



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Análisis de proteínas de huevo en alimentos mediante un sistema
rápido de lectura imparcial

Analysis of egg proteins in food using a fast and fair reading system

Autor/es

María Rebeca Cartagena Lomero

Director/es

María Dolores Pérez Cabrejas
Patricia Galán Malo

Facultad de Veterinaria

2019-2020

ÍNDICE:

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Las alergias alimentarias	2
1.2. Alérgenos alimentarios	3
1.3. Legislación y etiquetado de alérgenos alimentarios.....	3
1.4. Dosis de referencia de alérgenos.....	4
1.5. Proteínas alergénicas del huevo.....	5
1.6 Métodos de detección de alérgenos alimentarios.....	8
1.6.1. Técnicas inmunoquímicas.....	8
1.6.1.1 Técnicas de ELISA en placa.....	8
1.6.1.2 Inmunocromatografía de flujo lateral (LFIA).....	9
1.6.2 Métodos basados en la detección de ADN.....	9
1.6.2.1 Técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	9
1.6.3 Técnicas de separación.....	10
1.6.3.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	10
1.6.3.2 Electroforesis.....	10
1.6.3.3 Espectrometría de masas (MS).....	11
1.7 Validación y materiales certificados de referencia (CRM).....	11
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1. Materiales	14
3.2. Métodos	14
3.2.1. Preparación de muestras del material de referencia y de ovoalbúmina.....	14
3.2.2. Extracción de muestras de alimentos.....	14
3.2.3. Preparación de muestras de alimentos adicionadas con huevo.....	15
3.2.4. Muestreo de superficies.....	15
3.2.5. Preparación de aguas de aclarado	16
3.2.6. Técnica de inmunocromatografía de flujo lateral (LFIA).....	16
3.2.7. Técnica de ELISA en placa	17
3.2.8. Validación.....	18

3.2.8.1. Sensibilidad y probabilidad de detección (POD).....	19
3.2.8.2. Especificidad.....	19
3.2.8.3. Estudio de la robustez del test.....	19
3.2.8.4. Estudio del efecto prozona.....	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1. Determinación de la especificidad y efecto matriz.....	20
4.2. Determinación del límite de detección y del efecto prozona.....	22
4.3. Estudio de la robustez del test	26
4.4. Análisis de aguas de aclarado	27
4.5. Análisis de superficies.....	28
5. CONCLUSIONES	30
6. BIBLIOGRAFÍA	32
ANEXO 1: Informe del fabricante del material de referencia RM NIST 8445.	

RESUMEN

Las alergias alimentarias constituyen un grave problema de salud pública debido a su alta prevalencia y al deterioro que suponen en la calidad de vida de las personas sensibilizadas. La única forma de prevenirlas es evitando el consumo del alimento alergénico. El control del cumplimiento de la legislación de etiquetado de alérgenos por los organismos competentes y la implementación de un plan de gestión de alérgenos en la industria alimentaria requieren métodos de detección sensibles, rápidos y sencillos.

El huevo, muy utilizado por su calidad nutricional y propiedades tecnológicas, es uno de los alimentos más alergénicos. Para detectarlo, la empresa Zeulab ha desarrollado un test inmunocromatográfico, denominado Proteon Egg Express, basado en la detección de ovoalbúmina, la proteína más abundante y alergénica del huevo. El presente trabajo ha tenido como objetivo validar dicho test, siguiendo los protocolos establecidos en las guías internacionales, utilizando un material de referencia, alimentos modelo y comerciales. También se ha probado un lector óptico diseñado para obtener una lectura objetiva de los resultados del test.

El test Proteon Egg Express es robusto y tiene una alta sensibilidad, pues permite detectar 1 ppm de huevo en polvo. No ha mostrado interferencias con una amplia gama de ingredientes básicos, por lo que es adecuado para analizar una gran variedad de matrices alimentarias. Su sensibilidad es menor en productos procesados, debido a la desnaturalización térmica de la ovoalbúmina.

Se ha determinado la aplicabilidad del test Proteon Egg Express a superficies de trabajo, donde puede detectar 0,5 y 0,25 μg de huevo en polvo en acero inoxidable y melamina, respectivamente. En aguas de limpieza, es capaz de detectar 1 ppm de huevo en polvo en presencia de concentraciones de 0,5 N y 0,1 N de hidróxido sódico y de ácido clorhídrico, respectivamente.

ABSTRACT

Food allergies are a serious health issue because of their high prevalence, and cause deterioration in living conditions of sensitized people, even being life-threatening. Avoidance of the allergen intake is the only effective measure to prevent them. To control compliance with allergen labeling legislation and implementing an allergen management plan in the food industry requires sensitive, fast and simple detection methods.

The egg, widely used for its nutritional quality and technological properties, is one of the major allergens. To detect it, Zeulab has developed an immunochromatographic test, called Proteon Egg Express, based on the detection of ovalbumin, the most abundant and allergenic egg protein. This work has aimed to validate this test, following protocols established in international guides, using a certified reference material, model foods and commercial foods. An optical reader designed to obtain an objective reading of the test results has also been tested.

Proteon Egg Express is rugged and has high sensitivity, as it detects 1 ppm of egg powder. It has not shown interference with a wide range of basic ingredients, so it is suitable for analyzing a wide variety of food matrices. Its sensitivity is lower in processed products, due to the thermal denaturation of ovalbumin.

The applicability of Proteon Egg Express to work surfaces has been determined, where it can detect 0,5 µg of egg powder on stainless steel and 0,25 µg on melamine. In cleaning waters, the test is able to detect 1 ppm of egg powder in the presence of concentrations of 0,5 N and 0,1 N of sodium hydroxide and hydrochloric acid, respectively.

1. Introducción

1.1 Las alergias alimentarias

El concepto de alergia alimentaria incluye el conjunto de reacciones adversas para la salud producido por los alimentos (sea por ingestión, contacto o inhalación) en las que está implicado el sistema inmunitario (AESAN, 2007). Las alergias alimentarias pueden ser de dos clases según estén mediadas o no por inmunoglobulinas de la clase E (IgE).

Las alergias alimentarias pueden presentar una amplia gama de síntomas, con diferentes grados de severidad y duración, afectando a distintos órganos y sistemas como la piel, el sistema respiratorio o el digestivo. En algunas ocasiones pueden producir reacciones graves como la anafilaxia (de carácter sistémico y que conlleva síntomas como dolor abdominal y torácico, angioedema, arritmia o hipotensión, entre otros), que pueden conducir a la muerte si no se administra un tratamiento sintomático urgente (Fox et al., 2013).

Tanto la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESAN) como el panel de expertos reunidos por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2014) subrayan la dificultad de conocer la prevalencia real de las alergias alimentarias debido a la heterogeneidad de los estudios realizados (distintos objetivos de estudio, criterios de diagnóstico, población utilizada...) e incluso de la ausencia de los mismos para algunas zonas geográficas. No obstante, estiman que entre un 1 y un 3% de la población podría padecerlas, siendo el porcentaje mayor (entre un 4 y un 6%) en la población infantil. Una reciente revisión de estudios sobre el tema incrementa esas cifras hasta un 10%, sobre todo en los países más industrializados, y señala además que la prevalencia ha mostrado una tendencia creciente en las dos o tres últimas décadas (Sicherer y Sampson, 2018).

Para el diagnóstico de las alergias alimentarias se utilizan diversas técnicas, como las pruebas cutáneas (*prick test*) o la determinación de anticuerpos IgE específicos en el suero. La confirmación se hace mediante pruebas de provocación, en las que se elimina de la dieta el alimento sospechoso y se comprueba que los síntomas remiten y reaparecen si se vuelve a consumir. Estas pruebas deben ser controladas con el sistema doble ciego con placebo, para lo cual es imprescindible contar con métodos

que aseguren la presencia o ausencia del alérgeno en el alimento que se suministra a los pacientes, así como en la dieta subsiguiente del alérgico (EFSA, 2014).

Actualmente se están investigando posibles métodos para evitar la aparición de una alergia alimentaria o reducir la sensibilización a un alérgeno alimentario mediante inmunoterapia oral (Martos, 2012). Sin embargo, en la mayoría de los casos, la mejor estrategia de prevención de una crisis alérgica es evitar la ingesta de los alérgenos mediante una dieta que suprima los alimentos que los contienen.

Las consecuencias de estas alergias, además del perjuicio personal y económico para quienes las sufren (Protudjer et al., 2015; Voordouw et al., 2016), suponen un coste considerable para los sistemas de salud. Según resultados del estudio EUROPREBALL, llevado a cabo en 19 países de la Unión Europea, tratar a personas con alergia alimentaria puede suponer hasta el doble de gasto para un adulto y el triple para un niño en comparación con individuos no alérgicos (Fox et al, 2013).

1.2 Alérgenos alimentarios

Se han identificado más de 180 alimentos capaces de causar alergia alimentaria, aunque ocho son los responsables de la mayor parte de las reacciones alérgicas: la leche, el huevo, los cacahuetes, la soja, el marisco, el pescado, el gluten y la nuez (Gasilova y Girault, 2015; Comisión del Códex Alimentarius, 2019). Los componentes alimentarios causantes de las alergias son determinadas proteínas o glicoproteínas hidrosolubles. Estas proteínas se caracterizan por que suelen presentar una alta resistencia a la desnaturalización por los tratamientos tecnológicos de procesado, así como a los cambios de pH y a la degradación por las proteasas digestivas.

El procesado de los alimentos puede afectar a la alergenidad de las proteínas que contienen, aumentándola o reduciéndola. Además, el procesado puede dificultar la detección de las proteínas alergénicas mediante las técnicas analíticas aplicadas para tal fin. La complejidad de las matrices alimentarias y la gran variedad de tipos y condiciones de procesado que se pueden aplicar a los alimentos hace muy difícil prever cómo se verá afectada la detección analítica de los alérgenos alimentarios (EFSA, 2014).

1.3 Legislación y etiquetado de alérgenos alimentarios

En la Unión Europea, según el Reglamento (CE) 178/2002, la responsabilidad acerca de la inocuidad de los alimentos y la veracidad de lo que declara la información que los acompaña es de los operadores de la industria alimentaria. Actualmente, el Reglamento (UE) 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre sobre la información alimentaria facilitada al consumidor establece que hay 14 grupos de alimentos alergénicos que, si se usan intencionadamente como ingredientes, son de declaración obligatoria. Han de aparecer de forma destacada y diferenciada con claridad del resto de los ingredientes,

y es información que debe facilitarse tanto en los alimentos envasados como en los comercializados a granel, así como en los servicios de restauración.

Aparte de esa presencia conocida en la formulación del producto, existe la posibilidad de que se produzca otra no intencionada si ocurre una contaminación cruzada durante el proceso de fabricación o en los espacios donde se preparan y sirven alimentos. Se trata de un problema relevante que requiere medidas de prevención adecuadas que pueden incluir el uso de líneas separadas o equipos específicos, personal formado y procedimientos especiales de limpieza validados, entre otros (FIAB, 2013).

Por ello, las alergias también tienen un impacto en los operadores económicos que suministran alimentos, puesto que legalmente tienen la obligación de utilizar los medios adecuados para que sus productos sean seguros para el consumidor y de informar a éste de los posibles riesgos. Tanto es así, que la Comisión del Códex Alimentarius empezó a preparar en 2017 un proyecto de código de prácticas sobre la gestión de alérgenos alimentarios por parte de los operadores de empresas de alimentos, cuya última versión, de noviembre de 2019, está en fase de aprobación.

Este tipo de precauciones son particularmente relevantes cuando los destinatarios de los alimentos son poblaciones de especial riesgo, como los niños, y en lugares como los colegios, donde se producen un 20% de las reacciones alérgicas (Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica, 2013). Según Pajno et al. (2014), más del 40% de las muertes por anafilaxis debidas a los alimentos se producen por comidas preparadas fuera del hogar.

De ahí la importancia de contar con técnicas analíticas sensibles, fiables y rápidas que permitan detectar los alérgenos tanto de los alimentos como de los utensilios y superficies de trabajo, de modo que pueda ofrecerse una información adecuada al consumidor en el etiquetado (Gasilova y Girault, 2015).

1.4 Dosis de referencia de alérgenos

En los últimos años se están llevando a cabo estudios para determinar los umbrales por debajo de los cuales la concentración de un alérgeno es inocua para la mayoría de las personas sensibles a dicho componente (EFSA, 2014; Taylor et al., 2014; Taylor et al., 2018).

En Australia, dentro del programa VITAL (Voluntary Incidental Trace Allergen Labelling), se ha trabajado con datos clínicos de ese país, de EE. UU. y de la Unión Europea para elaborar, a partir de unas curvas dosis-respuesta, unas dosis de referencia, que serían los miligramos de proteína total del alérgeno por debajo de la cual sólo los individuos más sensibles (un 1%) sería esperable que experimentasen una reacción adversa. Así, se fijaron dosis inductoras (*Eliciting doses*, ED01) expresadas en mg de proteína de alimento por debajo de las cuales el 99% de los alérgicos no sufrirían efectos adversos (Allergen Bureau, 2019) para varios alimentos como para cacahuets (0,2 mg), huevos (0,2), leche (0,2) y avellanas (0,1).

El objetivo de este programa es ayudar a los operadores a gestionar mejor los riesgos derivados de la presencia de alérgenos en el proceso productivo, sobre todo los que pueden estar presentes por contaminación cruzada, y también a informar adecuadamente al consumidor mediante un etiquetado precautorio (puede contener...) que sólo debe usarse si existe un nivel de contaminación realmente peligroso en los alimentos comercializados. Para ello, se ha tenido en cuenta la cantidad de referencia de ingesta de un alimento, que correspondería a la ración máxima que se consume habitualmente en una comida, de modo que, combinándola con la dosis de referencia, se determinan las concentraciones (en ppm, mg/kg) del alérgeno por encima de las cuales es necesario poner una advertencia en el etiquetado y por debajo no sería necesario.

Una de las principales ventajas del programa VITAL es que permite mejorar el etiquetado de los productos para dar garantías al consumidor alérgico informándole del riesgo real que entrañan para las personas alérgicas los alimentos que van a consumir. Establecer qué límites son seguros para la mayoría de los alérgicos evitaría tener que recurrir abusivamente al etiquetado preventivo “puede contener” que resulta confuso y, en consecuencia, a menudo no sirve para que el consumidor sepa qué debe elegir o evitar, generando ansiedad y una innecesaria limitación en la oferta de productos (Allen y Taylor, 2018; EUROPREBALL, 2010).

En la legislación de Japón, se ha establecido una concentración de 10 ppm como límite por encima del cual los alérgenos deben ser declarados en la etiqueta de los alimentos (Sakai et al., 2012). En Suiza, la legislación es menos restrictiva, ya que ese límite es mucho mayor, de 1.000 ppm (Ross et al., 2018). En cualquier caso, aplicar estas normativas exige que los operadores de empresas alimentarias mantengan un control analítico en las diferentes fases del proceso de elaboración.

En la normativa de la Unión Europea, se indican cantidades de referencia para dos componentes que producen reacciones adversas, concretamente el gluten y los sulfitos. Así, se marcan 20 y 100 mg/kg (ppm) como cantidades límite para etiquetar como “sin gluten” o con “con bajo contenido en gluten” un alimento, respectivamente, y los sulfitos son de obligatoria declaración en la etiqueta siempre que exista un contenido superior a 10 mg/kg o 10 mg/l. Sin embargo, hasta la fecha no se han indicado límites para ninguno de los alimentos alergénicos en la normativa vigente.

1.5 Proteínas alergénicas del huevo

El huevo de gallina (*Gallus gallus*) ha sido desde tiempos inmemoriales un alimento muy apreciado y con un amplio consumo en todo el mundo, debido a su valor nutricional y su versatilidad gastronómica (Instituto de Estudios del Huevo, 2009). Además, en la industria alimentaria está muy extendido el uso de ovoproductos, que se derivan de la transformación de huevos o de sus diversos componentes. Por otra parte, la sensibilidad al huevo es también una de las alergias más frecuentes, sobre todo en niños, y se estima que afecta a entre un 0,5 y un 9% de la población (Seweryn et al., 2018).

La alergia al huevo de gallina es una reacción adversa mediada en la mayor parte de los casos por un mecanismo inmunológico IgE. Los síntomas más habituales son urticaria, angioedema, vómitos, dolor abdominal y diarrea, aunque pueden producirse afecciones respiratorias como broncoespasmos y rinoconjuntivitis. En los casos más graves, el huevo puede inducir un choque anafiláctico.

Un huevo suele pesar entre 55 y 75 gramos, de los cuales un 10% es la cáscara, un 30% es la yema y el restante 60%, la clara o albumen. Esta última está formada por un 88% de agua y un 12% de proteína, cuya equilibrada y completa composición en aminoácidos la ha convertido en la proteína de referencia para valorar la calidad de las de otros alimentos. Por su parte, la yema contiene alrededor de un 50% de agua y el extracto seco está formado por proteínas (32%), lípidos (64%), vitaminas, minerales y carotenoides, estos últimos responsables de su color amarillo-anaranjado (Huopalahti et al., 2007).

Se han identificado más de 150 proteínas en el huevo, pero la clara aporta las cinco principales: ovoalbúmina, ovomucoide, ovotransferrina, ovomucina y lisozima. De ellas, cuatro son los alérgenos dominantes del huevo: ovomucoide (Gal d 1), ovoalbúmina (Gal d 2), ovotransferrina (Gal d 3) y lisozima (Gal d 4), que son los que con mayor frecuencia causan reacciones de hipersensibilidad a la población infantil (Seweryn et al., 2018). En el caso de la yema, con una mayor afección a personas adultas, los principales alérgenos son la seroalbúmina o α -livetina (Gal d 5), responsable del 'síndrome ave-huevo', y el fragmento C terminal YGP42 de la vitelogenina I (Gal d 6) (Martos, 2012).

El ovomucoide supone un 11% del total de la proteína de la clara. Es una glicoproteína de peso molecular de 28 kDa y punto isoeléctrico 4.1. De todas las proteínas es la más termorresistente, lo que la convierte en una buena diana para detectar huevo en productos procesados térmicamente, y además es también la menos susceptible a la proteólisis digestiva.

La ovoalbúmina es la proteína más abundante de la clara, ya que supone un 54% del total de proteínas de la misma. Se trata de una fosfoglicoproteína que está formada por 386 aminoácidos y tiene además un 3% en peso de carbohidratos, lo que supone una masa molecular de 44 kDa. Presenta un enlace disulfuro, cuatro grupos sulfhidrilo libres y una estructura predominante en alfa-hélice, con un punto isoeléctrico de 4,5. Según Mine y Rupa (2003), los principales componentes estructurales de los epítopos de la ovoalbúmina están localizados en la hoja plegada beta y en los giros beta. La ovoalbúmina nativa presenta mucha heterogeneidad de carga por las variaciones de secuencia y el grado de fosforilación. Además, si se almacena en contacto con el aire se reorganiza a S-albúmina, una conformación diferente que expone un grupo carboxilo (Jacobsen et al, 2008). La ovoalbúmina reduce su alergenicidad tras calentarla a temperaturas superiores a 90°C (Martos, 2012).

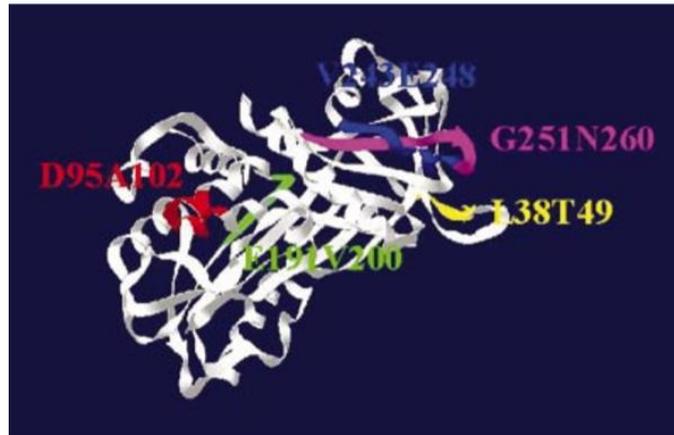


Figura 1. Localización de los epítomos inmunodominantes de IgE en la estructura terciaria de la ovoalbúmina (Mine y Rupa, 2003).

La ovotransferrina representa un 12% de la proteína de la clara, su estructura tiene 686 aminoácidos y un peso de 78 kDa. Su punto isoeléctrico es de 6,1. Posee una función defensiva, ya que se une a los iones de hierro e impide su uso por parte de los microorganismos, presentando un efecto bacteriostático.

La lisozima es una proteína globular que supone un 3,4% del total de proteína de la clara. Está compuesta por 129 residuos, su peso es de 14 kDa y su punto isoeléctrico es 10,7. Pertenece a la familia de las enzimas glicosil-hidrolasas y presenta una potente actividad antimicrobiana.

La seroalbúmina de la yema tiene 592 aminoácidos y un punto isoeléctrico de entre 4,3 y 5,7. Causa reacciones alérgicas mediadas por IgE, tanto por inhalación como por ingesta. Esta glicoproteína de 69 kDa, termolábil, es la responsable del “síndrome ave-huevo”, que implica síntomas respiratorios y digestivos, ya que la sensibilización suele comenzar como reacción a las plumas o la carne de aves y luego se desarrolla hipersensibilidad alimentaria al huevo.

La proteína YGP42 tiene un peso molecular de 35 kDa y está compuesta por 284 aminoácidos. Es el resultado de la escisión de la proteína vitelogenina I y presenta una alta resistencia al calor, pero es sensible a hidrólisis con pepsina (Martos, 2012).

Tabla 1. Principales alérgenos del huevo.

Fracción del huevo	Identificación del alérgeno	Peso molecular (kDa)	% de la proteína total del huevo
Clara			53
Ovomucoide	Gal d 1	28	5,8
Ovoalbúmina	Gal d 2	44	28,6
Ovotransferrina	Gal d 3	78	6,4
Lisozima	Gal d 4	14	1,8
Yema			47
Seroalbúmina	Gal d 5	69	<1
YGP42	Gal d 6	35	<1

Fuente: WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee (Allergen.org)

Para disminuir la sensibilidad a los alérgenos del huevo se han ensayado diferentes estrategias que tienen como finalidad desnaturalizar sus proteínas, tales como tratamientos térmicos y altas presiones, o su degradación por hidrólisis enzimática. Sin embargo, la eficacia de estas estrategias aún no está del todo demostrada (Fisher et al., 2011; Gasilova y Girault, 2015).

1.6 Métodos de detección de alérgenos alimentarios

Las técnicas de detección de alérgenos alimentarios se pueden dividir en dos grupos según la molécula diana a detectar: las basadas en la detección de proteínas (alergénicas o no alergénicas) mediante técnicas inmunoquímicas, electroforesis, cromatografía HPLC y espectrometría de masas; y las basadas en el reconocimiento específico de fragmentos de DNA mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Gasilova y Girault, 2015, Monaci y Visconti, 2010).

Por otra parte, aunque la sensibilidad de las personas alérgicas puede variar, se considera que un buen método analítico debe ser capaz de detectar al menos 1 mg/kg (ppm) del alérgeno (Schubert-Ullrich et al., 2009).

1.6.1 Técnicas inmunoquímicas

Son técnicas en las que se emplean anticuerpos específicos capaces de interactuar con la proteína diana, generalmente una proteína alergénica, frente a la que han sido obtenidos. Pueden usarse anticuerpos monoclonales, muy específicos, que reconocen un solo epítipo de la proteína alergénica, o policlonales, que reconocen distintos epítopos del alérgeno. Estos últimos suelen ser una mejor opción en el caso de que la proteína haya podido sufrir cambios por el procesado aplicado al alimento que hayan afectado a su estructura (Monaci y Visconti, 2010).

1.6.1.1 Técnicas de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) en placa

En estas técnicas se usan anticuerpos específicos marcados con una enzima y la reacción antígeno-anticuerpo se evidencia al añadir un sustrato cromogénico para la enzima que da lugar a un producto coloreado cuya intensidad se puede determinar en un espectrofotómetro de placas.

Existen dos formatos de ELISA en placa: el competitivo y el sándwich. El primero se basa en la competición entre la proteína diana presente en la muestra y la fijada al pocillo por la unión con sus anticuerpos específicos que están marcados con la enzima. En este formato, el color desarrollado es inversamente proporcional a la cantidad de analito de la muestra. En el formato sándwich, la proteína diana es capturada por los anticuerpos inmovilizados en el pocillo y el complejo es detectado a su vez por anticuerpos que también reaccionan con la proteína diana y que están marcados con la enzima. En este caso, el color desarrollado es directamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra.

Desde hace tiempo existen kits comerciales de ELISA capaces de dar una lectura cualitativa o cuantitativa en un tiempo entre 30 y 60 minutos para la mayoría de los alérgenos alimentarios, entre ellos los de leche, soja, cacahuètes, nueces, almendras, huevo y crustáceos (Schubert-Ullrich et al, 2009).

La técnica de ELISA en placa permite detectar y cuantificar la proteína diana en un tiempo relativamente corto. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes, como el requerir personal entrenado para su realización y que en los resultados cuantitativos obtenidos pueden influir de forma importante el tampón de extracción, la composición de la matriz alimentaria y el procesado que se ha dado al alimento (Gasilova y Girault, 2015).

1.6.1.2. Inmunocromatografía de flujo lateral (*lateral flow immunoassay*, LFIA)

En esta técnica, los anticuerpos específicos se encuentran tapizando la superficie de microesferas coloreadas. Estos anticuerpos reaccionan con la proteína diana presente en la muestra, y el complejo formado asciende por capilaridad a lo largo de una membrana que contiene anticuerpos específicos inmovilizados en una fina línea. El complejo es capturado por los anticuerpos inmovilizados y la presencia de la proteína diana en la muestra problema se visualiza por la aparición de una línea coloreada en la membrana. La ausencia de esta banda coloreada indica un resultado negativo.

La LFIA presenta las ventajas de ser un sistema muy sencillo, económico y rápido, pues tarda de 5 a 15 minutos en ofrecer un resultado (Schubert-Ullrich et al., 2009). Se puede realizar una lectura visual, de carácter cualitativo, o hacerla cuantitativa si se utiliza un lector de tiras.

Su facilidad de uso, incluso para los propios consumidores, y su utilidad para detectar rápidamente contaminaciones cruzadas durante el proceso de fabricación ha hecho que se desarrollen muchas alternativas de este tipo de test, hasta el punto de plantearse soluciones tecnológicas como el uso del smartphone para ayudar a los usuarios a interpretar sus resultados con más precisión (Ross et al, 2018). Desde hace años existen en el mercado tiras para varios alérgenos, entre ellos la gliadina, el huevo, la leche o los frutos secos.

1.6.2. Métodos basados en la detección del ADN

1.6.2.1 Técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se basa en la amplificación específica y de forma exponencial de una región de DNA gracias a la enzima polimerasa. Como el ADN es más resistente que las proteínas a las modificaciones por el procesado, esta técnica puede resultar más adecuada para alimentos que han sido procesados con tratamientos tecnológicos severos (Gasilova y Girault, 2015).

El formato que se usa en la detección de alérgenos alimentarios es la PCR en tiempo real (RT-PCR), que permite el análisis de varias muestras a la vez y obtener los resultados en 3-4 horas. No obstante, necesita

operarios cualificados y cierta inversión en reactivos y equipamiento. Además, puesto que no reconoce directamente el alérgeno, tampoco da idea real de su presencia o concentración en la muestra, lo cual puede resultar inadecuado para su uso en la gestión de riesgos de algunos alérgenos en la industria alimentaria (Gasilova y Girault, 2015).

1.6.3. Técnicas de separación

Las técnicas de separación permiten detectar los alérgenos eventualmente presentes en una muestra alimentaria y su cuantificación, obteniendo de cada analito una señal que lo identifica y se puede medir. Las más utilizadas son la cromatografía líquida (LC) combinada con espectrometría de masa y la electroforesis.

1.6.3.1. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La cromatografía líquida se basa en la interacción, según su afinidad, de los componentes de una fase móvil líquida (que vehicula la muestra a analizar) con los de una fase estacionaria presente en la columna cromatográfica, lo que hace que unos compuestos queden retenidos durante más tiempo que otros. El tiempo de retención es característico de cada componente de la muestra, lo que permite su identificación, y el área de cada pico del cromatograma permite cuantificar la concentración de cada componente de la muestra.

Para la detección, pueden usarse diversos sistemas que dependen de la naturaleza de los compuestos a determinar. Entre ellos destacan los detectores de ultravioleta y de fluorescencia, y sobre todo en los últimos años se está extendiendo el empleo de la espectrometría de masas asociada a los sistemas HPLC. Ello se debe a su óptimo rendimiento en cuanto a sensibilidad, precisión y especificidad incluso en matrices procesadas, sumada a su capacidad para detectar simultáneamente varios alérgenos distintos, como se ha experimentado con huevo, leche, soja y cacahuete (Planque et al., 2016; Gasilova y Girault, 2015).

1.6.3.2. Electroforesis

Esta técnica permite separar las distintas proteínas de un alimento, entre ellas los alérgenos, utilizando un gel poroso sobre el cual los compuestos, sometidos a una corriente eléctrica, migran en función de su peso molecular, su carga eléctrica y su estructura espacial. Si se utilizan patrones de los alérgenos de interés, se puede detectar su presencia en la muestra comparando la movilidad de las bandas obtenidas en la muestra.

Para alérgenos, una de las técnicas más utilizadas es la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). El SDS es un detergente aniónico que proporciona a las proteínas la misma densidad de carga negativa por lo que se separan sólo por su tamaño, facilitando su identificación.

Para visualizar los resultados, las bandas de los geles se tiñen con un colorante y usando un escáner puede incluso cuantificarse el alérgeno según la intensidad de color que presenta. La SDS-PAGE, asimismo, puede emplearse como paso previo para la detección y cuantificación por métodos inmunoquímicos como el *western-blotting*, para el cual, tras realizar la electroforesis, las proteínas separadas se transfieren desde el gel a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) o de nitrocelulosa. Esta membrana se incuba por inmersión con anticuerpos específicos contra el alérgeno y después con anticuerpos secundarios marcados con una enzima. La adición de un sustrato da lugar a un producto coloreado en las bandas que contienen el analito diana.

1.6.3.3. Espectrometría de masas (MS)

Ya se indicó antes que esta técnica se está acoplando a los sistemas de cromatografía HPLC. Se basa en la volatilización e ionización de las moléculas orgánicas, de modo que puedan separarse según su masa y su carga, y eso facilite su detección e identificación. Esta técnica permite incluso la discriminación de marcadores peptídicos específicos del alérgeno buscado y la determinación de diferentes alérgenos a la vez. Sin embargo, dada su elevada sensibilidad, puede dar lugar a la aparición de falsos positivos por contaminaciones externas y, además, en determinadas ocasiones, puede registrar interferencias debidas a la elevada cantidad de proteína de algunas matrices alimentarias (Planque et al., 2016).

1.7 Validación y materiales certificados de referencia (CRM)

Lauwaars y Anklam (2004) indicaron la gran importancia que tiene, para el desarrollo de una legislación adecuada y un control de la seguridad alimentaria (y, dentro de ella, la de alérgenos), la existencia de métodos de análisis fiables, sensibles, específicos, precisos y robustos. Así mismo, estos métodos deberían ser sencillos y automatizables (en la medida de lo posible), rápidos y eficientes. Por otra parte, los métodos deberían ser validados conforme a protocolos estandarizados y a las buenas prácticas de laboratorio, de modo que sus resultados puedan ajustarse a estándares internacionales y ser comparables. Se hace además hincapié en la necesidad de usar materiales de referencia (entre ellos los *Certified Reference Material* o CRM) para estas validaciones (AOAC, 2016), pues permiten calibrar el instrumental analítico, estimar mejor la incertidumbre de los resultados y establecer una trazabilidad.

La International Organization for Standardization (ISO) define un material de referencia (RM) como aquel cuyas propiedades tienen unos valores lo bastante homogéneos y bien establecidos como para que sea usado en la calibración de un equipo, la asignación de un valor a un material o la evaluación de un método de medición. Será material de referencia certificado (CRM) si además va acompañado de un documento que acredita que esos valores han sido comprobados por un procedimiento que garantiza la trazabilidad de las unidades en que se expresa y que además indica el grado de incertidumbre de cada valor (expresado en un nivel de confianza).

La norma ISO 17025 sobre acreditación de laboratorios de análisis incluye el uso de los CRM como herramienta para asegurar la calidad de los resultados obtenidos en las determinaciones analíticas (por ejemplo, para evaluar la capacidad de recuperación de un método, su selectividad y especificidad, entre otros).

Al respecto, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) señala como uno de los principales problemas para el desarrollo de test fiables de alérgenos la ausencia de suficientes materiales de referencia certificados para validarlos, sobre todo a la hora de obtener resultados cuantitativos. Actualmente, existen materiales de referencia para alimentos alergénicos como el cacahuete, el huevo y la leche.

Algunas legislaciones, como las de la Unión Europea o Japón (Sakai et al., 2012) exigen que para el correcto etiquetado y los controles oficiales de los alimentos se empleen, siempre que sea posible, métodos validados de análisis. Todo ello implica asegurar que los métodos cumplen criterios de precisión, repetibilidad, reproducibilidad y que se ajustan a las necesidades del objetivo que se persigue con su uso (son competentes para él). El empleo de CRM que cumplan criterios de estabilidad, homogeneidad y que tengan asignado un valor de referencia certificado (con su correspondiente incertidumbre conocida) incrementan la fiabilidad de la evaluación de los métodos que se desarrollan.

En el caso de los alimentos, existen problemas añadidos derivados de la complejidad de las matrices alimentarias donde se encuentran los analitos, del hecho de que determinados procesados industriales pueden modificar la forma en que éstos se encuentran y de que en ocasiones aparecen a niveles de trazas (ppm), todo lo cual dificultan la extracción y recuperación de los analitos para la adecuada determinación con los métodos de análisis. Por eso, es también importante contar con materiales de referencia lo más parecidos posible a las muestras reales (*Food Reference Materials, FRM*) que permitan confirmar la utilidad y la capacidad de los métodos de análisis en distintos tipos de alimentos procesados.

Así, se pueden emplear alimentos modelo específicamente preparados con concentraciones conocidas del alérgeno, mediante su incorporación antes del procesado (conocidos en inglés como *incurred food* o *model food*), o agregar justo antes del análisis el CRM a alimentos donde el analito está ausente (conocido en inglés como *spiked food*) para evaluar el rendimiento de los métodos analíticos. Para evaluar los métodos de detección, la EFSA (2014) recomienda el uso de alimentos modelo, que son aquellos en los que se incorpora como ingrediente el alérgeno y se someten después a un procesado similar al que se usa en la industria alimentaria.

El Reglamento (UE) 2017/625, aplicable desde el pasado mes de diciembre de 2019, enumera como elementos necesarios para la caracterización de un método de análisis los siguientes parámetros: exactitud (veracidad y precisión), aplicabilidad (matriz y gama de concentración), límite de detección, límite de cuantificación, precisión, repetibilidad, reproducibilidad, recuperación, selectividad,

sensibilidad, linealidad e incertidumbre de medición. Además, para la validación de un método, menciona como aceptables los ensayos colectivos (interlaboratorio) o, si se hace en un único laboratorio, que se haga conforme a protocolos o directrices científicos aceptados internacionalmente. Dicho reglamento también indica que serán preferibles los métodos de análisis que puedan aplicarse uniformemente a varios tipos de matrices alimentarias y procesados antes que los válidos sólo para una única matriz o procesado, de ahí la importancia de validar y testar la aptitud de los mismos para diferentes matrices alimentarias y tipos de procesado.

La naturaleza de la matriz alimentaria y el procesado a que ha sido sometida pueden condicionar mucho la adecuada extracción del alérgeno y también su capacidad para interactuar con los anticuerpos en las técnicas inmunoquímicas (Gomaá et al., 2012). Este problema, conocido como efecto matriz (Poms et al., 2004), puede ocurrir con alimentos cuya composición incluye mucha grasa o polifenoles, o con que han sido sometidos a tratamientos que desnaturalizan las proteínas, inducen su agregación o alteran su solubilidad, afectando a los epítomos que son reconocidos por los anticuerpos utilizados en los inmunoensayos.

2. OBJETIVOS

La prevalencia de la alergia al huevo es muy alta sobre todo en la población infantil, lo que ha conducido a que sea uno de los alérgenos de declaración obligatoria en la reciente normativa de etiquetado. El huevo es un ingrediente ampliamente utilizado por sus propiedades nutricionales y tecnológicas, por lo que es muy susceptible de ser causa de contaminaciones cruzadas en la industria alimentaria.

La empresa Zeulab ha desarrollado un test de inmunocromatografía de flujo lateral para la detección de huevo (Proteon Express Egg), basado en la determinación de ovoalbúmina, la proteína más abundante y alergénica de la clara.

Los objetivos de este trabajo han sido:

- Validar el test Proteon Express Egg de lectura visual siguiendo los protocolos establecidos por las normativas internacionales para determinar la sensibilidad, la especificidad, la robustez, así como el efecto matriz y el efecto del procesado.
- Verificar la adaptación del test Proteon Express Egg a un sistema de lectura con un lector óptico.
- Verificar la aplicabilidad del test Proteon Express Egg para detectar la presencia de huevo en superficies de trabajo y en aguas de lavado.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

En este trabajo se han utilizado dos test: Proteon Egg Express y Proteon Egg ELISA, ambos basados en la determinación de ovoalbúmina y desarrollados y comercializados por la empresa Zeulab. El test Proteon Egg Express es un ensayo inmunocromatográfico y el test Proteon Egg ELISA es un ELISA tipo sándwich.

Los alimentos incluidos en este estudio han sido:

- Ingredientes básicos y alimentos crudos o procesados de diferentes marcas comerciales, que fueron adquiridos en establecimientos de alimentación convencionales.
- Alimentos modelo (salchicha, pan y paté) preparados en la planta piloto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza, sin huevo y con diferentes concentraciones de huevo en polvo, según el procedimiento detallado en De Luis et al. (2008). El huevo se añadió a los alimentos como ingrediente antes de someterlos a un procesamiento térmico de pasteurización (salchicha), horneado (pan) o esterilización en autoclave (paté).

Además, se ha utilizado el material de referencia certificado RM NIST 8445, que está constituido por huevo en polvo (ver Anexo 1).

Para realizar la lectura objetiva cuantitativa de las tiras inmunocromatográficas se ha usado el lector de tiras IRIS, desarrollado por Zeulab.

3.2. Métodos

3.2.1 Preparación de muestras del material de referencia y de ovoalbúmina

La muestra de RM NIST 8445 se preparó pesando el huevo en polvo y añadiendo agua destilada hasta una concentración de 10 mg/ml, siguiendo las instrucciones del fabricante (ver Anexo 1). Un procedimiento similar se usó para la ovoalbúmina (referencia A5253, Sigma Aldrich), que se disolvió con tampón fosfato dipotásico 8 mM, fosfato monopotásico 1,68 mM, NaCl 1,5 M pH 7,4 (PBS) a una concentración de 10 g/ml. En ambos casos, se prepararon diversas soluciones de menor concentración diluyendo las muestras en tampón de extracción del kit Proteon Express Egg de Zeulab (ZE/PROV/BE125).

3.2.2 Extracción de las muestras de alimentos

Para los alimentos sólidos, se pesó $1,0 \pm 0,01$ g de alimento dentro de una bolsa tipo Stomacher y se añadieron 10 ml de tampón de extracción. A continuación, se homogeneizó el contenido manualmente presionando durante dos minutos. Esta bolsa tiene en su interior un filtro que retiene el material particulado, de modo que permite recoger el extracto libre de partículas utilizando una pipeta, evitando

que ésta se obstruya. Para los alimentos líquidos, se procedió de forma similar, pero introduciendo 1 ml del alimento en la bolsa y agregando 9 ml de tampón de extracción. Los extractos que no iban a usarse inmediatamente se mantuvieron refrigerados a 4 °C.

3.2.3. Preparación de muestras de alimentos adicionadas con huevo

Para determinar el efecto de la matriz alimentaria, los extractos obtenidos de determinados alimentos (batido de cacao, helado de arroz, zumo de naranja, licor de café, aliño de ensalada, yogur de soja, pasta sin huevo, bebida de soja, salchicha tipo Frankfurt, paté y una fórmula infantil con arroz) se adicionaron con diferentes volúmenes de la suspensión del material de referencia RM NIST 8445 para obtener el equivalente a una concentración de 1 y 2 ppm de huevo en el alimento.

Para determinar el efecto del procesado se analizaron alimentos modelo (salchichas, pan de molde y paté) sin y con distintas concentraciones de huevo en polvo como ingrediente, que habían sido elaborados siguiendo un proceso similar al que se usa en la industria alimentaria y que se describe por Luis et al. (2008).

3.2.4 Muestreo de superficies

Para detectar el alérgeno en superficies de melamina y acero inoxidable, sobre encimeras de estos materiales perfectamente limpias y aclaradas con agua destilada se colocaron ventanas para delimitar áreas de 10 x 10 cm, como recomienda la Federación Española de Alimentos y Bebidas (FIAB, 2013), y se siguió un procedimiento parecido al descrito en Galán-Malo et al. (2017). El alérgeno se preparó suspendiendo el huevo en polvo RM NIST 8544 en tampón de extracción a concentraciones de 2, 2'5, 5 y 10 µg/ml, y se dispensó un volumen de 50 microlitros por ventana con una micropipeta, de modo que hubiese tres ventanas con cada concentración en cada superficie. Tras dejar secar las superficies a temperatura ambiente, se procedió a la recuperación del alérgeno mediante arrastre con un hisopo humedecido en un tubo Eppendorf con 500 µl de tampón de extracción. Tras la recuperación, se introdujo el hisopo en el mismo tubo, removiendo y escurriendo para que el alérgeno pasase al tampón. Luego, se tomaron 150 µl del mismo, se depositaron en un tubo y se introdujo la tira inmunocromatográfica. Este ensayo se realizó manteniendo el hisopo en el tampón de extracción 30 minutos u omitiendo este paso de incubación.



Figura 2. Instrucciones para un análisis de superficies con LFIA. Fuente: guion de Proteon Express (Zeulab)

3.2.5. Preparación de aguas de aclarado

Para comprobar la utilidad del test en aguas de aclarado que se usan de forma habitual en la industria alimentaria, se prepararon soluciones de hidróxido sódico y de ácido clorhídrico a concentraciones de 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 y 1 N. Con las concentraciones en las que se visualizó la línea control, se prepararon muestras a las que se añadió 1 ppm de huevo en polvo RM NIST 8445.

3.2.6. Técnica de inmunocromatografía de flujo lateral (LFIA)

La detección de huevo en alimentos se ha realizado con el test Proteon Egg Express, siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 3). Es un test de inmunocromatografía de tipo sándwich que detecta de forma específica la ovoalbúmina. En estos ensayos se utilizan anticuerpos primarios específicos que reconocen epítomos de la proteína alergénica diana y que se insolubilizan tanto en la línea test como en la superficie de microesferas de látex coloreadas de rojo. Para el control, se usan anticuerpos anti-internalina unidos a microesferas de látex coloreadas de azul, que interaccionan en la línea control con la internalina inmovilizada en la tira inmunocromatográfica.

El procedimiento del ensayo consiste en introducir la tira inmunocromatográfica en un tubo que contiene 200 µl del extracto del alimento preparado con el tampón de extracción que está incluido en el test. Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente para que la muestra ascienda por capilaridad a lo largo de la tira, se saca ésta y se hace inmediatamente la lectura del test, tanto de forma visual subjetiva como mediante una medida objetiva con el lector de tiras.

En la lectura visual de los resultados, si aparece únicamente la línea control azul, el resultado se considera negativo. Si además aparece una línea test rosa, el resultado es positivo. Si no aparece la línea control azul, el test no es válido, ya que indica que la muestra no ha llegado al final de la tira o que la reacción no se ha producido correctamente.



Figura 3. Secuencia de instrucciones para realizar un análisis de alimentos con LFIA. *Fuente: Zeulab*

Para la lectura objetiva del resultado, se usó el lector de tiras IRIS. En el soporte del lector, se coloca la tira y se introduce en el interior, donde hay una cámara que toma una imagen de la misma. El software utiliza el componente verde del sistema RGB y traduce su intensidad a una señal digital que para cada píxel tiene un valor entre 0 y 255 (cada píxel está formado por 8 bits). El resultado es una gráfica en la cual se aprecian la línea base y los picos de las señales de la línea test y la línea control (Figura 4). El programa calcula la

altura y el área de los picos. Para este trabajo, se utilizó la señal de la altura de los picos. Esta señal se ha correlacionado con la concentración de huevo en polvo, de modo que, por encima de determinado valor de la señal, la muestra se considera positiva. Se calculó cuál era el ruido de fondo de las muestras negativas, estableciendo un umbral por encima del cual la muestra se considera positiva.

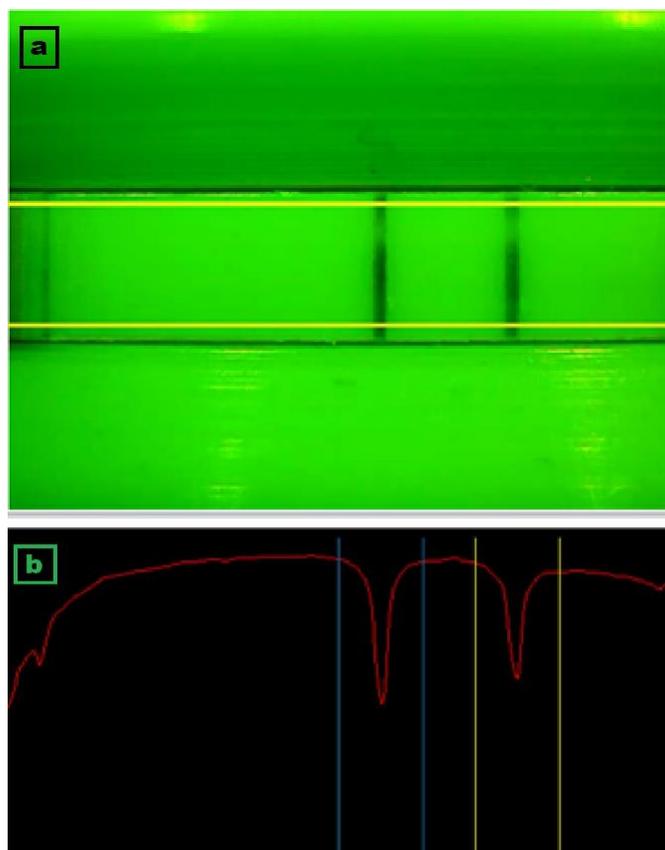


Figura 4. (a) Imagen captada con el lector IRIS de una tira inmunocromatográfica con un resultado positivo. (b) Gráfica realizada por el lector en la que se aprecian el pico de la línea control (entre líneas azules) y el de la línea test (entre líneas amarillas).

3.2.7 Técnica de ELISA en placa

El test Proteon Egg ELISA, de tipo sándwich, se basa en la unión de la ovoalbúmina con los anticuerpos específicos de captura fijados en el pocillo del test. En la siguiente etapa, los pocillos se incuban después con anticuerpos específicos anti-ovoalbúmina conjugados con la enzima peroxidasa. Al agregar un sustrato cromógeno para dicha enzima, se genera un producto coloreado cuya intensidad de color puede medirse con un espectrofotómetro a 450 nm. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de ovoalbúmina presente. El test Proteon Egg ELISA tiene un límite de detección (LOD) de 0,05 ppm y un límite de cuantificación (LOQ) de 0,18 ppm de huevo en polvo.

El procedimiento de trabajo con el test Proteon Egg ELISA requiere dispensar por duplicado (100 μ l en cada pocillo) los estándares y las muestras problema e incubar a temperatura ambiente 30 minutos. Después, tras lavar tres veces con el tampón de lavado, se dispensan en cada pocillo 100 μ l de una solución

de anticuerpos anti-ovoalbúmina conjugados con peroxidasa y se incuba 30 minutos. Tras lavar de nuevo tres veces con el tampón de lavado, se añaden 100 µl del sustrato de la peroxidasa, que contiene tetrametilbencidina (TMB), y se incuba otros 30 minutos. La reacción enzimática se detiene añadiendo 50 µl de solución stop que contiene ácido sulfúrico. La lectura de los pocillos se realiza en un lector de placas a 450 nm. El procedimiento de la técnica del ELISA se muestra en la figura 5.

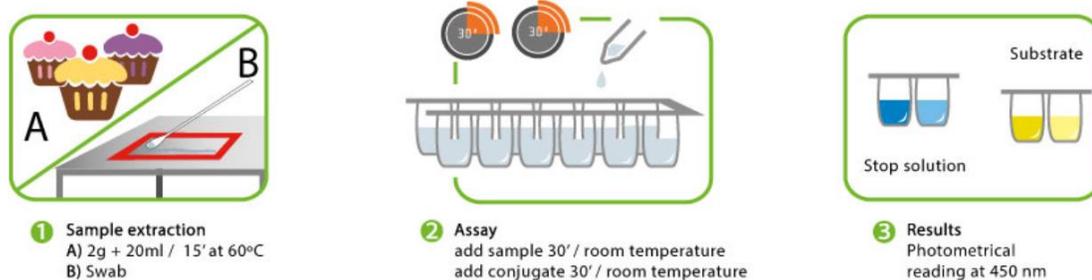


Figura 5. Esquema de realización de una técnica de ELISA en placa de tipo sándwich. *Fuente: Zeulab*

Con los valores de las absorbancias obtenidas con los patrones, se elabora una curva de calibración (Figura 6) y con la ecuación resultante se estima la cantidad del alérgeno contenido en las muestras problema, por interpolación de su valor de absorbancia.

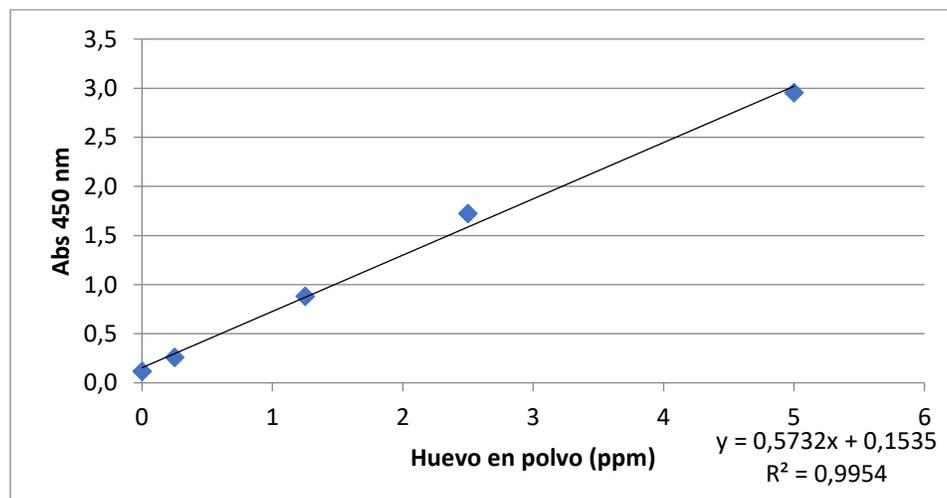


Figura 6. Curva de calibración obtenida con un blanco y cuatro patrones de distinta concentración de huevo en polvo (calibrados frente al material RM NIST 8445) obtenida con el test Proteon Egg ELISA.

En este trabajo, todas las muestras analizadas por inmunocromatografía se analizaron mediante test ELISA en placa. Este test permitió obtener una estimación cuantitativa de la concentración de ovoalbúmina presente en las muestras.

3.2.8 Validación

La validación de los test ha incluido la determinación de los parámetros de sensibilidad, especificidad, robustez, así como del efecto prozona.

3.2.8.1 Sensibilidad y probabilidad de detección (POD)

Para determinar la sensibilidad del test, se analizaron muestras del material de referencia RM-NIST 8445 a concentraciones de 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1 y 10 µg/ml.

Con ellas se testaron las réplicas necesarias para aplicar el método estadístico “Probability of Detection” (POD), indicado por Wehling et al. (2011), que está diseñado para validar métodos de análisis cualitativos binarios, que sólo pueden dar dos tipos de resultado: positivo o negativo. Para cada concentración, el valor de la POD se calcula dividiendo el número total de muestras que dan positivo (x) entre el total de muestras analizadas (N), $POD = x/N$. Acorde con este método, el límite de detección (LD) es la concentración más baja de analito cuyo valor de la POD es igual a 1 con un intervalo de confianza del 95 % (0,91-1,00). Para obtenerlo, se hicieron entre 20 y 50 réplicas de cada concentración.

El intervalo de confianza del valor de la POD, con sus correspondientes límites inferior (LCL) y superior (UCL), se estimaron según se indica en la tabla siguiente:

Tabla 2. Cálculo de los intervalos de confianza en el método POD. Fuente: Wehling et al. (2011).

Cálculo del intervalo de confianza para la POD		
Si $x = 0$	Si $x = N$	Si $0 < x < N$
POD = 0	POD = 1	$POD = \frac{x}{N}$
LCL = 0	LCL = $N/(N + 3,8415)$	$LCL = \frac{x + 1,9207 - 1,9600 \sqrt{x - \frac{x^2}{N} + 0,9604}}{N + 3,8415}$
UCL = $3,8415/(N + 3,8415)$	UCL = 1	$UCL = \frac{x + 1,9207 + 1,9600 \sqrt{x - \frac{x^2}{N} + 0,9604}}{N + 3,8415}$
Donde: N es el número total de muestras; x son las muestras positivas; LCL es el límite inferior del intervalo de confianza y UCL es el límite superior del intervalo de confianza		

3.2.8.2 Especificidad

Para determinar la especificidad del test se analizaron 30 ingredientes crudos que se seleccionaron siguiendo las recomendaciones establecidas para la validación de test inmunoquímicos diseñados para la detección de huevo (Abbott et al., 2010; AOAC, 2012).

Se determinó también el efecto de la matriz alimentaria utilizando varias muestras de alimentos adicionados con el material de referencia RM NIST 8445 justo antes del ensayo. Además, se determinó el efecto del procesado utilizando alimentos modelo (salchichas, pan de molde y paté) que contenían distintas concentraciones de huevo en polvo.

3.2.8.3. Estudio de la robustez del test

La robustez es la capacidad del test para proporcionar los mismos resultados cuando hay pequeñas variaciones en las condiciones experimentales del procedimiento. En este estudio se variaron el volumen

de tampón en la extracción (8, 10 y 11 ml), el volumen de muestra en la extracción (0,8 y 1,2 ml), el volumen de extracción tomado para el análisis (150 y 300 μ l) y el tiempo de incubación (2, 5 y 15 minutos),

3.2.8.4. Estudio del efecto prozona

El efecto prozona es un problema que presentan los ensayos de inmunocromatografía de flujo lateral de tipo sándwich cuando en la muestra existen concentraciones muy altas del analito. Este efecto se debe a la saturación de los sitios de unión de los anticuerpos en las microesferas y en la línea test, lo que impide la formación del sándwich en la línea test, dando un resultado falso negativo. Para caracterizar este efecto, se analizaron concentraciones de 100, 1.000, 10.000 y 100.000 ppm de huevo en polvo en tampón de extracción.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La industria alimentaria demanda test de detección de alérgenos que sean sensibles y específicos para ser usados en el autocontrol de materias primas, superficies y producto final. Además, los test deben cumplir otros requisitos que se consideran de gran relevancia, como el ser rápidos y sencillos. La rapidez facilita la toma de decisiones con la menor demora posible durante el proceso de producción. La sencillez de uso permite realizar análisis en la propia empresa sin necesidad de disponer de un laboratorio y que el test pueda ser utilizado por personal que no necesita una cualificación específica como analista.

La técnica de inmunocromatografía cumple todos estos requisitos, por lo que se ha convertido en la más ampliamente utilizada para el control rutinario de alérgenos en la industria alimentaria. En este trabajo se muestran los resultados obtenidos en la validación de un test de inmunocromatografía para la detección de huevo basado en la detección de ovoalbúmina.

4.1. Determinación de la especificidad y efecto matriz

La especificidad del test se determinó ensayando una amplia batería de ingredientes básicos, así como diversos alimentos procesados comerciales y alimentos modelo.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de especificidad del test, obtenidos en el análisis de treinta ingredientes que se seleccionaron siguiendo las recomendaciones establecidas por la AOAC (2012) para la validación de test inmunoquímicos diseñados para la detección de huevo. Como puede observarse, todos los ingredientes analizados dieron un resultado negativo. También se testó una muestra de linaza, no incluida en la tabla, que dio un resultado no válido. Este hecho se debe, presumiblemente, al elevado contenido graso del extracto del alimento, que impide el ascenso por capilaridad de las microesferas para alcanzar la línea control. No obstante, dado que la semilla de lino es un ingrediente que normalmente se usa en proporciones muy pequeñas en los productos alimentarios, es de esperar que su presencia no cause este problema. Además, siempre existe la posibilidad de delipidar aquellos extractos de alimentos en cuya etiqueta se incluya la linaza como ingrediente antes de analizarlos.

Por otra parte, en el estudio de la especificidad se analizó también una docena de alimentos en los que el huevo no estaba incluido en la lista de ingredientes. De este grupo, tres alimentos (helado, pasta y aliño de ensalada) eran matrices recomendadas por la AOAC para ser ensayadas en los test diseñados para la detección de huevo; dos eran alimentos modelo (salchicha y paté) y el resto matrices de interés por diversos motivos, como tener un pH ácido (zumos), contener polifenoles y alcohol (licor de café), tratarse de alimentos dirigidos a poblaciones de especial riesgo (fórmulas infantiles) o ser alérgenos de declaración obligatoria según la normativa de la Unión Europea (altramuces). Todas estas muestras dieron un resultado negativo cuando se analizaron con el test Proteon Egg ELISA.

La ausencia de reacciones cruzadas o interferencias de todos los ingredientes y productos alimentarios analizados indica que el test Proteon Egg Express es apto para el análisis de una gran variedad de matrices alimentarias.

Tabla 3. Ingredientes básicos y alimentos procesados analizados con el test Proteon Egg Express. Se analizaron dos extractos de cada muestra, dando ambos un resultado negativo. Los alimentos en rojo corresponden a las matrices recomendadas por la AOAC (2012).

Ingrediente	Visual	Lector	Ingrediente	Visual	Lector
Almendra	N	< U	Vinagre de Módena	N	< U
Avellana	N	< U	Coco rallado	N	< U
Nuez	N	< U	Kiwi	N	< U
Nuez macadamia	N	< U	Aliño de ensalada	N	< U
Nuez pecán	N	< U	Cacao	N	< U
Pistacho	N	< U	Helado de arroz	N	< U
Piñones	N	< U	Pasta sin huevo	N	< U
Pipas girasol	N	< U	Leche UHT	N	< U
Pipas calabaza	N	< U	Aliño ensalada (sésamo/soja)	N	< U
Sésamo	N	< U	Batido chocolate	N	< U
Semillas amapola	N	< U	Batido de soja	N	< U
Maizena	N	< U	Yogur soja	N	< U
Trigo sarraceno	N	< U	Pate 0%	N	< U
Centeno	N	< U	Salchicha 0%	N	< U
Avena	N	< U	Zumo de manzana	N	< U
Cebada	N	< U	Fórmula infantil arroz	N	< U
Guisante	N	< U	Fórmula infantil soja	N	< U
Cacahuete	N	< U	Altramuces	N	< U
Lenteja	N	< U	Zumo de naranja	N	< U
Garbanzos	N	< U	Zanahoria	N	< U
Alubia roja	N	< U	Licor de café	N	< U

N = negativo; U = señal umbral.

En este trabajo, además de la determinación de la sensibilidad del test mediante lectura visual subjetiva, se llevaron a cabo pruebas para la aplicación al test de un lector óptico IRIS, diseñado para dar una lectura objetiva del test. En primer lugar, se aprovechó el análisis de especificidad para establecer un umbral de señal a partir del cual se establece una señal positiva. Este umbral de detección se calculó a partir del promedio de la señal obtenida en todas las matrices negativas que se muestran en la Tabla 3 más tres

veces la desviación estándar de dichos valores. Así, por encima de ese valor, fijado en 4,9 unidades arbitrarias, se consideró que la muestra es positiva, mientras que por debajo de ese valor la señal sería debida al ruido de fondo y no a la presencia de analito (alérgeno), y por tanto la muestra sería negativa.

4.2 Determinación del límite de detección y del efecto prozona

Conforme al método de probabilidad de detección (POD), el límite de detección (LD) se sitúa en la concentración más baja de analito cuyo valor de probabilidades es 1 o próximo a 1, aplicando un intervalo de confianza del 95 %. Por encima de esa concentración la probabilidad de que el test dé un resultado positivo es también uno y por debajo esa probabilidad desciende hasta llegar a aquella concentración donde el test no da señal. En el rango de concentración entre el LD y la concentración a la que el valor de la POD es cero, existe un estrecho rango de concentraciones donde hay cierto grado de incertidumbre, ya que, con el mismo nivel de alérgeno, el test arrojará en ocasiones un resultado positivo y en otras un resultado negativo. Para determinar el valor del LD con precisión, la AOAC (2012) indica que es necesario estudiar ese intervalo con un número superior de réplicas del test que en el resto de concentraciones, por ello, en este estudio, para los niveles de 0,5 y 1 ppm de huevo en polvo NIST 8445 el número de replicas analizadas fue de 40 y 50, respectivamente. Así, en el análisis de 31 réplicas se obtuvo un valor de la POD de 1 para 2 ppm de huevo en polvo, mientras que para 1 ppm se obtuvo un valor de la POD de 0,9 y para 0,5 ppm, un valor de 0,6, según se puede ver en la Tabla 4.

Con estos resultados, se determinó que el límite de detección se situaba en 1 ppm, y con dicha concentración se procedió a realizar posteriormente el estudio de la capacidad de detección en distintas matrices alimentarias.

Tabla 4. Resultados visuales de los ensayos realizados con el test Proteon Egg Express, usando como matriz alimentaria el material de referencia de huevo en polvo RM NIST 8445.

ppm ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	N	x	POD	LCL	UCL
100.000	5	0	0,0	0,0	0,4
10.000	5	5	1,0	0,6	1,0
1.000	6	6	1,0	0,6	1,0
100	6	6	1,0	0,6	1,0
10	35	35	1,0	0,9	1,0
5,0	31	31	1,0	0,9	1,0
2,0	31	31	1,0	0,9	1,0
1,0	50	47	0,9	0,8	1,0
0,5	40	25	0,6	0,4	0,8
0,0	20	0	0,0	0,0	0,2

N = número de repeticiones del test; x = número de positivos; POD = probabilidad de detección al 95% de confianza; LCL = límite inferior del intervalo de confianza de POD; UCL = límite superior del intervalo de confianza de POD.

En la Tabla 4 se recogen también los resultados de los ensayos realizados para determinar el efecto prozona. En los test inmunocromatográficos, este efecto supone que a elevadas concentraciones de analito se pueda obtener un resultado falso negativo por saturación de los sitios de unión de los anticuerpos que tapizan las microesferas y la línea de test. En este estudio se observó que un contenido en huevo en polvo superior a 100 g/L (100.000 ppm) puede causar este efecto, de modo que, para muestras sospechosas de tener esa concentración o superior, sería aconsejable hacer una dilución decimal adicional para verificar que el resultado negativo es correcto y no debido de la saturación del test.

En ensayos realizados con ovoalbúmina pura comercial, los resultados obtenidos indicaron que el límite de sensibilidad se situó en torno a 0,03 ppm, aunque debido a que el número de replicas es muy pequeño no se calculó el valor de la POD (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de los ensayos con el test Proteon Egg Express, usando como matriz alimentaria ovoalbúmina pura comercial.

ppm ($\mu\text{g/ml}$)	N	x	Positivo (%)
1.000	2	2	100
100	2	2	100
10	2	2	100
0,500	4	4	100
0,250	2	2	100
0,125	2	2	100
0,062	2	2	100
0,031	2	2	100
0,016	12	6	50
0,008	2	1	50

N = número de repeticiones del test; x = número de positivos

A efectos de presentación de resultados, la sensibilidad de este test para huevo puede expresarse referida a concentración de ovoalbúmina, de proteína total de huevo o de huevo entero. El programa para la gestión de riesgos Voluntary Incidental Trace Allergen Labelling (VITAL) ha establecido para los alérgenos unas dosis inductoras de referencia expresadas en proteína total del alimento (Taylor et al., 2018). En el caso del huevo, esa dosis, por debajo de la cual menos de un 1% de las personas alérgicas sufrirían una reacción adversa, sería de 0,2 mg de proteína total, que en una ración ingerida de 100 g supondría un nivel de 2 ppm (Allergen Bureau, 2019).

En el caso del test Proteon Egg Express, considerando que el material de referencia utilizado es huevo entero en polvo, que contiene un 48 ± 1 % de proteína (según calibración de RM NIST 8445, ver Anexo 1), el LD obtenido de 1 ppm de huevo en polvo correspondería a $0,48 \pm 0,01$ ppm de proteína de huevo. Así, el límite de detección del test Proteon Egg Express confiere seguridad a los consumidores alérgicos considerando los datos de referencia del programa VITAL.

Con respecto a los resultados obtenidos con la ovoalbúmina, el LD de 0,03 ppm equivaldría a 0,1 ppm de proteína de huevo, ya que esta proteína supone un 29 % de la proteína total del huevo (Mine y Yang, 2008). Esta diferencia de sensibilidad según se analice con ovoalbúmina pura o con huevo en polvo puede deberse o bien a que la extracción del analito en el huevo en polvo no es tan completa como la proteína purificada, o bien que el procesado térmico de la elaboración del huevo en polvo haya podido desnaturalizar parcialmente la proteína, reduciendo la sensibilidad de detección del test.

Por otra parte, la sensibilidad obtenida con el test Proteon Egg Express es mejor que la indicada en otros inmunoensayos de flujo lateral comercializados para huevo por otras empresas, que oscila entre 1 ppm (Bioavid Diagnostics/r-Biopharm, Regabio, Microbiologique) y 5 ppm (CrystalChem, Morinaga Institute of Biological Science, Neogen).

En la Tabla 6 se muestra la determinación de la probabilidad de detección con los resultados obtenidos con el lector IRIS utilizando el huevo en polvo RM NIST 8445. Como puede observarse, la concentración más baja con un valor de la POD de 1,0 fue 2 ppm de huevo en polvo. Para la concentración de 1 ppm la probabilidad de detección bajó a 0,7. Los resultados muestran que, aunque hay un ligero descenso en la sensibilidad, el test es capaz de identificar correctamente un resultado positivo. Además, resulta sumamente interesante y ventajoso disponer de un dispositivo que pueda ofrecer un resultado objetivo, independiente de la lectura subjetiva del operario.

Tabla 6. Resultados obtenidos con el lector IRIS de los ensayos realizados con el test Proteon Egg Express, usando como matriz alimentaria el material de referencia de huevo en polvo RM NIST 8445.

ppm ($\mu\text{g/ml}$)	Señal promedio	SD	N	x	POD	LCL	UCL
100.000			5	0	0,0	0,0	0,4
10.000	10,1	1,6	5	5	1,0	0,6	1,0
1.000	28,4	5,2	6	6	1,0	0,6	1,0
100	34,4	7,0	6	6	1,0	0,6	1,0
10	19,6	3,5	31	31	1,0	0,9	1,0
5,0	13,7	2,8	31	31	1,0	0,9	1,0
2,0	8,2	1,7	31	31	1,0	0,9	1,0
1,0	5,1	1,3	46	33	0,7	0,6	1,0
0,5	3,4	1,1	37	3	0,1	0,0	0,2
0,0			20	0	0,0	0,0	0,2

SD = desviación estándar de la señal; N = número de repeticiones del test; x = número de positivos; POD = probabilidad de detección al 95% de confianza; LCL = límite inferior del intervalo de confianza de POD; UCL = límite superior del intervalo de confianza de POD.

Por otra parte, se estudió la posible influencia de la matriz alimentaria en la detección de ovoalbúmina con el test Proteon Egg Express. Para ello, se analizaron muestras de alimentos que habían dado un resultado negativo, a las que se añadió 1 ppm de huevo en polvo (RM NIST 8445) justo antes del ensayo.

Como se muestra en la Tabla 7, todas las muestras analizadas dieron un resultado positivo, lo que indica que el test es capaz de detectar el analito en todas las matrices, tanto con interpretación visual como empleando el lector. Además, se comprobó mediante el test Proteon Egg ELISA el porcentaje de recuperación en cada matriz. Para ello, se analizaron los extractos con huevo en polvo añadido comparando la cantidad de ppm de huevo obtenida respecto a una muestra de tampón con la misma cantidad de huevo en polvo añadido, obteniéndose recuperaciones entre el 70 % y el 135%.

Tabla 7. Resultados de los análisis de matrices alimentarias negativas a las que se añadió 1 ppm de huevo en polvo RM NIST 8445.

Matriz	VISUAL	LECTOR							
		R (%)	Señal*	SD	N	x	POD	LCL	UCL
Zumo de naranja	P	135	7,5	1,4	20	20	1,0	0,8	1,0
Licor de café	P	118	4,9	2,6	20	20	1,0	0,8	1,0
Salchicha sin huevo	P	87	8,0	1,9	20	20	1,0	0,8	1,0
Pasta sin huevo	P	126	8,1	0,9	3	3			
Fórmula infantil con arroz	P	70	12,0	6,1	3	3			
Batido de cacao	P	106	9,4	2,6	3	3			
Aliño de ensalada	P	129	9,1	2,6	2	2			
Paté sin huevo	P	70	8,5	0,1	2	2			
Helado de arroz	P	128	9,4	0,9	2	2			
Yogurt de soja	P	125	8,8	3,6	2	2			

P = positivo; R (%) = porcentaje de recuperación calculado con respecto a la misma cantidad de huevo en polvo añadida en tampón de extracción; N = número de repeticiones del test; x = número de positivos; POD = probabilidad de detección al 95% de confianza; LCL = límite inferior del intervalo de confianza de POD; UCL = límite superior del intervalo de confianza de POD. * Se muestra el promedio de las señales obtenidas con el lector IRIS y su correspondiente desviación estándar (SD).

Por otra parte, una de las dificultades a las que se enfrenta el análisis de alérgenos en alimentos es la desnaturalización de la proteína diana por efecto del procesado industrial, lo que podría alterar su reconocimiento por los anticuerpos utilizados en los ensayos inmunoquímicos, dando como resultado un falso negativo. Por ello, en este trabajo se han analizado alimentos modelo, elaborados en la planta piloto de la Universidad de Zaragoza, que contenían diferentes cantidades de huevo en polvo como ingrediente y que habían sido procesados bajo unas condiciones equivalentes a las que se utilizan en la industria alimentaria. Ello ha permitido valorar la funcionalidad del test Proteon Egg Express en las condiciones reales de un procesado industrial.

Los alimentos modelo analizados han sido salchichas Frankfurt, pan y paté que habían sido sometidos a procesados térmicos de diferente intensidad, en concreto pasteurización, horneado y esterilización, respectivamente. Los resultados obtenidos muestran que el porcentaje de huevo en polvo requerido para obtener un resultado positivo por el test Proteon Egg Express dependía de la intensidad del tratamiento térmico aplicado, siendo esa concentración mayor en el caso del paté (500 ppm), seguido del pan (10 ppm) y de la salchicha (5 ppm) en los resultados visuales (Tabla 8). Si se utiliza el lector, los límites de

detección de estos productos se sitúan en 10 ppm para salchicha, 20 ppm para pan de molde y 500 para paté.

La menor capacidad de detección del test en el análisis de alimentos sometidos a tratamientos térmicos intensos hace que no esté recomendado para este tipo de productos, ya que inducen la desnaturalización y/o agregación de la proteína diana afectando a su reactividad con los anticuerpos usados en el ensayo. Hay que tener en cuenta que la ovoalbúmina, que es la proteína diana en el test Proteon Egg Express, es menos termorresistente que otras proteínas del huevo, como es el caso del ovomucoide, por lo cual se altera más su conformación por el procesado térmico. Así, para alimentos esterilizados, quizá sería más recomendable la utilización de inmunoensayos diseñados para la detección de ovomucoide, pese a que el huevo tiene mucha menos cantidad de éste (5,8% de la proteína total) que de ovoalbúmina (28,6%). Hay que señalar, no obstante, que la detección de huevo cuando se usan test inmunoquímicos basados en la determinación de ovomucoide se ve también afectada por la intensidad del tratamiento térmico aplicado a los alimentos (De Luis et al., 2008; De Luis, 2009).

Tabla 8. Resultados de los análisis de los alimentos modelo elaborados con diferentes concentraciones de huevo en polvo.

Huevo en polvo (ppm)	n	LECTOR			VISUAL
		Señal promedio	SD	Positivos (%)	Positivos (%)
Salchicha					
0	2			0	0
5	2	4,5	0,9	50	50
10	2	5,5	0,3	100	100
20	2	9,6	1,4	100	100
Pan de molde					
0	2			0	0
10	2	2,1		100	100
20	2	7,5		100	100
40	2	9,7		100	100
80	2	14,5		100	100
Paté					
0	1			0	0
100	1	2,1		0	0
500	1	4,9		100	100
5000	1	6,1		100	100

SD = desviación estándar, n = repeticiones del test

4.3 Estudio de la robustez del test

La robustez es la capacidad de un test para dar un resultado fiable cuando hay pequeñas variaciones en el procedimiento de ensayo. Los resultados obtenidos en el estudio de la robustez del test Proteon Egg

Express utilizando una muestra de zumo de naranja a la que se añadió 1 ppm de huevo en polvo RM NIST 8445 se muestran en la Tabla 9, donde se incluyen todas las modificaciones experimentales introducidas.

Como puede verse, se obtuvo un resultado positivo en todos los análisis realizados, fuese modificando el volumen de alícuota de muestra tomado para la extracción, el volumen de tampón de extracción utilizado en la misma o el volumen de extracto tomado para introducir la tira del test. En la variable del tiempo de incubación de la tira, se observó una respuesta positiva a tiempos de lectura de 5 y 15 minutos, pero la respuesta fue negativa cuando el tiempo se redujo a 2 minutos. No obstante, dado que el tiempo de incubación recomendado en las instrucciones del kit es de 10 minutos, una disminución tan pronunciada, cinco veces inferior, resultaría inusual que se produjera en la práctica.

Tabla 9. Resultados de la determinación de la robustez del test Proteon Egg Express realizada con una muestra de zumo de naranja que contenía 1 ppm de huevo en polvo RM NIST 8445.

Volumen de alícuota de muestra		Volumen de tampón de extracción		Volumen de extracto para el ensayo		Tiempo de incubación de la tira	
ml	Resultado	ml	Resultado	µl	Resultado	Minutos	Resultado
0,8	Positivo	8	Positivo	150	Positivo	2	Negativo
1,0	Positivo	10	Positivo	200	Positivo	5	Positivo
1,2	Positivo	11	Positivo	300	Positivo	15	Positivo

Se hicieron dos repeticiones del test (N = 2) para cada una de las condiciones recogidas en la tabla.

4.4 Análisis de aguas de aclarado

Existe la posibilidad de que se produzca una contaminación cruzada en la industria alimentaria por la presencia de alérgenos arrastrados por las aguas que se emplean para la limpieza e higienización de los equipos y superficies. Estas aguas pueden contener restos de compuestos como el hidróxido sódico o el ácido clorhídrico, que pueden comprometer la eficacia del test. Por ello, en este trabajo se ha realizado el análisis de aguas que contenían diferentes cantidades de estas sustancias utilizando el test Proteon Egg Express.

En primer lugar, se comprobó a partir de qué concentración de dichos compuestos el ensayo muestra un resultado válido (aparece la línea azul de control), siendo 0,5 N para el hidróxido sódico y 0,25 N para el ácido clorhídrico, como se muestra en la Tabla 10. Para las concentraciones a las que el test dio un resultado válido, se comprobó su capacidad para detectar 1 ppm de huevo en polvo añadido al agua, obteniendo resultados diferentes para los dos compuestos de limpieza (Tabla 10).

En estos ensayos, el test arrojó un resultado válido en aguas con concentraciones de 0,05 N y 0,1 N de ácido clorhídrico. Sin embargo, en las muestras de agua que contenían 0,1 N y 0,25 N de hidróxido sódico sólo se observó un resultado válido en la mitad de los ensayos. No obstante, habría que incluir un mayor número de réplicas para calcular de forma fiable la probabilidad de detección en esos casos.

Tabla 10. Resultados del análisis de aguas con diferentes concentraciones de hidróxido sódico y ácido clorhídrico, en ausencia y presencia de 1 ppm de huevo en polvo.

Aguas sin huevo en polvo				
Compuesto añadido	Concentración (M)	N	x	Resultado
NaOH	1,00	2	0	No válido
	0,50	2	0	No válido
	0,25	2	0	Negativo
	0,10	2	0	Negativo
	0,05	2	0	Negativo
HCl	1,00	2	0	No válido
	0,50	2	0	No válido
	0,25	2	0	No válido
	0,10	2	0	Negativo
	0,05	2	0	Negativo

Aguas con 1 ppm de huevo en polvo				
Compuesto añadido	Concentración (M)	N	x	
NaOH	0,25	2	1	
	0,10	2	1	
HCl	0,10	2	2	
	0,05	2	2	

N = número de repeticiones del test; x = número de positivos

4.5 Análisis de superficies

Como en el caso de las aguas de aclarado, para la industria alimentaria es muy importante asegurarse de que en las superficies de trabajo no quedan restos de alérgenos que pueden causar una contaminación cruzada de otros alimentos. De ahí el interés que presenta la aplicación del test Proteon Egg Express a este tipo de análisis, no sólo para los elaboradores de alimentos en fábricas, sino también en entornos de restauración colectiva y, en particular, en lugares donde el consumidor es población de especial riesgo, como son los comedores infantiles de colegios o campamentos (Ortiz et al., 2018; Galán-Malo et al., 2019). Como los materiales más habituales usados en las superficies en estos establecimientos son el acero inoxidable y la melamina, en este trabajo se incluyeron ambos.

Los resultados obtenidos mostraron que la recuperación de alérgeno con el hisopado, calculada con un test Proteon Egg ELISA, se situó entre un 17 % y un 31 % de la cantidad depositada en la superficie. En la Tabla 11, el kit Proteon Egg Express proporciona una alta probabilidad de detección de la presencia de huevo a partir de 0,25 µg en superficies de melamina (POD = 0,9) y a partir de 0,5 µg en superficies de acero inoxidable (POD = 1).

Tabla 11. Resultados del análisis de hisopado de superficies de 100 cm² sobre las que se depositaron distintas cantidades de huevo en polvo disuelto en tampón de extracción, utilizando el test Proteon Egg Express.

Melamina							
Huevo en polvo (µg)	Coefficiente de variación (%)	N	x	POD	LCL	UCL	
0,100	36	20	2	0,1	0,1	0,3	
0,125	32	20	3	0,2	0,1	0,4	
0,250	37	20	18	0,9	0,7	0,9	
0,500	18	6	6	1,0	0,6	1,0	
Acero inoxidable							
Huevo en polvo (µg)	Coefficiente de variación (%)	N	x	POD	LCL	UCL	
0,100	71	20	0	0,0	0	0,2	
0,125	45	20	4	0,2	0,1	0,4	
0,250	29	20	13	0,7	0,4	0,9	
0,500	20	6	6	1,0	0,6	1,0	

N = número de repeticiones del test; x = número de positivos; POD = probabilidad de detección al 95% de confianza; LCL = límite inferior del intervalo de confianza de POD; UCL = límite superior del intervalo de confianza de POD.

En este trabajo, se ha llevado a cabo también un estudio comparativo de la capacidad de recuperación de alérgeno del hisopo, utilizando el que se incluye en el test Proteon Egg Express (de poliéster) con otros de diferentes materiales (rayón y viscosa) de otros test comerciales. Para ello, se empapó cada hisopo con 50 µl de una solución con 2,5 ppm de huevo en polvo (RM NIST 8445) y se sumergió el hisopo en 450 µl de tampón de extracción, agitando para favorecer la transferencia. Las muestras se analizaron a dos tiempos: inmediatamente tras sumergir el hisopo y tras mantenerlo 30 minutos en el tampón de extracción. Las muestras se analizaron utilizando el test Proteon Egg ELISA.

Los resultados obtenidos mostraron que el material del hisopo influye considerablemente en la transferencia del alérgeno al tampón de extracción en el que se sumerge, como se puede ver en la Figura 7. La utilización del hisopo de poliéster, proporcionado en el kit Proteon Egg Express, fue el que dio los mejores resultados de transferencia del alérgeno al tampón.

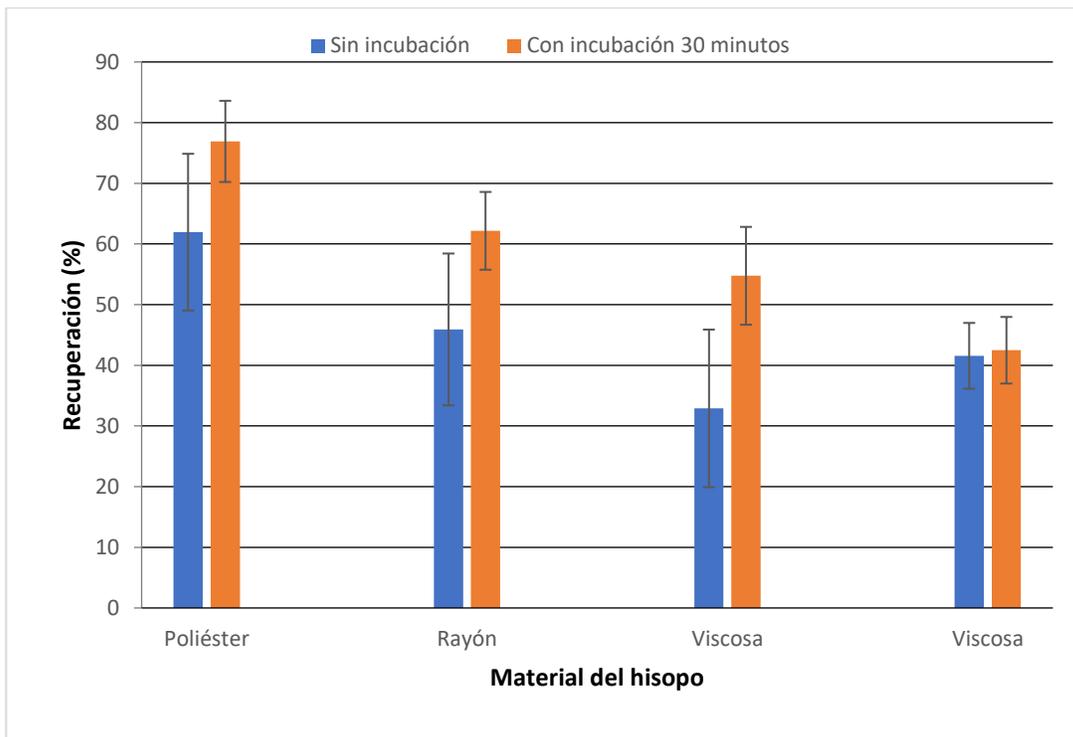


Figura 7. Estudio comparativo de la transferencia de huevo utilizando hisopos de distinto material, justo tras la inmersión en el tampón (tiempo = 0) y tras 30 minutos ($t = 30$). Los valores corresponden a la media de dos experimentos más la desviación estándar. Los hisopos de viscosa proceden de dos proveedores diferentes.

Por otra parte, el tiempo de inmersión del hisopo en el tampón también influyó notablemente en el rendimiento de extracción, obteniéndose mejores resultados a los 30 minutos que al extraerlo justo tras la inmersión. También en estas condiciones los mejores resultados fueron los obtenidos con el hisopo de poliéster donde se alcanzó una recuperación próxima al 80%.

En el análisis de superficies, es preciso, por tanto, subrayar la importancia de utilizar el hisopo proporcionado en el test Proteon Egg Express y de mantener inmerso el hisopo en el tampón durante 30 minutos para obtener una óptima transferencia del alérgeno.

5. CONCLUSIONES

- El test inmunocromatográfico Proteon Egg Express, basado en la detección de ovoalbúmina, presenta una alta especificidad y sensibilidad, siendo capaz de detectar la presencia de huevo en polvo a partir de 1 ppm en una amplia variedad de matrices alimentarias.
- El test Proteon Egg Express presenta un efecto prozona a concentraciones de huevo en polvo iguales o superiores a 100.000 ppm, dando como resultado un falso negativo. Por ello, en alimentos sospechosos de tener una elevada concentración de huevo se recomienda diluir la muestra para verificar el resultado.

- La interpretación de los resultados del test Proteon Egg Express mediante el lector óptico IRIS presenta la ventaja de ofrecer una lectura objetiva, pero resulta algo menos sensible que la lectura visual.
- Los tratamientos tecnológicos aplicados durante el procesado de los alimentos que contienen huevo como ingrediente disminuyen la cantidad de ovoalbúmina inmunorreactiva, siendo la disminución mayor cuanto mayor es la intensidad del tratamiento aplicado.
- El test Proteon Egg Express es un método robusto, que no se ve afectado por las potenciales variaciones que podrían ocurrir durante la realización del ensayo.
- El test Proteon Egg Express puede aplicarse al análisis de aguas de limpieza que contienen una concentración de hidróxido sódico hasta 0,25 N o de ácido clorhídrico hasta 0,1 N, sin que afecte a su sensibilidad.
- El test Proteon Egg Express ha mostrado un buen rendimiento para recuperar proteínas de huevo mediante hisopado en superficies de trabajo de acero inoxidable y melamina. La mayor recuperación se obtiene usando un hisopo de poliéster y manteniéndolo inmerso en el tampón de extracción durante 30 minutos.

Conclusions

- *The Proteon Egg Express immunochromatographic test, based on the detection of ovalbumin, has a high specificity and sensitivity, being able to detect the presence of egg powder from 1 ppm in a wide variety of food matrices.*
- *The Proteon Egg Express test has a prozone effect at egg concentrations of 100,000 ppm or higher, resulting in a false negative. Therefore, it is recommended to dilute the sample to verify the result in foods suspected of having a high egg concentration.*
- *The result's interpretation of the Proteon Egg Express test using the IRIS optical reader has the advantage of offering objective reading, but is less sensitive than visual reading.*
- *Technological treatments applied to process foods containing egg decrease the amount of immunoreactive ovalbumin, the higher the intensity of the treatment, the greater the decrease.*
- *The Proteon Egg Express test is a rugged method, which is unaffected by potential variations that could occur during the test.*
- *The Proteon Egg Express test can be applied to cleaning water analysis containing sodium hydroxide (up to 0,25 N) or hydrochloric acid (0,1 N) without affecting its sensitivity.*
- *The Proteon Egg Express test has shown good performance for recovering egg proteins by swabbing on stainless steel and melamine work surfaces. The greatest recovery is obtained using a polyester swab and keeping it immersed in extraction buffer for 30 minutes.*

6. BIBLIOGRAFÍA

Abbott, M., Hayward, S., Ross, W., Godefroy, S.B., Ulberth, F. et al. (2010). "Appendix M: Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices". *Journal of AOAC International*, **93**:442–450.

Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (2013). "Declaración Pública sobre la Alergia a los Alimentos y la Anafilaxia". Disponible en <https://www.eaaci.org/attachments/FoodAllergy&AnaphylaxisPublicDeclarationSP.pdf> [Último acceso: 26-02-2020]

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) (2007). "Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre Alergias Alimentarias". *Revista del Comité Científico*, **5**:19-76.

Allen, K. J. y Taylor, S. L. (2018). "The Consequences of Precautionary Allergen Labeling: Safe Haven or Unjustifiable Burden?". *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **6(2)**:400-407.

Allergen Bureau (2019). "Food Industry Guide to the Voluntary Incidental Trace Allergen Labelling (VITAL®) Program Version 3.0". Disponible en: http://allergenbureau.net/wp-content/uploads/2019/10/Food-Industry-Guide-to-the-Voluntary-Incidental-Trace-Allergen-Labelling-VITAL-Program-Version-3.0_Web.pdf [Último acceso: 23-02-2020]

AOAC (2016). "Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC Official Methods of Analysis". Disponible en: http://www.eoma.aoc.org/app_f.pdf [Último acceso: 14-04-2020]

AOAC (2012). "Appendix M: Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices. Food Allergen Community Guidance AOAC Official Methods of Analysis". Disponible en: http://www.eoma.aoc.org/app_m.pdf [Último acceso: 14-04-2020]

Comisión del Códex Alimentarius (2019). "Proyecto de código de prácticas sobre la gestión de los alérgenos alimentarios por parte de los operadores de empresas de alimentos". Informe de la 51.^a reunión del Comité del Codex sobre higiene de los alimentos, REP20/FH, Apéndice II, pp. 25-46. Disponible en: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeeting%252FCX-712-51%252FReport%252FREP20_FHs.pdf [Último acceso: 8-04-2020]

De Luis, R., Mata, L., Estopañán, G., Lavilla, M., Sánchez, L. y Pérez, M.D. (2008). "Evaluation of indirect competitive and double antibody sandwich ELISA tests to determine β -lactoglobulin and ovomucoid in model processed foods". *Food and Agricultural Immunology*, **19(4)**:339-350.

De Luis, R. (2009). “Estudio mediante técnicas inmunoquímicas del efecto del procesado en algunas proteínas alergénicas y recombinantes de los alimentos”. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria, Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos.

European Food Safety Authority (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies) (2014). “Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes”. *EFSA Journal*, **(11)**:3894.

EUROPREVALL (2010). “The Prevalence, Cost, and Basis of Food Allergy across Europe: Final activity report”. Coordinadora: Mills, Clare (Institute of Food Research, Reino Unido). Disponible en: <https://cordis.europa.eu/project/id/514000/reporting/es> [Último acceso: 24-02-2020]

Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas, FIAB (2013). “Guía de gestión de alérgenos en la industria alimentaria”. Disponible en <https://www.aepnaa.org/recursos/aepnaa/pdf/guia-gestion-alergenos-industria.pdf> [Último acceso: 26-02-2020]

Fisher, H.R., Du Toit, G. y Lack, G. (2011). “Specific oral tolerance induction in food allergic children: is oral desensitisation more effective than allergen avoidance? A meta-analysis of published RCTs”. *Archives of Disease in Childhood*, **96(3)**:259-264.

Fox, M., Mugford, M., Voordouw, J., Cornelisse-Vermaat, J., Antonides, G. et al. (2013). “Health sector costs of self-reported food allergy in Europe: a patient-based cost of illness study”. *European Journal of Public Health*, **23(5)**:757–762.

Galán-Malo, P., López, M., Ortiz, J.C., Pérez, M.D., Sánchez, L., Razquin, P. y Mata, L. (2017). “Detection of egg and milk residues on working surfaces by ELISA and lateral flow immunoassay tests”. *Food control*, **74**:45-53.

Galán-Malo, P. Ortiz, J.C., Carrascona, V., Razquin, P., Mata, L. (2019). “A study to reduce the allergen contamination in food-contact surfaces at canteen kitchens”. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, **17**:100165.

Gasilova, N. y Girault, H.H. (2015). “Bioanalytical methods for food allergy diagnosis, allergen detection and new allergen Discovery”. *Bioanalysis*, **7(9)**:1175–1.

Gomaa, A., Ribereau, S. y Boye, J. (2012). “Allergens in a Multiple Allergen Matrix and Study of the Impact of Thermal Processing”. *Journal of Nutrition and Food Sciences*, **S9**:001.

Huopalahti, R., López-Fandiño, R., Anton, M. y Schade, R. (2007). “Bioactive egg compounds”. Editorial Springer: Berlín (Alemania).

- International Organisation for Standard ISO/IEC 17025 (2017). "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración". ISO, Ginebra (Suiza).
- Instituto de Estudios del Huevo (2009). "El gran libro del huevo". Dirección y coordinación: María del Mar Fernández y Amparo Lobato. Editorial Everest: León (España).
- Jacobsen, B. Hoffmann-Sommergruber, K., Have, T.T., Foss, N., Briza, P. et al. (2008). "The panel of egg allergens, Gald 1-Gald 5: Their improved purification and characterization". *Molecular Nutrition & Food Research*, **52(2)**:S176-185.
- Lauwaars, M. y Anklam, E. (2004). "Method validation and reference materials". *Accreditation and Quality Assurance*, **9**:253–258.
- Martos Sevilla, G. (2012). "Alérgenos del huevo: digestión gastrointestinal, inmunorreactividad y mecanismos de desensibilización". Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Física Aplicada.
- Mine, Y. y Rupa, P. (2003). "Fine mapping and structural analysis of immunodominant IgE allergenic epitopes in chicken egg ovalbumin". *Protein Engineering, Design and Selection*, **16(10)**:747-752.
- Mine, Y. y Yang, M. (2008). "Recent Advances in the Understanding of Egg Allergens: Basic, Industrial, and Clinical Perspectives". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**:4874–4900.
- Monaci, L. y Visconti, A. (2010). "Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives". *Trends in Food Science & Technology*, **21**:272-283.
- Ortiz, J.C., Galán-Malo, P., García-Álvarez, M., Mateos, A., Ortiz-Ramos, M., Razquin, P. y Mata, L. (2018). "Survey on the occurrence of allergens on food-contact surfaces from school canteen kitchens". *Food Control*, **84**:449-454.
- Pajno, G.B., Cox, L., Caminiti, L. et al. (2014). "Oral immunotherapy for treatment of immunoglobulin E-mediated food allergy: the transition to clinical practice. *Pediatric Allergy, Immunology and Pulmonology*, **27(2)**: 42–50.
- Planque, M., Arnould, T., Dieu, M., Delahaut, P., Renard, P. y Gillard, N. (2016). "Advances in ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for sensitive detection of several food allergens in complex and processed foodstuff". *Journal of Chromatography A*, **1464**:115–123.
- Poms, R.E., Klein, C.L. y Anklam, E. (2004). "Methods for allergen analysis in food: a review". *Food Additives and Contaminants*, **21(1)**: 1-31.

Protudjer, J.LP., Jansson, S-A., Heibert Arnlin, M., Bengtsson, U., Kallström-Bengtsson, I. et al. (2015). "Household Costs Associated with Objectively Diagnosed Allergy to Staple Foods in Children and Adolescents". *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, **3(1)**:68-75.

Reglamento (CE) 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. Diario Oficial de la Unión Europea, L 31/1–24.

Reglamento (UE) 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor. Diario Oficial de la Unión Europea, L 304/18-63.

Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de marzo de 2017 relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios". Diario Oficial de la Unión Europea, L 95/1-142.

Ross, G.M.S., Bremer, M.G.E.G. y Nielen, M.W.F. (2018). "Consumer-friendly food allergen detection: moving towards smartphone-based immunoassay". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **410**:5353–5371.

Sakai, S., Adachi, R., Akiyama, H. y Teshima, R. (2012) "Validation of Quantitative and Qualitative Methods for Detecting Allergenic Ingredients in Processed Foods in Japan". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**:5675–5680.

Schubert-Ullrich, P., Rudolf, J., Ansari, P., Galler, B., Führer, M., Molinelli, A. y Baumgartner, S. (2009). "Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **395**:69–81.

Seweryn, E., Królewicz, E., Stach, K. y Kustrzeba-Wójcicka, I. (2018). "Nutritional and allergenic properties of hen eggs". *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, **72**:205-214.

Sicherer, S.H. y Sampson, H.A. (2018). "Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management". *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **141(1)**:41-58.

Taylor, S.L., Baumert, J.L., Kruizinga, A.G, Remington, B.C., Crevel, R.W.R. et al. (2014). "Establishment of reference doses for residues of allergenic foods: report of the vital expert panel". *Food and Chemical Toxicology*, **63**:9-17.

Taylor, S.B., Christensen, G., Grinter, K., Sherlock, R. y Warren, L. (2018). "The Allergen Bureau VITAL Program". *Journal of AOAC International*, **101(1)**:77-82.

Voordouw, J., Antonides, G., Fox, M., Cerecedo, I., Zamora, J. et al. (2016). "The direct and indirect costs associated with food hypersensitivity in households: a study in the Netherlands, Poland and Spain". *Applied Studies in Agribusiness and Commerce*, **10(2-3)**:107-118.

Wehling, P. LaBudde, R.A., Brunelle, S.L. Nelson, M.T. (2011). "Probability of Detection (POD) as a statistical model for the validation of qualitative methods". *Journal of AOAC International*, **94(1)**:335-47.



National Institute of Standards & Technology

Report of Investigation

Reference Material 8445

Spray-Dried Whole Egg for Allergen Detection

This Reference Material (RM) is intended primarily for use in evaluating test kits for determination of the presence of allergenic egg proteins. This material provides a common matrix to the allergen research community, who may wish to conduct studies using a single broadly available material. RM 8445 was prepared by representatives from the Food Allergy Research and Resource Program (FARRP), Food Products Association (FPA), Health Canada, Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), and U.S. Food and Drug Administration (FDA) Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). This group is the sole authority for all of the information provided in this report, including the reference value and other technical information. A unit of RM 8445 consists of a single bottle containing 5 g of material.

Reference Mass Fraction Value: A reference mass fraction value for protein is provided in Table 1. A reference value is a noncertified value that is the best estimate of the true value based on available data; however, the value does not meet the NIST criteria for certification [1] and is provided with an associated uncertainty that may not include all sources of uncertainty. The reference value in this material is the mean of three measurements; the associated uncertainty is the expanded uncertainty at the 95 % level of confidence [2,3]. Values are reported on an “as-received” basis in mass fraction units [4].

Expiration of Value Assignment: RM 8445 is valid, within the measurement uncertainty specified, until **15 June 2024**, provided the RM is handled and stored in accordance with the instructions given in this report (see “Instructions for Storage and Use”). The report is nullified if the RM is damaged, contaminated, or otherwise modified.

Maintenance of RM Value Assignment: The characterizing agencies will monitor representative samples of this RM over the period of its value assignment. If substantive technical changes occur that affect the value assignment before the expiration of this report, NIST will notify the purchaser. Registration (see attached sheet or register online) will facilitate notification.

The protein in RM 8445 was determined by the Department of Food Science and Technology, University of Nebraska (Lincoln, NE).

Technical and support aspects involved in the preparation and issuance of this RM were coordinated by K.E. Sharpless, currently in the NIST Special Programs Office.

Statistical analysis was provided by J.H. Yen of the NIST Statistical Engineering Division.

Support aspects involved in the issuance of this RM were coordinated through the NIST Office of Reference Materials.

Carlos. A Gonzalez, Chief
Chemical Sciences Division

Steven J. Choquette, Director
Office of Reference Materials

Gaithersburg, MD 20899
Report Issue Date: 21 March 2019
Report Revision History on Last Page.

NOTICE AND WARNING TO USERS

Warning: For laboratory use only. Not for human or animal consumption. This material is meant to serve as a reference material for comparing analytical methods with the following understanding: (1) that the use of eggs from different sources may have different compositions, and (2) if the material is subjected to various forms of preparation/processing, (i.e., baking, boiling, frying) the composition and properties of the material may change.

INSTRUCTIONS FOR STORAGE AND USE⁽¹⁾

Storage: This RM, in an unopened container, should be stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a desiccator or sealed plastic container that contains desiccant.

The unopened bottle should be allowed to warm to room temperature ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) immediately prior to use. The egg powder should not be irradiated or treated in any way that might alter the proteins present. A homogeneous stock solution containing an egg powder concentration of 100 mg/mL in phosphate -buffered saline (PBS) should be prepared using a Potter-Elvehjem tissue grinder. This stock solution should be further diluted in PBS for use in evaluation of test kits and treated as a sample according to recommended extraction procedures. Samples containing $<1\text{ }\mu\text{g/mL}$ egg powder not subjected to extraction may require the addition of an additive such as 0.1 % Tween-20 or bovine serum albumin.

PREPARATION AND ANALYSIS

Source and Preparation of Material: Spray-dried whole egg powder (Henningsen Foods, Omaha, NE) without additives or stabilizers was packaged by FDA CFSAN in plastic, screw-cap bottles, each containing approximately 5 g of material.

Analysis: Nitrogen was measured using a Leco protein analyzer (Dumas) on two sets of samples, with analysis of sets separated by several months. Results were converted to protein using a conversion factor of 6.25.

Table 1. Reference Mass Fraction Value for Protein in RM 8445^(a)

	Mass Fraction (%)
Total Protein	48±1

^(a)The reference concentration value, expressed as a mass fraction on an as-received basis, is the mean of two sets of analyses for nitrogen by the University of Nebraska's Department of Food Science and Technology. The uncertainty in the reference value, calculated according to the method described in the ISO/JCGM Guides [2,3], is expressed as an expanded uncertainty, U . The expanded uncertainty is calculated as $U = kuc$, where uc is intended to represent, at the level of one standard deviation, the within- and between-set component of uncertainty. The coverage factor (k) is determined from the Student's t -distribution corresponding to the appropriate associated degrees of freedom and approximately 95 % confidence. The measurand is the total mass fraction of total protein as determined by the methods indicated and the value listed is metrologically traceable to the SI unit of mass fraction in percent on an as-received basis.

⁽¹⁾Certain commercial equipment, instruments, or materials are identified in this report in order to adequately specify the experimental procedure. Such identification does not imply recommendation or endorsement by the National Institute of Standards and Technology, nor does it imply that the materials or equipment identified are necessarily the best available for the purpose.

REFERENCES

- [1] May, W.; Parris, R.; Beck II, C.; Fassett, J.; Greenberg, R.; Guenther, F.; Kramer, G.; Wise, S.; Gills, T.; Colbert, J.; Gettings, R.; MacDonald, B.; *Definition of Terms and Modes Used at NIST for Value-Assignment of Reference Materials for Chemical Measurements*; NIST Special Publication 260-136 U.S. Government Printing Office: Washington, DC (2000); available at <https://www.nist.gov/srm/upload/SP260-136.PDF> (accessed Mar 2019).
- [2] JCGM 100:2008; *Evaluation of Measurement Data - Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*; (GUM 1995 with Minor Corrections), Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM) (2008); available at https://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf (accessed Mar 2019); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results*; NIST Technical Note 1297, U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1994); available at <https://www.nist.gov/pml/nist-technical-note-1297> (accessed Mar 2019).
- [3] Levenson, M.S.; Banks, D.L.; Eberhardt, K.R.; Gill, L.M.; Guthrie, W.F.; Liu, H.-K.; Vangel, M.G.; Yen, J.H.; Zhang, N.F.; *An Approach to Combining Results From Multiple Methods Motivated by the ISO GUM*; J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol., Vol. 105; p. 571 (2000).
- [4] Thompson, A.; Taylor, B.N.; *Guide for the Use of the International System of Units (SI)*; NIST Special Publication 811; U.S. Government Printing Office: Washington, DC (2008); available at <https://www.nist.gov/pml/pubs/sp811/index.cfm> (accessed Mar 2019).

Report Revision History: 21 March 2019 (Change of expiration date; editorial changes); 30 December 2013 (Change of expiration date; editorial changes); 17 January 2008 (Original report date).
--

Users of this RM should ensure that the Report of Investigation in their possession is current. This can be accomplished by contacting the SRM Program: telephone (301) 975-2200; fax (301) 948-3730; e-mail srminfo@nist.gov; or via the Internet at <https://www.nist.gov/srm>.