policlonales permiten un cierto grado de modificación de los alérgenos en comparación con Ac monoclonales

Puede conducir a falsos positivos no deseados por reacción cruzada de los Ac con proteínas no target o por uniones inespecíficas con otros componentes del alimento.

Este ensayo no determina el estado alérgico y la biodisponibilidad de los alérgenos en las muestras, las cuales tienen implicancias clínicas desconocidas.

Sirve para ingredientes no procesados y para algunas matrices específicas con ingredientes procesados.

Existen equipos automatizados que generan un alto rendimiento para análisis de rutina con una gran cantidad de muestras.

****Métodos ELISA sándwich y ELISA competitivo con anticuerpos poli o monoclonales**

Pueden ser cuantitativos pero los resultados varían entre los ensayos comerciales. Esto se debe a falta de estandarización que incluye especificidad de Ac, material de calibración, solución de extracción de las muestras y unidades en que se expresan los resultados.



1 KIT 1 alérgeno - No permite el análisis de varios alérgenos simultáneamente
1 KIT (48 pocillos): 14 - 19 muestras
Requiere de habilidad

Ejemplos de problemas para la detección con métodos de ELISA

- *Muestras altamente hidrolizadas o fermentadas

- *Aceites o derivados

 - Lecitinas, tocoferoles, fitoesteroles

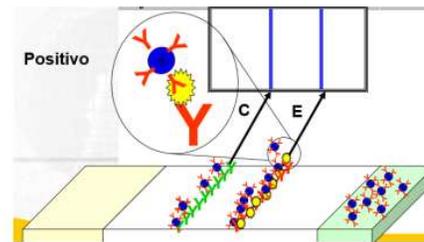
- * Productos altamente procesados (calor/presión)

- *Aderezos (pH muy ácido)

**Correr Control + para determinar
utilidad del ELISA**

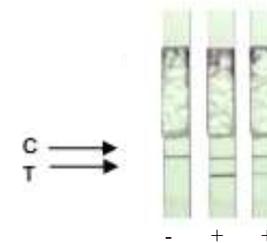


La muestra fluye por capilaridad a lo largo de una membrana, para llegar a una línea en la que el anticuerpo específico se ha adsorbido. Allí ocurre la reacción, dando lugar a un complejo coloreado antígeno anticuerpo. En la línea control (C) se encuentran anticuerpos no específicos que reconocen el reactivo de detección.



****Inmuncromatografía de flujo lateral- LFD**

Son rápidos, portátiles, fáciles de utilizar. Muchas veces asociados a hisopados. Se utilizan principalmente para verificación de métodos de limpieza.



- Método cualitativo o semicuantitativo
- No requiere de equipamiento
- Lectura visual
- Control de superficies y ambientes
- Se puede guardar como documento

1 muestra por análisis por tira
No requiere habilidad

Detección directa del alérgeno sin necesidad de recurrir a un intermediario (anticuerpos en el ELISA).

Detección no ambigua del alérgeno (se evitan falsos positivos por reactividad cruzada).

Amplio rango de posibilidades de extracción con respecto a ELISA, incluyendo aquellas que podrían afectar la unión antígeno anticuerpo.

Sensibilidad similar a ELISA (ppm)

Permite cuantificar

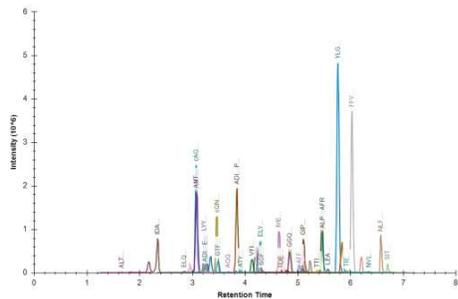


Figure 3. Chromatogram of a mixture of milk, eggs, cod, shrimp, lobster, almonds, brazil nuts, cashew nuts, hazelnuts, walnuts, peanuts, wheat, and soybeans.

Digestión enzimática en varios péptidos.
Selección cuidadosa de los péptidos de interés, usados como "huella dactilar" (fingerprint) del alérgeno → presencia inequívoca del alérgeno en la muestra.

Selección de péptidos basada en su abundancia y estabilidad en alimentos procesados.

La detección de alérgenos no se ve afectada por modificaciones en la estructura.

Espectrometría de masa

Gran potencial para screening multialérgico.

Es un análisis confirmativo robusto ante un tribunal

Equipamiento muy costoso.

La puesta a punto del método y el análisis requiere de personal altamente calificados.

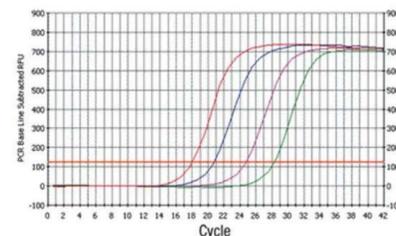
Hay ensayos cualitativos
y cuantitativos

La aplicación de esta técnica para la detección de alérgenos es controvertida ya que no detecta los alérgenos alimentarios en sí mismos y la concentración de ADN puede no correlacionarse con la presencia de proteínas alergénicas o con su concentración.

Tecnologías basadas en ADN- RT-PCR

Son mas fáciles de desarrollar: todos los componentes necesarios están disponibles comercialmente y no necesitan insumos animales ni mantenimiento de líneas celulares.

Sin embargo requieren infraestructura de laboratorio, como salas especialmente dedicadas y esto no resulta práctico para las industrias o para laboratorios estándar de análisis de alimentos.



ADN y las proteínas presentan diferentes propiedades de estabilidad en diferentes procedimientos de procesado de alimentos.

Puede haber productos formulados con fracciones proteicas que pueden contener una cantidad reducida de ADN.

Detección de huevo y leche por PCR no es considerada una opción: la abundancia de ADN en estos dos productos es muy baja, esto perjudica la sensibilidad del ensayo.

Además ADN no es tejido específico: PCR puede ser positivo para leche debido a la presencia de carne vacuna en productos.

Aceites, almidones, lisozima: sin ADN.

TEST RAPIDOS DE DETECCIÓN DE PROTEÍNAS Y DE ATP

- No fueron diseñados para detectar alérgenos
- Son útiles para verificación de limpieza en superficies
- Generalmente asociados a hisopados
- Rápidos y económicos

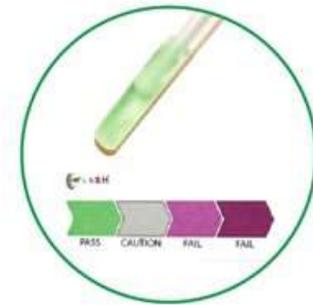
PROTEÍNAS

Generalmente basados en

- reacción de Biuret
- BCA (ácido bicinronínico)

- Detecta proteínas independientemente de la fuente

El resultado de Proteínas NO REFLEJA NIVEL DE ALERGENOS.



TEST RAPIDOS DE DETECCION DE PROTEINAS Y DE ATP

ENSAYOS DE BIOLUMINISCENCIA / ATP-AMP

- No es específico para alérgenos
 - El nivel de ATP varía entre alimentos
 - No prueba presencia de proteínas
- 
- El resultado de ATP NO REFLEJA NIVEL DE ALÉRGENOS.

EN RESUMEN:

• Los inmunoensayos (test ELISA y test rápidos de tira): Son test sencillos y de fácil aplicación en la industria porque la cualificación técnica necesaria es reducida y no necesitan un equipamiento costoso. Su gran ventaja es que son directos y específicos. Están basados en la detección de la proteína alergénica mediante anticuerpos específicos. Son los más recomendables para la industria y laboratorios de análisis siempre que exista un kit estandarizado.

• Las técnicas moleculares (RT-PCR): Son test más complejos, que implican mayor cualificación y un equipamiento más costoso. Son ensayos específicos pero indirectos. Detectan la presencia de ADN, no de proteínas. Son adecuados en los casos en los que no se dispone de test inmunoquímicos comerciales o cuando la muestra sufre tratamientos térmicos severos.

• Las técnicas de cromatografía asociada a masa (LC-MS): Es una metodología que implica un instrumental con un costo muy elevado, personal especializado y experiencia. Son específicas y directas. Están basadas en la detección específica de péptidos de la proteína alergénica mediante análisis de las masas. Son muy adecuadas como métodos de confirmación y para la normalización de métodos de referencia.

**TEST DISPONIBLES
COMERCIALMENTE EN
ARGENTINA PARA ALERGENOS
ALIMENTARIOS**

Alérgenos	ELISA	DNA (PCR)	Tiras inmunocromatográficas
Trigo	SI	SI	SI
Centeno	SI	SI	SI
Cebada	SI	SI	SI
Avena	SI	SI	SI
Crustáceos	SI	SI	SI
Huevo	SI	NO	SI
Pescados	SI	SI	SI
Maní	SI	SI	SI
Soja	SI	SI	SI
Leche	SI	NO	SI
Almendra	SI	SI	SI
Avellana	SI	SI	SI
Nueces de cajú	SI	SI	SI
Pecán	SI	SI	SI
Castañas de Para/ Nueces de Brasil	SI	SI	SI
Nueces de Macadamia/ Nueces de Australia	SI	SI	SI
Nueces	SI	SI	SI
Pistachos	SI	SI	SI
Apio	SI	SI	SI
Mostaza	SI	SI	SI
Semillas de sésamo	SI	SI	SI
Lupines	SI	SI	SI
Dióxido de azufre y sulfitos*	NO	NO	NO

*Se mide usando método de destilación y titulación como el Monier-Williams u otros métodos.

ALGUNAS CONSIDERACIONES EN LOS ANALISIS CON KITS DE ELISA

Desempeño de los kits comerciales de ELISA

Los **resultados** obtenidos con los diferentes kits comerciales para una misma muestra, **no se pueden comparar**.

Según distintos investigadores existen **diversas variables** que llevan a obtener resultados diferentes entre los distintos kits comerciales:

- * productos utilizados en la curva estándar varían entre kits (por ejemplo leche en polvo o proteína de leche purificada),
- * diferentes soluciones de extracción utilizadas que hacen que la eficiencia de extracción sea distinta entre los diferentes kits (por ejemplo: buffer fosfato, agregado de mercaptoetanol),
- * unidades informadas (ppm leche en polvo y ppm proteína de leche),
- * especificidad del o de los anticuerpos,
- * habilidad del anticuerpo a unirse a proteínas según el procesamiento que ha sufrido el alimento.

Los **resultados cuantitativos** obtenidos se deben considerar solo como **orientativos** y no como valores absolutos ya que difieren de los valores reales.



Conclusiones obtenidas a partir del análisis de sistemas modelo



El análisis de los diferentes resultados permite concluir que el método a utilizar para la detección de los diferentes alérgenos en los alimentos, depende

del alérgeno que se quiere detectar y/o cuantificar, de la matriz del alimento que contiene al alérgeno y del tratamiento que haya sufrido el alimento.

Por lo tanto para cada alérgeno y para cada matriz en particular resulta necesario realizar un estudio de las diferentes metodologías disponibles para establecer los alcances de cada una de ellas y determinar cuáles son las que resultan más adecuadas en cada caso en particular.



Como actuar en el laboratorio Nuevo kit comercial de ELISA/ nueva matriz

Demostrar la utilidad del método

Solicitar al proveedor del kit la información sobre la utilidad del método para el propósito buscado.

Si no hay bibliografía se debe validar el método en el laboratorio:

- Analizar un control negativo (matriz sin analito) para asegurar que no haya resultados falsos positivos, debería dar por debajo del LC del kit.
 - Analizar un control positivo (material de referencia/material de control de calidad o matriz con agregado de cantidad conocida de analito) para asegurar que el método detecta el analito.
 - Si es cuantitativo, evaluar recuperación del método en estudio, utilizar material de referencia/material de control de calidad y si no existe utilizar matriz con agregado de cantidad conocida de analito. Recuperación esperada: 70 - 130 %.
- Si es necesario, puede solicitar ayuda para diseñar un plan de validación del método.

Además resulta necesario:

Realizar la curva por duplicado y verificar que cumpla las exigencias establecidas para la curva estándar (proveedor del kit).

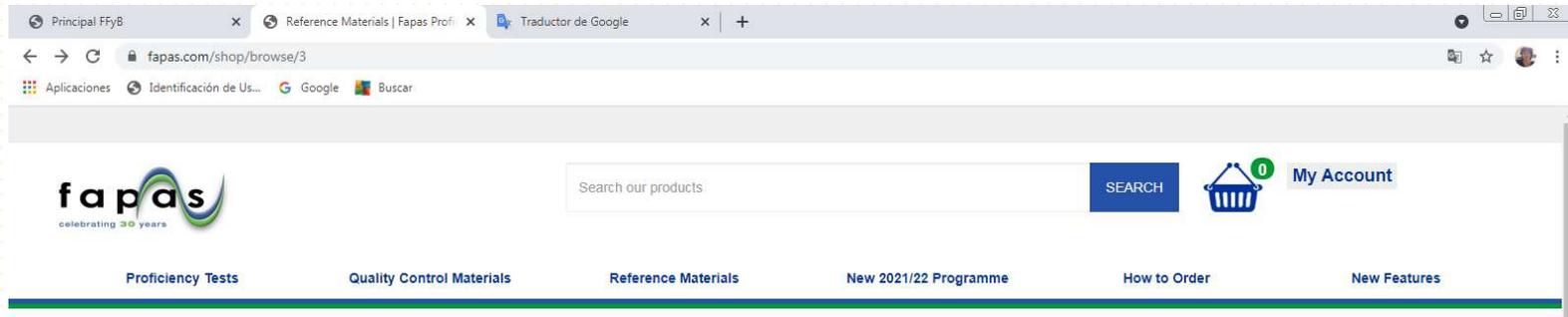
Informar correctamente el resultado:

- < LC del kit
- resultado obtenido en el rango de la curva de calibración
- > al valor mas alto de la curva de calibración.

El resultado se expresa en las unidades establecidas en el protocolo del kit, por ej; ppm leche en polvo descremada, ppm betalactoglobulina, ppm caseína, ppb inhibidor de tripsina de soja, ppm proteína de soja, etc. etc.

Utilizar el software o planilla de cálculo provista por el proveedor del kit.

Materiales de control de calidad/ materiales de referencia disponibles para determinación de alérgenos



<https://fapas.com/shop/search?producttypes=1>

Las **pruebas de aptitud** de Fapas proporcionan una evaluación independiente del desempeño del laboratorio y comparan sus resultados con los de los laboratorios de todo el mundo.

Material de control de calidad: Los materiales de prueba excedentes del lote utilizado para la prueba de aptitud pueden estar disponibles como muestras de control de calidad (QC). Estas muestras de QC se pueden utilizar para solucionar problemas de rendimiento deficiente en la PA, capacitar al personal nuevo, desarrollar métodos o generar gráficos de CC.

Material de referencia: tienen un grado de caracterización mucho más alto que los materiales de PA o QC con una cadena definida de trazabilidad. Los RM se someten a pruebas formales de estabilidad para aplicaciones tanto a corto como a largo plazo. Los RM tienen una hoja de datos asociada que enumera los valores de referencia y su incertidumbre expandida U. Los RM tienen un mayor grado de confianza en sus valores y pueden usarse para fines de calibración de métodos.

Proficiency Tests

Quality Control Materials

Reference Materials

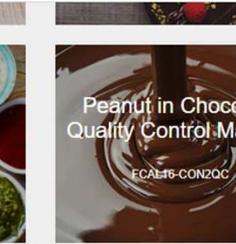
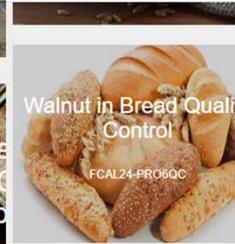
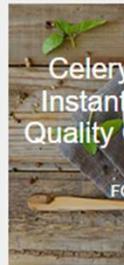
New 20

Quality Control Material > Allergens

Choose your Quality control material



Choose your Matrix:



Note:
Fees (prices) on this site are in GBP



Search our products **SEARCH**



[My Account](#)

[Proficiency Tests](#)

[Quality Control Materials](#)

[Reference Materials](#)

[New 2023/24 Programme](#)

[How to Order](#)

[New Features](#)

[Reference Material](#) > [Allergens](#)

[Grid](#) [List](#)

Choose your Reference material

Filter by Matrix

- Meat & Fish
- Fruit & Vegetables
- Processed foods, Confectionery & Condiments
- Water & Environmental
- Drinks
- Dairy & Infant Food
- Nuts, Cereals, Oils & Fats
- Packaging & Migration
- Non-food Matrix
- Animal and Pet Food

Choose your Matrix:

Histamine in Canned Fish Reference Material (High Levels)
£270.00
FCAL10-SEA7RM

Egg, Gluten & Milk in Cake Mix Reference Material
£420.00
FCAL7-PRO10RM

Hazelnut & Peanut in Cooked Biscuit Reference Material
£270.00
FCAL9-PRO14RM



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

Fapas® QC MATERIAL DATA SHEET	T27275AQC
Matrix	Cake Mix
Weight / Volume of Contents	30g

Analyte	Qualitative Results
Egg	DETECTED (98% consensus)
Gluten	DETECTED (97% consensus)
Milk	DETECTED (98% consensus)

Quantitative Results				
Analyte	Assigned Value, x_a	Range for $ z \leq 2$	Units	No. of data points producing x_a
Neogen Veratox for Gliadin R5 (8510)	17.0	8.5 - 25.4	mg/kg	18
NH Foods Ltd FASTKIT ELISA Ver.III Wheat	11.3	5.7 - 17.0	mg/kg	6
R-Biopharm RIDASCREEN Fast Egg (R6402)	14.0	6.99 - 21.0	mg/kg	25
R-Biopharm RIDASCREEN Gliadin (R7001)	14.9	7.5 - 22.4	mg/kg	94
R-Biopharm RIDASCREEN Fast Gliadin (R7002)	14.4	7.2 - 21.6	mg/kg	10
Romer Labs AgraQuant ELISA Gluten G12 (COKAL0200)	17.0	8.5 - 25.5	mg/kg	9
SENSISpec Ingezim Gluten R5 (30.GLU.K.2)	15.1	7.6 - 22.7	mg/kg	6
Morinaga Egg (Ovalbumin) ELISA Kit II (M2111)	7.10	3.55 - 10.65	mg/kg	8
Neogen Veratox for Egg Allergen (8450)	20.5	10.3 - 30.8	mg/kg	12
NH Foods Ltd FASTKIT ELISA Ver.III Egg	8.10	4.05 - 12.14	mg/kg	6
R-Biopharm RIDASCREEN Egg (R6411)	14.2	7.1 - 21.3	mg/kg	21
Romer Labs AgraQuant Egg White (COKAL0848)	3.80	1.90 - 5.70	mg/kg	7
ELISA Systems Beta Lactoglobulin (ESMRDLG-48)	2.92	1.46 - 4.38	mg/kg	8
Neogen Veratox for Total Milk Allergen (8470)	59.5	29.7 - 89.2	mg/kg	18



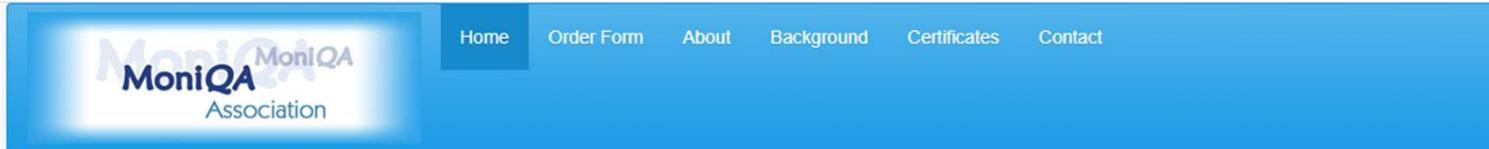
Fera Science Ltd. (Fera)
Sand Hutton, York, UK, YO41 1LZ
Tel: +44 (0)1904 462100 Fax: +44 (0)1904 500440
info@fapas.com www.fapas.com

NH Foods Ltd FASTKIT ELISA Ver.III Milk	38.2	19.1 - 57.3	mg/kg	6
R-Biopharm RIDASCREEN Fast β -Lactoglobulin (R4912)	3.06	1.53 - 4.59	mg/kg	19
R-Biopharm RIDASCREEN Fast Casein (R4612)	20.7	10.4 - 31.1	mg/kg	21
R-Biopharm RIDASCREEN Fast Milk (R4652)	48.1	24.1 - 72.2	mg/kg	30
Romer Labs AgraQuant Milk (COKAL2448)	21.1	10.5 - 31.6	mg/kg	13

This data sheet is applicable until	08 Oct 2023
Recommended Storage on receipt	Ambient

Notes
<ul style="list-style-type: none"> Mix the QC material thoroughly before taking a representative analytical sample. The assigned value has been derived from the consensus of laboratories taking part in the accompanying proficiency test, using a specific kit type. This is not a certified reference value. Results for each analyte were separated into individual kit types and assessed separately. The Range for $z \leq 2$ is the concentration range within the limits of ± 2 z-scores. The assigned value and its range have been established from the proficiency test data and are suitable for use by laboratories as a fit-for-purpose quality control measure. Stability of the QC material has been established as sufficient for the scope of the proficiency test from previous experience, expert advice and published literature. Fapas® advises that the QC material is analysed within the recommended date. Fapas® QC materials are intended to be used as single-analysis samples. Full details on the proficiency test procedure used to characterise this QC material are available in the Protocol, Part 1 - Common Principles, freely available to download from the Fapas® website.

MATERIAL DE REFERENCIA



Welcome to the MoniQA webshop!

The first validated Reference Materials for Food Allergen Analysis are now available and can be ordered from MoniQA Association. The first set of materials includes testing materials for milk allergen analysis comprising a **Positive Control** (SMP-MQA 092014, characterized dried skim milk powder, validated protein content), **Negative Control** (BLANK-MQA 082015, based on a gluten free cookie), and **2 Incurred Materials**: LOW-MQA 102016 (SMP incurred in gluten free cookies, milled, concentration approx. 3.54 mg/kg milk protein, validated) and HIGH-MQA 082016 (SMP incurred in gluten free cookies, milled, concentration approx. 17.7 mg/kg milk protein, validated).

<https://www.moniqa.org/>

Product Information Sheet

Art. No.: MQA 082016
Milk Protein HIGH (Cookie)

Description of the material: Ground processed cookie material incurred with skim milk powder using MQA 092014 (SMP). This skim milk powder has a protein content of 353.9 g/kg (determined by Kjeldahl). After baking the material has been ground to a fine particle size (40 mesh; 0.420 mm) to provide homogeneity. Sub portions of five gram were divided into foil sachets with a tamper evident seal. This material consists of an off white fine powder. It is not regulated and has no UN number. It is stable under the recommended storage and handling conditions.

Intended use: This material is intended for laboratory use only. Some of the intended uses include but are not limited to: Quality control sample, method development and method validation procedures. The material is not suitable for establishing method bias. This product is not intended for animal or human consumption.

Indicative values

Article number	mg/kg skim milk powder ¹	mg/kg milk protein ²	U (k=2) ³
MQA 082016	50.0	17.7	0.21

Notes:

- ¹ The indicative value is based in the gravimetric preparation data
- ² The value was calculated from the certified protein content of skim milk powder (MoniQA, MQA 0920214)
- ³ Combined measurement uncertainty of balances and protein determination given as mg/kg milk protein

Date of issue: 02.2017

Signed: *Carrie Maune*
Carrie Maune (Mrs)
Vice president for Trilog Analytical Laboratory
870 Vossbrink Dr.
Washington, MO 63090, USA
www.trilogylab.com

Product Information Sheet

Art. No.: MQA 102016
Milk Protein LOW (Cookie)

Description of the material: Ground processed cookie material incurred with skim milk powder using MQA 092014 (SMP). This skim milk powder has a protein content of 353.9 g/kg (determined by Kjeldahl). After baking the material has been ground to a fine particle size (40 mesh; 0.420 mm) to provide homogeneity. Sub portions of five gram were divided into foil sachets with a tamper evident seal. This material consists of an off white fine powder. It is not regulated and has no UN number. It is stable under the recommended storage and handling conditions.

Intended use: This material is intended for laboratory use only. Some of the intended uses include but are not limited to: Quality control sample, method development and method validation procedures. The material is not suitable for establishing method bias. This product is not intended for animal or human consumption.

Indicative values

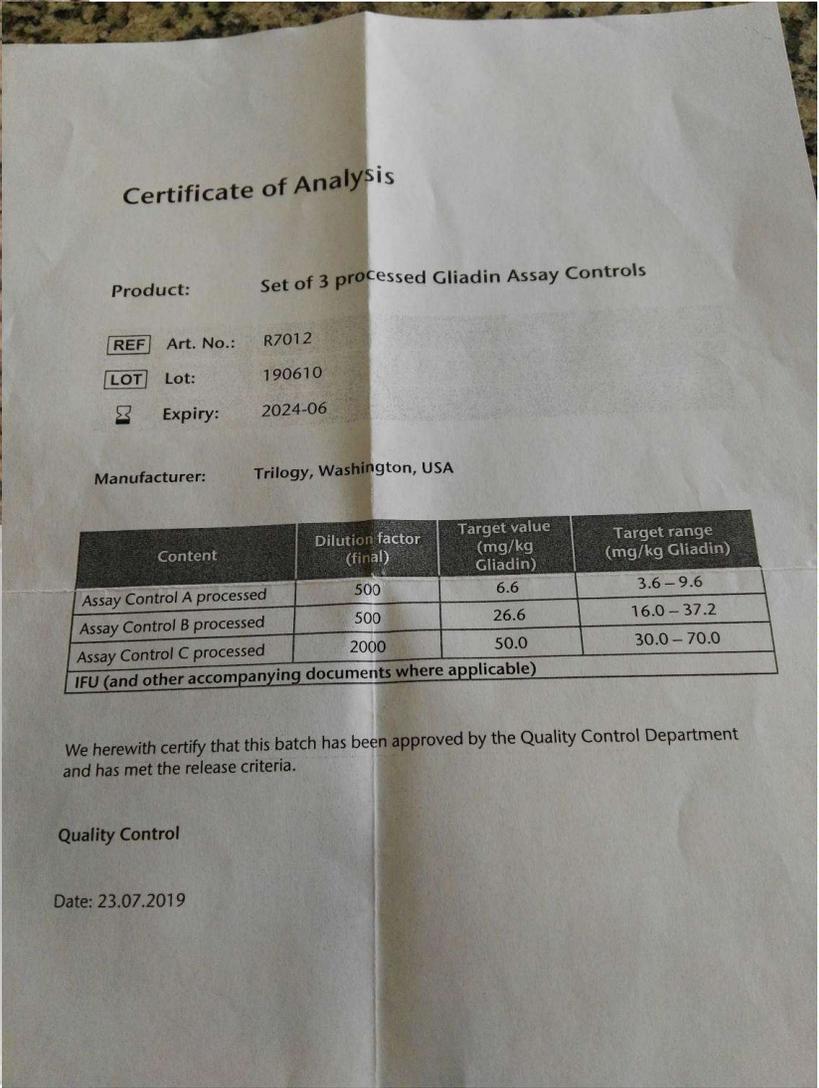
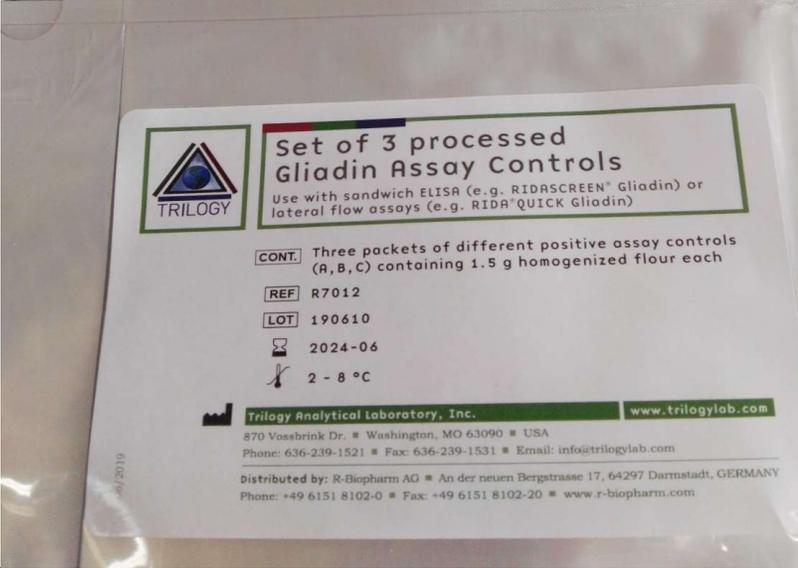
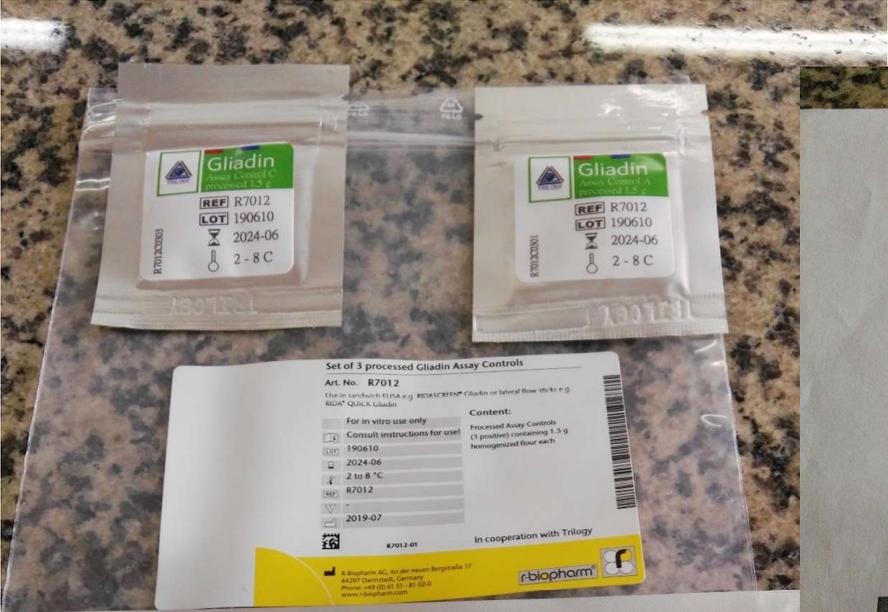
Article number	mg/kg skim milk powder ¹	mg/kg milk protein ²	U (k=2) ³
MQA 102016	10.0	3.54	0.04

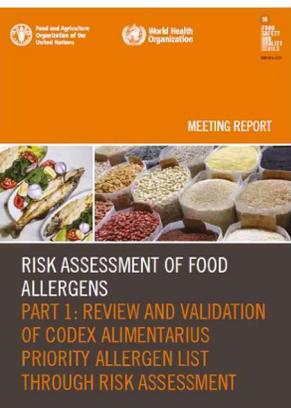
Notes:

- ¹ The indicative value is based in the gravimetric preparation data
- ² The value was calculated from the certified protein content of skim milk powder (MoniQA, MQA 0920214)
- ³ Combined measurement uncertainty of balances and protein determination given as mg/kg milk protein

Date of issue: 02.2017

Signed: *Carrie Maune*
Carrie Maune (Mrs)
Vice president for Trilog Analytical Laboratory
870 Vossbrink Dr.
Washington, MO 63090, USA
www.trilogylab.com



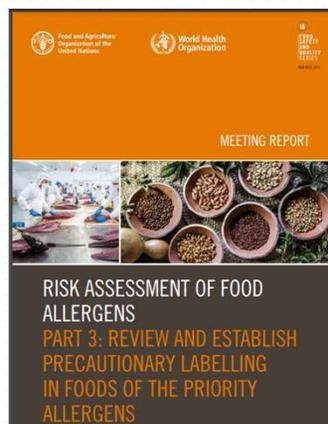
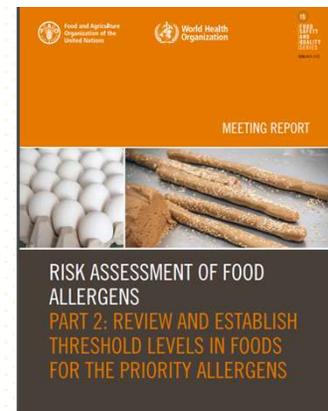


Consulta especial conjunta FAO/OMS de expertos sobre la evaluación de riesgos de los alérgenos alimentarios (2020-2022)

Deficiencias y/o inconsistencias actuales conocidas en las metodologías analíticas y métodos. Estos incluyen pero no se limitan a:

- Falta de métodos que sean adecuados para su propósito en la identificación y cuantificación de muchos alérgenos prioritarios. Pocos métodos de prueba proporcionan información sobre especificidad, y muchos carecen de datos suficientes sobre la validación, especialmente en cuanto a la cuantificación del analito en matrices alimentarias, complicando la elección de métodos de prueba apropiados para laboratorios analíticos;

- Disponibilidad limitada de materiales de referencia y ausencia de métodos de referencia;
- Poca recuperación o capacidad para extraer proteínas de matrices alimentarias complejas y falta de validación en una diversidad de matrices alimentarias;
- Pobre recuperación de proteínas de las matrices alimentarias como resultado del procesamiento, incluido el procesamiento térmico y la fermentación.



Las unidades informadas por el método deben armonizarse expresándolas en mg de proteína total de la fuente alérgica/kg de alimento que contiene el supuesto alérgeno no intencional.

Los límites de cuantificación (LoQ) de cualquier método utilizado para un alimento específico debe ser alrededor de 3 veces menor que el nivel de acción para ese alimento con el fin de tener en cuenta la variabilidad real del ensayo y para asegurar que el resultado analítico esté realmente en o por debajo del nivel de acción.

Bibliografía

- Código Alimentario Argentino, actualizado, 2023. Capítulo V. Disponible en : https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat_caa_capitulo_v_rotulacion_actualiz_2021-09.pdf
- Diaz-Amigo, C., Popping, B. (2010). Detection of food allergens. In Popping, B., Diaz-Amigo, C., Hoenicke, K., (Eds). Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists. (pp: 175-198) 1st ed. New Jersey. John Wiley & Sons.
- Diaz-Amigo C, Popping B. 2010. ANALYTICAL TESTING AS A TOOL FOR THE ENFORCEMENT OF FUTURE REGULATORY THRESHOLDS FOR FOOD ALLERGENS. Journal of AOAC International. Vol. 93, N° 2.
- "Guía para la Gestión de Alérgenos en la Industria Alimentaria", editado por Plataforma Alérgenos en Alimentos. 2013. Disponible en: <http://www.conal.gob.ar/recomendaciones/items/alergenos.pdf>
- Manual para la Implementación de la "Guía para la Gestión de Alérgenos en la Industria Alimentaria", editado por Plataforma Alérgenos en Alimentos. 2018.
- Risk assessment of food allergens: part 1: review and validation of Codex alimentarius priority allergen list through risk assessment: meeting report. March 2022. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240042391>
- Risk assessment of food allergens: part 2: review and establish threshold levels in foods for the priority allergens: meeting report. January 2023. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240065420>
- Risk assessment of food allergens - Part 3: Review and establish precautionary labelling in foods of the priority allergens. 2023. Disponible en: <https://www.fao.org/documents/card/en/c/cc6081en>

Bibliografía

- Cellerino K. 2016. Metodología de control para el análisis de alérgenos de leche, soja y huevo en productos cárnicos y farináceos. Tesis de Doctorado, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Argentina.
 - Molinari J. 2020. Desarrollo de biosensores amperométricos para cuantificación del alérgeno alimentario caseína. Tesis de doctorado. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
 - Henao Y. 2022. Estrategias para el fortalecimiento del sistema de control de alimentos para la gestión de riesgos en materia de alérgenos alimentarios. Tesis de Maestría en Tecnología de los Alimentos. UTN-Buenos Aires.
 - Paredes V. 2022. Desarrollo y validación de enzimoimmunoensayos para la detección/cuantificación de huevo en alimentos libres de gluten. Tesis de Maestría de la Universidad de Buenos Aires en Biotecnología, Universidad de Buenos Aires.
 - Detección de trazas de soja y de leche en productos libres de gluten: desarrollo de dos enzimoimmunoensayos competitivos. Cellerino K, Binaghi MJ, Ambrosi V y López LB. Acta Bioquím Clín Latinoam 2020; 54 (4): 395-406.
 - Development of a Competitive Enzyme Immunoassay Technique for the Detection of Peanut Traces in Gluten-free Products. Cellerino K, Márquez SB, Rodríguez VG, Docena G, López LB. Universal Journal of food science and technology. 1(1), 46-55. 2022. DOI: <https://doi.org/10.31586/ujfst.2022.540>
 - Validación de un enzimoimmunoensayo competitivo para la detección y cuantificación de proteínas de huevo en alimentos libres de gluten. Paredes VE, Cellerino K y López LB. Revista del Foro de la Alimentación, la Nutrición y la Salud (RFANUS) 2022. Volumen 4 (Nº1-2) 38- 52. ISSN 2683-9520.
-



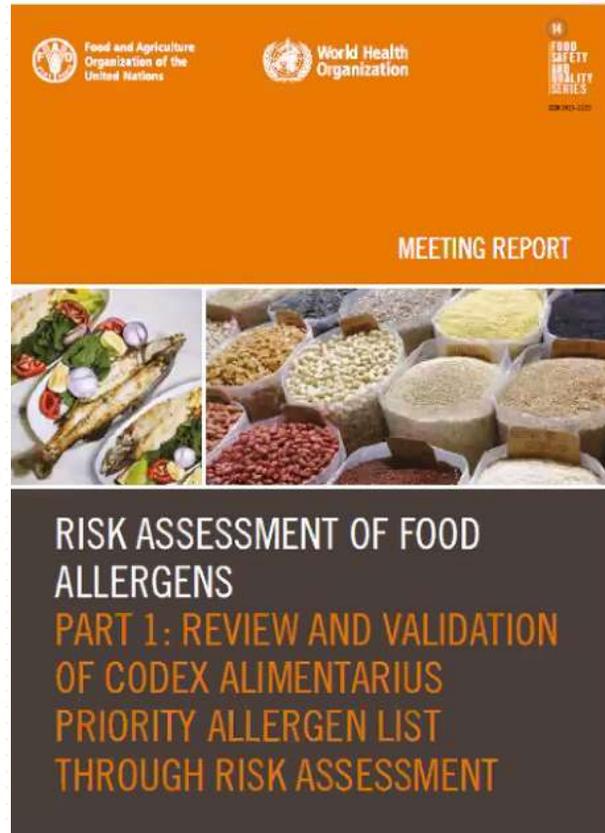
.UBA farmacia y bioquímica
FAULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

MUCHAS GRACIAS POR SU ATENCIÓN

e-mail: laulop@ffyb.uba.ar

Tel 011 52874204 -208/209

CONSULTA FAO/OMS DE EXPERTOS SOBRE EVALUACION DE RIESGOS DE ALERGENOS ALIMENTARIOS. LIC. MARIA CRISTINA LÓPEZ



SEGUNDA RECOMENDACIÓN ALÉRGENOS PRIORITARIOS A NIVEL MUNDIAL

- ✓ CEREALES QUE CONTIENEN GLUTEN (Por ejemplo, **trigo** y otras especies *Triticum*, **centeno** y otras especies *Secale*, **cebada** y otras especies *Hordeum* y sus cepas hibridizadas)
- ✓ CRUSTÁCEOS
- ✓ HUEVOS
- ✓ PESCADO
- ✓ LECHE
- ✓ MANÍ
- ✓ SÉSAMO
- ✓ FRUTOS SECOS ESPECÍFICOS:
 - ALMENDRA
 - CASTAÑA DE CAJÚ
 - NUEZ PECAN
 - AVELLANA
 - PISTACHO
 - NUEZ

Table 17 summarizes the overall outcome.

TABLE 17 CONSENSUS REFERENCE DOSE (RfD) RECOMMENDATIONS FOR CODEX PRIORITY ALLERGENS

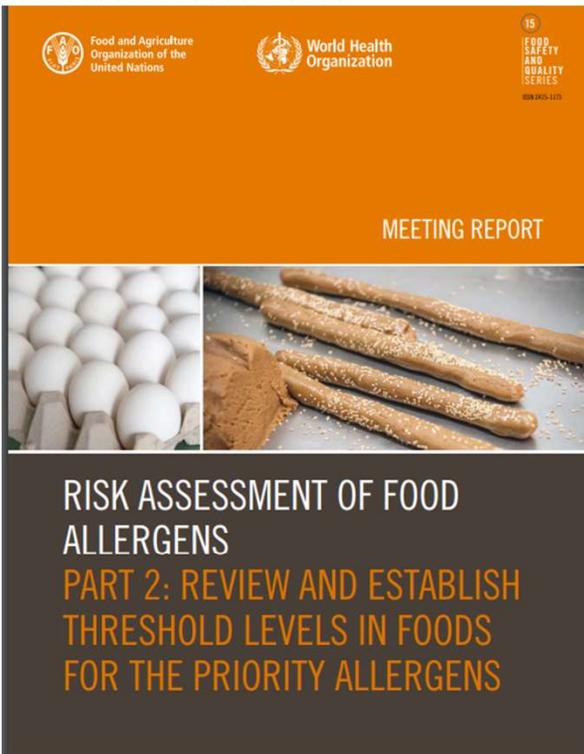
	RfD RECOMMENDATION (mg total protein from the allergen c source)
WALNUT (AND PECAN*)	1.0
CASHEW (AND PISTACHIO*)	1.0
ALMOND**	1.0
MILK	2.0
PEANUT	2.0
EGG	2.0
SESAME	2.0
HAZELNUT	3.0
WHEAT	5.0
FISH	5.0
CRUSTACEA	200

Source: Authors' own elaboration.

* See considerations below.

** Provisional.

$$\text{NIVEL DE ACCION (ppm)} = \text{Dosis de referencia} \times 1000/\text{porción}$$



AgriNEA comercializa Romer*

<https://agrinea.com/product-category/alergenos/elisa/>

<https://agrinea.com/product-category/alergenos/dispositivos-de-flujo-lateral-flu/>

Eticor SA comercializa Bio-Check (UK) Y Reveal 3-D

<https://eticor.com.ar/>

3M Argentina comercializa pruebas de alérgeno 3M*

https://www.3m.com.ar/3M/es_AR/p/c/suministros-pruebas-laboratorio/pruebas-indicadores/pruebas-alergenos/

Interciencia SA comercializa SENSISpec Eurofins Technologies y Elysa Systems

<http://www.interciencia.com/novedades/flyercomercialalergenos.pdf>

<http://interciencia.com/newsite/index.php/vercatalogos/kit-para-deteccion-de-alergenos>

**La Raíz SA (El maestro queso)
comercializa tiras para gluten**

<http://www.elquesero.com/deteccion-de-gluten-y-alergenos.html>

Supertec SA comercializa Astori Lab

https://supertec.com.ar/division-alimenticia/productos_laboratorio.php?accion=mostrar_categoria&id_categorias=620&nom_cats=A1%C3%A9rgenos%20y%20Gluten%20-%20Kits%20Elisa&tbl_dsp=

Neogen Cono Sur comercializa Neogen*

<https://www.neogen.com/solutions/allergens/>

R-Biopharm Latinoamérica SA comercializa R-Biopharm*

<http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis/allergens>

Límites de detección/cuantificación de diferentes kits ELISA para alérgenos de leche, huevo y soja

Alérgeno	R-biopharm	Neogen	Romer
Caseínas	R4612 : LD 0,71 ppm caseína. LC 2,5 ppm caseína	Veratox® for Casein 8460 LD 1 ppm casein Rango de cuantificación: 2,50 ppm casein - 15,00 ppm casein	AgraQuant® Plus Casein Allergens 10002042 (COKAL1248F) LC 1 ppm casein (raw and finished products), Rango de cuantificación: 1 - 25 ppm casein. 10002037 (COKAL1200) LD 0,04 ppm casein LC 0,2 ppm casein
Beta lactoglobulina	R4901 (productos con hidrolizados lácteos incluyendo alimentos hipoalergénicos para bebés) LD 2,1 ppm BLG LC 5 ppm BLG R4912 LD 0,04 ppm BLG. LC 0,167 ppm BLG	Biokits 902061Y LD 2 ppm BLG Rango de cuantificación: 2,50 ppm BLG - 40.00 ppm BLG	AgraQuant® Beta-Lactoglobulin test kit 10002034 (COKAL1048) LD 1,5 ppb BLG LC 10 ppb BLG
Leche	R4652 LD 0,57 ppm proteína de leche LC 2,5 ppm proteína de leche	Veratox for total milk (8470). LC 2,5 ppm leche en polvo desgrasada Rango de cuantificación: 2,5 - 25 ppm leche en polvo desgrasada	AgraQuant® Milk test kit 10002080 (COKAL2448) LD 0,05 ppm milk protein LC 0,4 ppm milk protein

Límites de detección/cuantificación de diferentes kits ELISA para alérgenos de leche, huevo y soja.

Alérgeno	R-biopharm	Neogen	Romer
Huevo	<p>RIDASCREEN® Egg Art. No.: R6411 LD 0,15 ppm whole egg powder LC 0,25 ppm whole egg powder</p> <p>RIDASCREEN®FAST Egg Protein Art. No.: R6402 LD 0,096 ppm whole egg powder LC 0,5 ppm whole egg powder</p>	<p>Veratox for egg (8450) LD: 2,5 ppm whole dried egg Rango de cuantificación: 2,50 ppm whole dried egg - 25 ppm whole dried egg</p>	<p>10002060 (COKAL1848F) LD 0,5 ppm whole egg powder (raw and finished products) LC 1 ppm whole egg powder (raw and finished products)</p> <p>10002026 (COKAL0848) LD 0,05 ppm egg white protein LC 0,4 ppm egg white protein</p> <p>10002092 (COKAL2948) LD 4 ppb ovalbumin LC 25 ppb ovalbumin</p>
Soja	<p>RIDASCREEN®FAST Soya Art. No.: R7102</p> <p>LD 0,24 ppm de proteína de soja</p> <p>LC 2,5 ppm de proteína de soja</p>	<p>Veratox for Soy 8410 LC 2,5 ppm soy flour Rango de cuantificación: 2,5 - 25 ppm soy flour</p>	<p>10002015 (COKAL0448) LD 16 ppb soy trypsin inhibitor LC 40 ppb soy trypsin inhibitor</p>

Análisis de sulfitos en alimentos

AOAC 990.28 sulfitos en alimentos. Método Monier-Williams optimizado.

Aplicable a la determinación de ≥ 10 ppm (ug/g) de sulfitos en alimentos.

Fundamento: el sulfito presente se transforma en SO_2 y este se oxida a H_2SO_4 . El contenido de sulfito está directamente relacionado con el H_2SO_4 generado, que es determinado por titulación con solución normalizada de NaOH.

Se necesitan grandes cantidades de muestra. Es lento y dificultoso.

AOAC 990.29 sulfito (total) en alimentos y bebidas. Flow injection Analysis Method.

Aplicable a la determinación de > 5 ug/g de SO_2 total en camarones, piñas, papas y vino blanco.

Fundamento: esta técnica facilita la separación de sulfitos empleando varias transformaciones químicas que culminan en la extracción de SO_2 en fase gaseosa a través de una membrana de teflón. Libre de interferencias el SO_2 reacciona con el colorante verde de malaquita y se detecta por espectrofotometría.

Se necesita un analista especializado y es costoso.

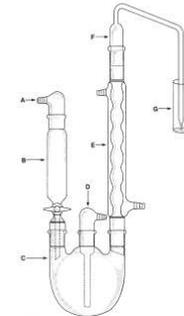


Figure 990.28A. Apparatus for optimized Monier-Williams method: A, inlet adapter; B, separatory funnel; C, round-bottom flask; D, gas inlet tube; E, Allihn condenser; F, bubbler; G, vessel.

© 2000 AOAC INTERNATIONAL

Análisis de sulfitos en alimentos

AOAC 990.31 sulfitos en alimentos y bebidas. Método de cromatografía de exclusión iónica.

Aplicable a la determinación de $SO_2 \geq 10$ (ug/g). No aplicable a alimentos fuertemente coloreados oscuros o ingredientes en donde el SO_2 está altamente unido por ejemplo color caramelo. No detecta sulfito de origen natural.

Fundamento: el SO_2 es liberado por extracción alcalina directa. Los extractos obtenidos se inyectan en un cromatógrafo líquido o en un sistema cromatográfico de exclusión aniónica equipado con una columna de exclusión aniónica y un detector electroquímico.

Equipamiento costoso y personal entrenado.

Supelco.

1.10013.0001

MQuant®
Test Sulfitos



1. Método

Los iones sulfito reaccionan con una mezcla de hexacianoferrato(II) potásico, sulfato de cinc y nitroprusiato sódico dando un compuesto rojo. La concentración de sulfitos se determina **semicuantitativamente** por comparación visual de la zona de reacción de la tira de ensayo con las zonas de una escala colorimétrica.

2. Intervalo de medida y número de determinaciones

Intervalo de medida / graduación de la escala colorimétrica	Número de determinaciones
10 - 40 - 80 - 180 - 400 mg/l de SO ₃ ²⁻	100

3. Campo de aplicaciones

Materiales de las muestras:
Aguas residuales
Aguas de calderas y agua de alimentación de calderas
Refrigeradores, baños fijos y de paro
Bebidas y alimentos tras preparación apropiada de la muestra

4. Influencia de sustancias extrañas

Esta se comprobó de forma individual en soluciones con 250 y con 0 mg/l de SO₃²⁻. Hasta las concentraciones de sustancias extrañas indicadas en la tabla la determinación todavía no es interferida. No se han controlado efectos acumulativos; sin embargo, estos no pueden ser excluidos.

Concentración de sustancias extrañas en mg/l

Ag ⁺		Cu ²⁺		Ni ²⁺	
25	1000	10	1000	10	1000
Ascorbato		Fe ²⁺		NO ₂	
100	10	10	1000	10	1000
Ba ²⁺		Fe(CN) ₆ ⁴⁻		PO ₄ ³⁻	
25	1000	1000	1000	25	1000
Ca ²⁺		Fe(CN) ₆ ³⁻		SO ₄ ²⁻	
1000	1000	1000	1000	1000	1000
Cd ²⁺		Hg ²⁺		S ²⁻	
1000	1000	1000	50	50	50
Cl ⁻		Mn ²⁺		SO ₃ ²⁻	
1000	1000	1000	1000	1000	1000
CN ⁻		MnO ₄ ⁻		Zn ²⁺	
1000	1000	1000	1000	1000	1000
CrO ₄ ²⁻		NH ₄ ⁺			
10	1000	1000			

5. Reactivos y auxiliares

Las tiras de ensayo son utilizables hasta la fecha indicada en el envase si se conservan cerradas entre +2 y +8 °C.

Contenido del envase:

Caja con 100 tiras de ensayo

Otros reactivos:

- MQuant® Tiras indicadoras universales pH 0 - 14, art. 109535
- Sodio hidróxido en solución 1 mol/l Titripur®, art. 1095137
- Ácido clorhídrico 1 mol/l Titripur®, art. 109057
- Sodio sulfito anhidro para análisis, art. 106657
- Titripur® III para análisis, art. 108418
- Solución tampón pH 9,00 Certipur®, art. 109461

6. Preparación

- Las muestras con más de 400 mg/l de SO₃²⁻ deben diluirse con agua destilada.
- El valor del pH debe encontrarse en el intervalo 8 - 10.
- Si es necesario, ajustar con solución de hidróxido sódico o con ácido clorhídrico.

7. Técnica

Introducir la zona de reacción de la tira de ensayo durante 1 segundo en la muestra preparada (15 - 25 °C).

Eliminar el exceso de líquido de la tira sacudiéndola y, después de 30 segundos, clasificar el color de la zona de reacción de la mejor manera posible de acuerdo con una zona de color de la etiqueta.

Leer el correspondiente valor de medición en mg/l de SO₃²⁻.

Notas sobre la medición:

Después de transcurrido el tiempo de reacción indicado, la zona de reacción puede continuar cambiando de color. Esto no debe ser tenido en cuenta en la medición.

Si el color de la zona de reacción corresponde a la tonalidad más oscura de la escala colorimétrica o es más intenso, debe repetirse la medición con nuevas muestras diluidas, hasta que se obtenga un valor inferior a 400 mg/l de SO₃²⁻.

En el resultado del análisis debe considerarse correspondientemente la dilución (ver también apartado 6).

Resultado del análisis = valor de medición x factor de dilución

8. Control del procedimiento

Comprobación de las tiras de ensayo y de la manipulación:

Dissolver 0,157 g de sulfito sódico anhidro y 0,040 g de Titripur® III en agua destilada, completar con agua a 100 ml y mezclar.

Contenido de SO₃²⁻: 1000 mg/l.
Tomar 8,0 ml de esta solución, añadir 10 ml de solución tampón pH 9,00, completar a 100 ml con agua destilada y mezclar. Seguidamente analizar tal como se describe en el apartado 7. El contenido de SO₃²⁻ determinado debe ser de 80 mg/l.

Notas adicionales, ver bajo

www.qa-test-lots.com.

9. Nota

Cerrar de nuevo inmediatamente la caja tras la toma de la tira de ensayo.

Comercializa R-Biopharm Latinoamérica SA

Sulfite

UV-method

for the determination of sulfurous acid ("total SO₂") in food-stuffs and other materials

Cat. No. 10 725 854 035

Test-Combination for 31 determinations

BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM
Enzymatic BioAnalysis / Food Analysis

For use in foodstuff hygiene only.

Store at 2-8°C

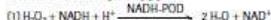
For recommendations for methods and standardized procedures see references (2)

Principle (Ref. 1)

Sulfite (sulfurous acid) is oxidized to sulfate by sulfite oxidase (SO₂-OX) in the presence of oxygen (1):



The hydrogen peroxide formed in this reaction is reduced by the enzyme NADH-peroxidase (NADH-POD) in the presence of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide (NADH) (2):



The amount of NADH oxidized in reaction (2) is equivalent to the amount of sulfite or to aldehyde chemically-bound sulfite. NADH is determined by means of its light absorbance at 334, 340 or 365 nm.

(Note: Hydrogen peroxide formed as an intermediate product does not react with the residual sulfite.)

The Test-Combination contains

1. Bottle 1 with approx. 30 ml solution, consisting of: triethanolamine buffer, pH approx. 8,0
2. Bottle 2 with approx. 30 tablets; each tablet contains: NADH, approx. 0,8 mg
3. Bottle 3 with approx. 0,3 ml suspension, consisting of: NADH-POD, approx. 3 U
4. Bottle 4 with approx. 1,6 ml suspension, consisting of: SO₂-OX, approx. 4 U¹

Preparation of solutions

1. Use contents of bottle 1 undiluted.
2. Dissolve one tablet of bottle 2 with one ml solution of bottle 1 in a beaker or in a centrifuge tube for each assay (blank and sample) depending on the number of determinations. Use forceps for taking the tablets out of bottle 2. This results in reaction mixture 2.
3. Use contents of bottle 3 undiluted.
4. Use contents of bottle 4 undiluted.

Stability of reagents

Solution 1 is stable at 2-8°C (see pack label).

Bring solution 1 to 20-25°C before use.

The contents of bottle 2 are stable at 2-8°C (see pack label).

Reaction mixture 2 is stable for one week at 2-8°C.

Bring reaction mixture 2 to 20-25°C before use.

The contents of bottles 3 and 4 are stable at 2-8°C (see pack label).

Procedure

Wavelength²: 340 nm, Hg 365 nm or Hg 334 nm
Glass cuvettes²: 1,00 cm light path
Temperature: 20-25°C
Final volume: 3,060 ml
Read against air (without a cuvette in the light path) or against water
Sample solution: 0,6-30 µg sulfites/assay³ (as SO₂ in 0,100 - 2,000 ml sample volume)

Important note

Use only freshly redist. water for the assay or treat demineralized water with activated charcoal (e.g. 1 g/100 ml) mix charcoal into water while stirring. Filter after approx. 3 min. Bentonite may also be used.

1. Activity, measured as O₂-consumption, 1 µmol/min.
2. The absorption maximum of NADH is at 340 nm. On spectrophotometers, measurements are taken at the absorbance maximum. For photometers equipped with a mercury vapor lamp are used, measurements are taken at a wavelength of 365 nm or 334 nm.
3. If desired, disposable cuvettes may be used instead of glass cuvettes.
4. See instructions for performance of assay.
5. Available from Roche Applied Science, Cat. No. 228 314
6. Available from Roche Applied Science, Cat. No. 750 610

Pipette into cuvettes	Blank	Sample
reaction mixture 2	1,000 ml	1,000 ml
sample solution ⁴	0,100 ml	0,100 ml
redist. water	2,000 ml	1,800 ml
suspension 3	0,010 ml	0,010 ml

Meas⁴, read absorbances of the solutions after approx. 5 min (A₁). Start the reaction by addition of:

suspension 4	0,050 ml	0,050 ml
--------------	----------	----------

Meas⁴, wait for the completion of the reaction (approx. 30 min), read absorbances of the solutions (A₂). If the reaction has not stopped after 30 min, continue to read the absorbances at 5 min intervals until the absorbances decrease constantly over 5 min.

⁴ Place the enzyme pipette or the pipette tip of the piston pipette with sample solution before dispensing the sample solution.
⁵ For example, with a plastic spatula or by gentle swirling after closing the cuvette with Parafilm (trademark of the American Can Company, Greenwich, Ct, USA)

If the absorbance at A₂ decreases constantly, extrapolate the absorbances to the time of the addition of suspension 4 (sulfite oxidase).

Determine the absorbance differences (A₁-A₂) for both, blank and sample. Subtract the absorbance difference of the blank from the absorbance difference of the sample.

$$\Delta A = (A_1 - A_2)_{\text{sample}} - (A_1 - A_2)_{\text{blank}}$$

The measured absorbance differences should, as a rule, be at least 0,100 absorbance units to achieve sufficiently precise results (see "Instructions for performance of assay" and "Sensitivity and detection limit", pt. 4). Occasionally a negative value with (A₁-A₂)_{blank} is obtained. This value is then to be added to (A₁-A₂)_{sample} according to the calculation formula.

If the absorbance difference of the sample (ΔA_{sample}) is higher than 1,000 (measured at 340 nm, or Hg 334 nm, respectively) or 0,500 (measured at Hg 365 nm), the concentration of sulfite in the sample solution is too high. The sample is to be diluted according to the dilution table in that case.

Calculation

According to the general equation for calculating the concentration:

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \text{ [g/l]}$$

V = final volume [ml]

v = sample volume [ml]

MW = molecular weight of the substance to be assayed [g/mol]

d = light path [cm]

ε = extinction coefficient of NADH at:

$$340 \text{ nm} = 6,3 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

$$\text{Hg } 365 \text{ nm} = 3,4 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

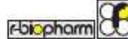
$$\text{Hg } 334 \text{ nm} = 5,18 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

It follows for sulfite (as SO₂):

$$c = \frac{3,060 \times 64,06}{\epsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta A = \frac{1,960}{\epsilon} \times \Delta A \text{ [mg SO}_2\text{/l sample solution]}$$

If the sample has been diluted during preparation, the result must be multiplied by the dilution factor F.

Roche Diagnostics, 64271 Darmstadt, Germany.
Tel. +49(0)6151 75-12493
www.roche-diagnostics.com/usa/roche-laboratory
Roche Diagnostics Corporation, 440 Summit Street
Burlington, MA 01803, USA, Tel. +1-878-725-4321
Roche Diagnostics Canada Co. or HELLING (Canada) Ltd.
1200 West Beaver Creek, Richmond Hill, ON L4B 1R3
Canada. Tel. +1-905-882-1000



1116 107227110010

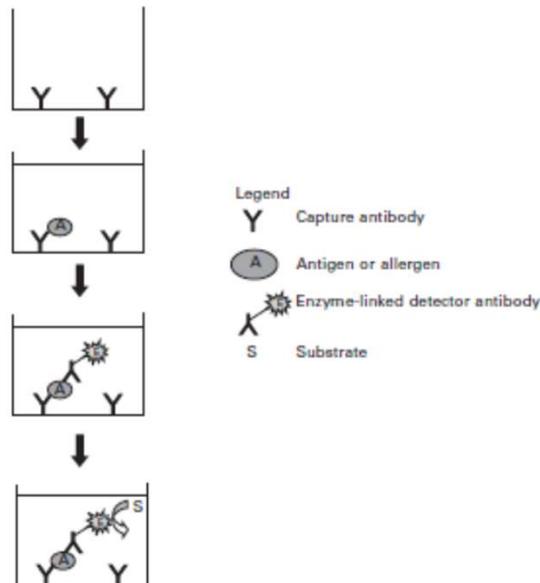


**Métodos ELISA

En el ELISA tipo sándwich se utilizan dos anticuerpos, el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario unido a la enzima. En este ensayo se establece la unión directa del alérgeno a los dos anticuerpos, quedando el antígeno "atrapado" entre ambos.

En el ELISA competitivo se incuba la muestra con el anticuerpo primario (preincubado) para después añadir esta preparación sobre una superficie recubierta de antígeno, de tal forma que se une a la superficie el anticuerpo primario libre no unido al alérgeno de la muestra. Finalmente se detecta la cantidad de anticuerpo primario libre, unido ahora al antígeno del pocillo, mediante un segundo anticuerpo marcado con enzima. Cuanto más anticuerpo primario es detectado, menos cantidad de alérgeno contiene la muestra.

A) ELISA sándwich



B) ELISA Competitivo.

