



Red Nacional de Laboratorios
Oficiales de Análisis de Alimentos

**BUENAS PRÁCTICAS DE
LABORATORIO Y REQUISITOS
PARA LA *DETERMINACIÓN DE*
*GLUTEN EN ALIMENTOS***

Este documento guía proporciona recomendaciones y tiene como objetivo ser una herramienta práctica en la que todo el personal del laboratorio encuentre respuestas concretas en cuanto a una buena gestión dentro del cual debe realizarse el análisis de los alimentos libres de gluten.

Índice de contenidos

- 1. Reglas Básicas sobre Higiene y Seguridad en el Trabajo**
- 2. Generalidades**
- 3. El Gluten**
- 4. Características que debe reunir de un método analítico para la detección de gluten**
- 5. Enzimoimmunoensayo – ELISA**

Consideraciones generales

Patrones y Material de Referencia

Preparación y conservación de la muestra pre – análisis

Extracción y detección

Lavado de Material de Vidrio

1. REGLAS BASICAS SOBRE HIGIENE Y SEGURIDAD EN EL TRABAJO

Las reglas básicas aquí indicadas son un conjunto de prácticas de sentido común realizadas en forma rutinaria.

El elemento clave es la actitud proactiva hacia la seguridad y la información que permita reconocer y combatir los riesgos presentes en el laboratorio. Será fundamental la realización meticulosa de cada técnica analítica, pues ninguna medida, ni siquiera un equipo excelente puede sustituir el orden y el cuidado con que se trabaja.

- Se deberá conocer la ubicación de los elementos de seguridad en el lugar de trabajo, tales como: matafuegos, salidas de emergencia, mantas ignífugas, lavaojos, gabinete para contener derrames, accionamiento de alarmas, etc.
- No se permitirá comer, beber, fumar o maquillarse.
- No se deberán guardar alimentos de consumo personal en el laboratorio, ni en las heladeras que contengan drogas.
- Se deberá utilizar vestimenta apropiada para realizar trabajos de laboratorio y cabello recogido.
- Es imprescindible mantener el orden y la limpieza.
- Las manos deben lavarse cuidadosamente después de cualquier manipulación en el laboratorio y antes de retirarse del mismo.
- Se deberán utilizar guantes apropiados para evitar el contacto con sustancias químicas.
- No pipetear con la boca.

- Siempre que sea necesario proteger los ojos y la cara de salpicaduras o impactos se utilizarán anteojos de seguridad u otros dispositivos de protección. Cuando se manipulen productos químicos que emitan vapores o puedan provocar proyecciones, se evitará el uso de lentes de contacto.
- No se deben bloquear las rutas de escape o pasillos con equipos, máquinas u otros elementos que entorpezcan la correcta circulación.
- Todo material corrosivo, tóxico, inflamable, oxidante, radiactivo, explosivo o nocivo deberá estar adecuadamente etiquetado.
- Los ensayos que produzcan gases, vapores, humos o partículas, aquellas que pueden ser riesgosas por inhalación deben llevarse a cabo bajo campana.
- Se deberá verificar la ausencia de vapores inflamables antes de encender una fuente de ignición. No se operará con materiales inflamables o solventes sobre llama directa o cerca de las mismas. Para calentamiento, sólo se utilizarán resistencias eléctricas o planchas calefactoras blindadas. Se prestará especial atención al punto de inflamación y de autoignición del producto.
- El material de vidrio roto no se depositará con los residuos comunes. Será conveniente ubicarlo en cajas resistentes, envuelto en papel y dentro de bolsas plásticas.
- Será necesario que todo recipiente que hubiera contenido material inflamable, y deba ser descartado sea vaciado totalmente, escurrido, enjuagado con un solvente apropiado y luego con agua varias veces.
- Está prohibido descartar líquidos inflamables o tóxicos o corrosivos o material biológico por los desagües de las piletas, sanitarios o recientes comunes para residuos. En cada caso se deberán seguir los procedimientos establecidos para la gestión de residuos.

- Al almacenar sustancias químicas considere que hay cierto número de ellas que son incompatibles pues almacenadas juntas pueden dar lugar a reacciones peligrosas.
- No almacene en estantes sobre mesadas sustancias corrosivas, hágalo en estantes bajo mesadas y en caso de ácidos o álcalis concentrados (mayor de 2N) deben ser mantenidas dentro de lo posible en bandejas de material adecuado.
- Los laboratorios contarán con un botiquín de primeros auxilios con los elementos indispensables para atender casos de emergencia.

2. GENERALIDADES

La **enfermedad celíaca** (EC) es una patología gastrointestinal de origen autoinmune que consiste en una intolerancia permanente al gluten. El **gluten** es un conjunto de proteínas vegetales de reserva presentes en los cereales. Las proteínas tóxicas para los pacientes celíacos son proteínas del gluten denominadas prolaminas (fracciones del gluten solubles en alcohol), que se encuentran en el trigo, la cebada, el centeno y la avena. Las prolaminas reciben un nombre diferente dependiendo del cereal del que procedan: gliadinas (trigo), hordeínas (cebada), secalinas (centeno), aveninas (avena).

Existen dudas en cuanto a la toxicidad de la avena, ya que este cereal tiene un contenido en prolamina inferior al de los cereales antes mencionados. Es deseable, por tanto, la ampliación de conocimientos en cuanto a la posible toxicidad de la avena. Por otro lado, estudios recientes también confirman que las gluteninas (fracciones del gluten insolubles en alcohol) son tóxicas para los celíacos.

La ingesta de gluten por el enfermo celíaco provoca una lesión progresiva de las vellosidades intestinales, cuya consecuencia más importante es la disminución de la absorción de nutrientes.

La sintomatología de esta enfermedad es amplia y variada: diarrea crónica, pérdida de peso, distensión abdominal, vómitos, dolor abdominal recurrente, cambios de carácter, falta de apetito, anemia y retraso del crecimiento en niños. Sin embargo, los síntomas pueden estar ausentes, lo que dificulta el diagnóstico.

Si es problemático realizar un tratamiento correcto, suficientemente seguro, de la enfermedad celíaca, las dificultades aumentan si no se dispone de instrumentos adecuados para medir esas cantidades de gluten permitidas. Por lo tanto, parece justificada la necesidad de disponer de métodos suficientemente validados que permitan una cuantificación fiable de gluten en los alimentos, así como que su límite de detección sea lo suficientemente bajo para su aplicación en caso de variación de las cifras umbral consideradas seguras.

3. EL GLUTEN

El gluten constituye las proteínas de reserva, insolubles en agua o sales, del trigo y otros cereales, denominadas, en el caso del trigo, gliadina y glutenina, ambas involucradas en la enfermedad celíaca.

Estas proteínas tienen un elevado contenido de prolina (Shewry, 1995), por lo que se conocen, en conjunto, como prolaminas y se identifican habitualmente con técnicas electroforéticas.

El término gluten es científicamente impreciso y su definición varía, incluso cuando se aplica a alimentos exentos de gluten. Actualmente, el Codex Alimentarius define al gluten como *"una fracción proteica del trigo, centeno, cebada, avena, de sus variedades híbridas y sus derivados, al que algunas personas son intolerantes, y que es insoluble en agua y en cloruro de sodio (NaCl) 0,5 M"*

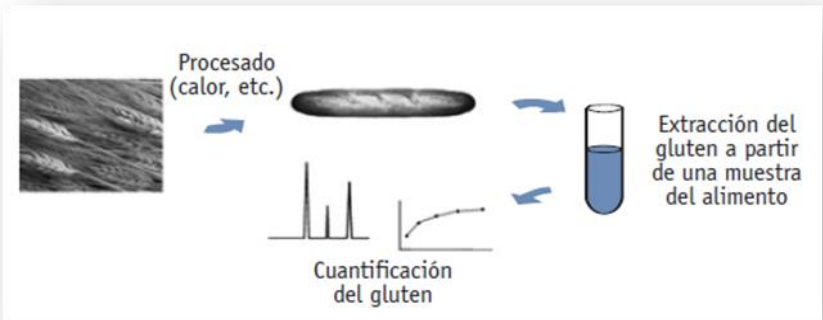
Fracción		Trigo	Centeno	Cebada	Avena	Maiz
Globulina		Edestina				
Albúmina		Leucosina				
Gluten	Prolamina	Gliadina	Secalina	Hordeína	Avenina	Zeina
	Glutelina	Glutenina	Secalinina	Hordenina	Avenalina	Zeanina

Existen al menos cuatro clases de gliadinas monoméricas: α , β , γ y ω -gliadina. La identificación de cuál es la secuencia responsable de la acción nociva de las distintas prolaminas es uno de los mayores retos, y siguen haciéndose esfuerzos para obtener una información precisa al respecto.

En la elaboración de alimentos existen diversos puntos críticos susceptibles de provocar la contaminación con gluten de los alimentos cuando en la misma manufactura o cadena de producción se elaboran productos con y sin gluten.

El consumo de productos manufacturados conlleva asumir riesgos potenciales a los pacientes celíacos, ya que el gluten puede ser añadido a un producto como ingrediente, aditivo, o bien éste puede contenerlo por razones tecnológicas del proceso de elaboración. Por lo tanto el gluten puede estar presente no sólo en los productos elaborados a partir de las harinas de trigo, cebada, centeno y avena, como pan, pastas, pasteles y galletas, sino también en embutidos y derivados cárnicos, salsas, aperitivos, golosinas, comidas preparadas, etc. e, incluso, en ciertos medicamentos como excipiente.

El proceso completo de la cuantificación del gluten presente en un alimento puede resumirse en el esquema:



4. CARACTERÍSTICAS QUE DEBE REUNIR DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETECCIÓN DE GLUTEN

- *Sensibilidad.* Capacidad de detectar gluten hasta concentraciones de partes por millón (ppm). 1 ppm equivale a 1 miligramo de gluten por kilogramo de alimento.
- *Selectividad.* El método debe detectar exclusivamente el gluten y no otros compuestos con propiedades similares. En la detección de gluten se utilizan anticuerpos, elementos de reconocimiento muy específicos. A pesar de ello, se conocen algunas sustancias que interfieren en la detección.
- *Fiabilidad.* Los métodos deben estar diseñados para que los resultados analíticos puedan ser reproducibles en distintos laboratorios.
- *Rápido.* Un tiempo corto de análisis posibilita abaratar el costo del análisis y poder realizar gran número de análisis por día.
- *Validado.* El método analítico de detección de gluten debe estar validado. Para poder validar el método de detección se necesita un material de referencia certificado.

5. ENZIMOINMUNOENSAYO - ELISA

La técnica ELISA (del inglés *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) consiste en un ensayo basado en el principio inmunológico del reconocimiento y unión de los anticuerpos a las moléculas que reconocen como extrañas (antígenos). Es un método inmunológico clásico, enormemente utilizado para una gran cantidad de aplicaciones, por ejemplo, en diagnóstico clínico, detección de virus, búsqueda de anticuerpos, entre otros.

En el caso de la detección de gluten se utilizan anticuerpos que reconocen fragmentos presentes en las proteínas del gluten (antígeno). En este ensayo

se produce una unión del anticuerpo al antígeno sobre una superficie a la que previamente el anticuerpo o el antígeno se ha unido. Alguno de los componentes del ensayo (anticuerpo o antígeno) se encuentra unido a una enzima que catalizará la formación de un producto coloreado, que podrá ser cuantificado mediante la medida de la luz absorbida por dicho compuesto (espectrofotometría).

Existen distintos tipos de ensayos ELISA, siendo los más utilizados en la detección de gluten los **ensayos tipo sándwich** y los **ensayos competitivos**.

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

En el ELISA competitivo se incuba la muestra con el anticuerpo para después añadir esta preparación sobre una superficie recubierta de antígeno (por ejemplo, gliadinas de trigo) de tal forma que se une a la superficie el anticuerpo libre no unido al gluten de la muestra. Finalmente se detecta la cantidad de anticuerpo libre; cuanto más anticuerpo libre es detectado, menos cantidad de gluten contiene la muestra.

El ELISA más utilizado en la mayoría de las matrices para el análisis de gluten es el ELISA de tipo Sándwich no competitivo.

El Codex Alimentarius ha adoptado como método recomendado para el análisis de gluten/gliadinas el uso de inmunoensayos basados en el anticuerpo R5, estableciéndolo como un método de tipo 1 (el mayor grado de fiabilidad dentro del Codex). El anticuerpo R5 es de tipo monoclonal y presenta una elevada reactividad frente a las principales prolaminas implicadas en la enfermedad celíaca: gliadinas hordeínas y secalinas, presentando una capacidad de detección similar frente a las prolaminas más problemáticas de los cereales. Se asume que el gluten se presenta en la harina de trigo en cerca de un 50% bajo la forma de gliadina por lo que la detección de este tipo de proteína permite la estimación del gluten total en

límites de cuantificación cercanos a las 5 ppm de gluten (2,5 ppm de gliadina). La legislación Argentina establece como "libre de gluten" a aquellos productos con menos de 10 mg/kg (ppm) de gluten. Por tanto el límite de detección de la técnica es más que suficiente para alcanzar este requisito.

5.1 Consideraciones Generales

Para que el análisis de una muestra de alimento libre de gluten (ALG) sea evaluada correctamente:

- El envío al laboratorio de la muestra, debe estar acompañado por una declaración del motivo por el cual se ha solicitado el análisis.
- El análisis debe ser planificado correctamente y ejecutado meticulosamente.
- Los resultados deben ser evaluados en forma competente para determinar si la muestra cumple con las especificaciones del Código Alimentario Argentino.

5.2 Patrones y Material de Referencia.

Tanto los patrones como los materiales de referencia deben indicar en su certificado la pureza o concentración, así como fecha de preparación y de vencimiento.

5.3 Preparación y conservación de la muestra pre - análisis

Las muestras recibidas deben conservarse en freezer, heladera o a temperatura ambiente según corresponda.

Trazas de cereales en el aire y equipos sucios pueden provocar que el ensayo se contamine, por lo tanto se requiere:

- El uso de guantes antes y durante el ensayo
- Limpiar las superficies (mesadas), los viales de vidrio, mezcladores, balanzas y otros equipos con etanol 60%.

- El kit se almacena entre 2 y 8 °C. No congelar
- Preparar las muestras en un laboratorio separado de donde vaya a efectuarse el procedimiento de ELISA.
- La temperatura ambiente durante la realización del ensayo debe rondar los 25 °C

5.4 Extracción y detección

Una de las etapas críticas es la **extracción del gluten** del alimento. Durante el proceso de elaboración, los alimentos se someten a tratamientos térmicos y a otros procesos que pueden modificar la estructura del gluten. Esta modificación y la heterogeneidad de los alimentos suponen una barrera para la correcta extracción del mismo.

El método tradicional de extracción del gluten consiste en la utilización de una mezcla etanol-agua al 60%. La eficiencia del proceso puede mejorarse, especialmente para la extracción del gluten en alimentos térmicamente procesados. En algunos casos es necesario extraer la muestra con sustancias reductoras y desnaturalizantes para solubilizar los agregados de gluten producidos por el calor. La disolución que contiene estas sustancias se ha patentado en España con el nombre de *cocktail*. Esta solución de extracción contiene mercaptoetanol, por lo tanto se recomienda trabajar bajo campana.

Seguidamente, se debe detectar la cantidad de gluten presente en la muestra (Ver Figura). La cuantificación del gluten se realiza mediante la medida de una señal experimental que debe compararse con la señal obtenida en iguales circunstancias con un patrón de referencia de concentración conocida (Standard de gliadina). Es el proceso conocido como calibración. Una calibración adecuada es necesaria para poder realizar con éxito una cuantificación precisa de gluten. Para ello es recomendable además trabajar con una muestra positiva de referencia y una negativa.

Comenzada la cuantificación recordar que el Standard (Std) 1 (uno) presente una absorbancia menor de 0.15, esto indica que los lavados sucesivos con buffer durante la realización del ensayo fueron óptimos.

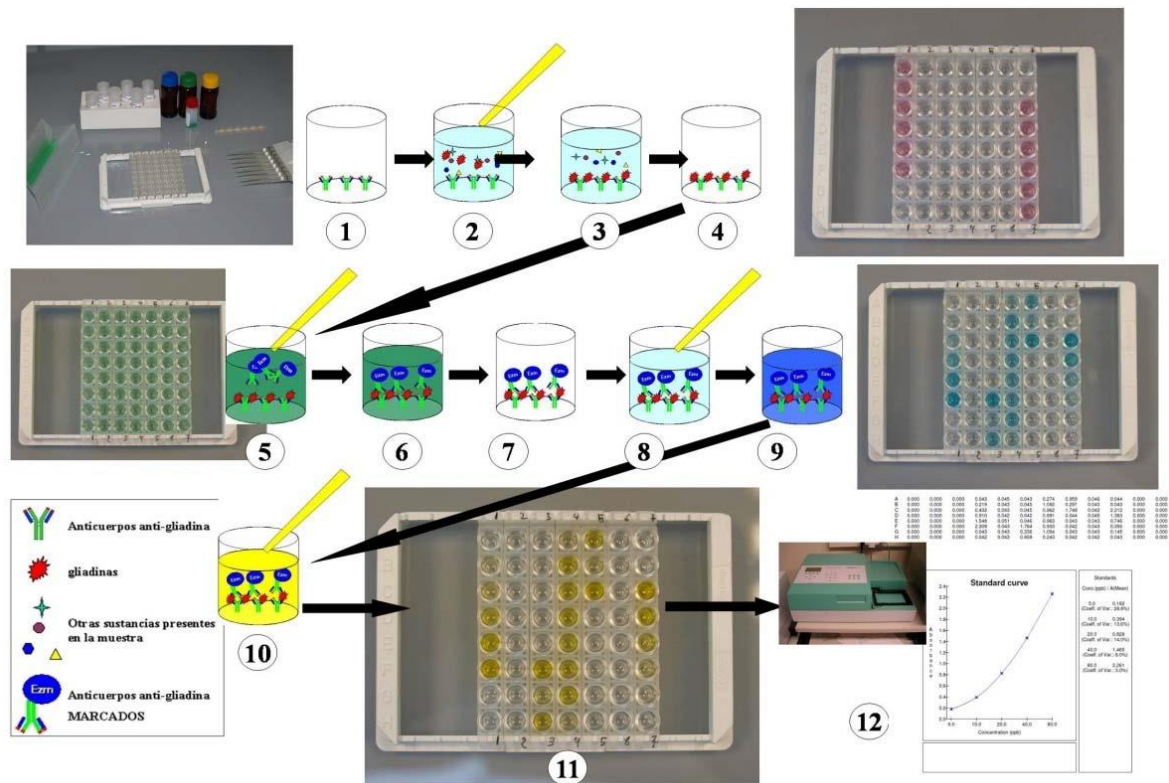


Figura: Determinación de Gluten

5.5 Lavado del material de vidrio

- Eliminar restos de muestras anteriores
- Enjuagar el material con agua corriente
- Lavar con solución de EXTRAN neutro MA 02 al 2%, usando una escobilla exclusiva para este tipo de ensayo.
- Enjuagar 10 veces con agua corriente
- Colocar con alcohol común al 20%, por 30 minutos
- Enjuagar con alcohol al 60%
- Ecurrir
- Almacenar los recipientes y sus tapas en cajas cerradas.