

## DETECCIÓN DE TRAZAS DE SOJA EN PRODUCTOS ELABORADOS CON HARINA DE TRIGO UTILIZANDO MÉTODOS DE ELISA Y REAL TIME-PCR

Vivas Lis M. \*\*, Binaghi M. Julieta\*, Olmedo Mariana C. \*\*, Hostench M. Clara \*\*, López Laura B.\* y Alvarez Marcela A.\*\*,

\*Cátedra de Bromatología. Departamento de Sanidad, Nutrición, Bromatología y Toxicología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junín 956. C.P. 1113. Buenos Aires. Argentina. FAX: 541149648243.

\*\* Centro de Agroalimentos, Coordinación Microbiología y Biología Molecular, Instituto Nacional de Tecnología Industrial. Av. General Paz 5445. San Martín, Provincia de Buenos Aires, Argentina. maa@inti.gov.ar

### **INTRODUCCIÓN**

Las alergias alimentarias constituyen un problema creciente en los países desarrollados pero también en los países emergentes. Existen 8 grupos de alimentos que son responsables del 90 % de las alergias alimentarias. Estos alimentos son: leche, huevo, soja, trigo, maní, frutos secos, pescado y mariscos. La reacción alérgica frente a este tipo de alimentos se puede manifestar desde prurito o urticaria hasta el shock anafiláctico dependiendo del individuo y a su vez la intensidad de esta respuesta puede variar a lo largo de su vida. Se estima que las alergias alimentarias afectan al 3-4% de adultos y a 4-7% de los niños en los países desarrollados (Wang y Liu, 2011; EAACI, 2013). Estos alérgenos generalmente empiezan a tolerarse en niños con edades comprendidas entre los 5 y 7 años.

La mayor preocupación para los individuos alérgicos a la soja reside en la posibilidad de consumir alimentos que presenten soja por contaminación cruzada. Esta ocurre en el transporte o almacenamiento de la materia prima, pero también puede ocurrir cuando se comparten las maquinarias de elaboración y de envasado con productos con soja como ingrediente.

Es por ello, la importancia de desarrollar y evaluar tecnologías que permitan la detección de soja como contaminante.

### **OBJETIVO**

El objetivo del presente trabajo es evaluar dos metodologías real time PCR (Polimerasa Chain Reaction) y la metodología ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) para la detección y/o cuantificación de trazas de soja en alimentos elaborados con harina de trigo susceptibles de contaminación cruzada. Se trabajó con muestras de harinas, pastas y galletitas.

### **DESCRIPCIÓN**

**Muestras:** se analizaron 11 muestras que pueden presentar contaminación cruzada con soja. Las muestras estudiadas fueron: pasta seca 100 % trigo candeal, pasta seca 100% trigo pan; galletitas Cracker con lecitina, galletitas Cracker de salvado con lecitina; harina 000 industrial, harina 000 y harina 0000, salvado de trigo

**Métodos:** Se estudiaron las muestras por la técnica de ELISA y por dos métodos de Real Time-PCR.

**ELISA RIDASCREEN (R) FAST Soya, R-Biopharm.**

Se utilizó este kit para el análisis cuantitativo de soja. Todas las muestras se analizaron por duplicado siguiendo el protocolo de trabajo del kit. Los resultados obtenidos, utilizando el kit de ELISA, se expresan en ppm de proteína de soja. Este kit presenta un límite de cuantificación de 2,5 mg/kg (ppm) proteínas de soja y un rango de cuantificación: 2,5 – 20,0 ppm proteínas de soja.

### **REAL TIME PCR**

*Extracción de ADN (Acido Desoxiribonucleico)*

Para la extracción de ADN se utilizaron dos metodologías: 1) el kit de extracción de ADN, SureFood® PREP ALLERGEN de R-Biopharm y 2) método de extracción de ADN utilizando CTAB (bromuro de cetil-trimetil amonio) con posterior paso de purificación mediante Wizard® DNA Clean-Up System.

*Amplificación del ADN*

Método 1: Kit para la detección cualitativa de ADN de soja de R-Biopharm (*SureFood® Allergen Soya*)

Todas las muestras se analizaron por duplicado siguiendo el protocolo de trabajo del kit. Para la obtención del ADN se utilizó el kit de extracción *SureFood® PREP ALLERGEN* de r-Biopharm. El kit utilizado permite obtener resultados cualitativos.

El límite de detección del kit comercial obtenido con el material de referencia *SureFood® Quantard Allergen*, extraído con el kit *SureFood® PREP ALLERGEN* es de 4 ppm de soja y fue detectado en el ciclo 30 ( $C_t$ )<sup>(2)</sup>. Este valor es de gran utilidad para la interpretación de los resultados obtenidos, dado que si una muestra es amplificada antes del ciclo 30, indicaría que la misma presenta más de 4 ppm de soja. Por lo tanto, para evaluar los resultados se utiliza como punto de corte este valor de  $C_t$  para definir si una muestra es positiva. Sin embargo, el límite de detección depende de la matriz, del grado de procesamiento de la misma y del método de extracción de ADN utilizado. El parámetro  $C_t$  (threshold cycle) está definido como el número de ciclos en los que la fluorescencia emitida excede el umbral fijado. Los valores de  $C_t$  son inversamente proporcionales a la concentración inicial de ADN presente en la muestra.

Método 2: Método in-house<sup>(1)(3)</sup>

Método in-house que se basa en la detección del gen de lectina, secuencia específica de soja. Los cebadores y sonda utilizados fueron: Cebador FW (Lectin-F) 5'-TCC ACC CCC ATC CAC ATT T-3', Cebador R (Lectin-R) 5'-GGG ATA GAA GGT GAA GTT GAA GGA-3', Sonda (Lectin-Probe) 5'-FAM AAC CGG TAG CGT TGC CAG CTT CG-TAMRA-3'. Se utilizaron controles positivos para asegurar el funcionamiento del método.

En cuanto al método in-house el límite de detección aún no ha sido determinado.

## RESULTADOS

Muestra	ELISA (ppm proteínas de soja)	PCR Método 1	PCR Método 2
Pasta Seca 100 % candeal	< 2,5	Positivo 29.7	Neg.
Pasta seca 100 % trigo pan	14,3	Positivo 24.3	Neg.
Galletitas Cracker salvado con lecitina	13,9	-	Neg.

Galletitas Cracker con lecitina	6,2	-	Neg.
Harina 000	> 20	Positivo 25.6	Neg.
Harina 000 Industrial	> 20	Positivo 26.1	Neg.
Muestra	ELISA (ppm proteínas de soja)	PCR Método 1	PCR Método 2
Harina 000	16	Positivo 28.4	Neg.
Harina 000	12	Positivo 24.4	Neg.
Harina 0000	< 2,5	Positivo 27.9	Neg.
Salvado de trigo	< 2,5	Positivo 28.2	Neg.
Salvado de trigo	9,5	-	Neg.

Según el método de ELISA, 8 muestras de las 11 analizadas (73%) presentan contaminación cruzada con soja.

Por otro lado, ambos métodos de PCR no dieron resultados comparables

## CONCLUSIONES

El método de ELISA detecta la proteína alergénica y el de PCR detecta ADN de soja.

Si bien no son métodos comparables, se complementan.

En cuanto a que ambos métodos de PCR no hayan dado resultados comparables, esto puede deberse a que se presume que la cantidad de ADN de soja presente en estas muestras es menor al límite de detección del método in-house, de allí que hayan dado negativas.

Si bien el objetivo del trabajo se cumplió, en una próxima etapa se trabajará en obtener el límite de detección en distintas matrices, con el fin de evaluar la sensibilidad de este método.

## BIBLIOGRAFÍA

<sup>(1)</sup>Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists, Edited by Bert popping, Carmen Díaz-Amigo, Katrin Hoenicke, A John Wiley & Sons, Inc., Publication 2010.

<sup>(2)</sup>"Detección de presencia de soja por contaminación cruzada en alimentos comerciales por método Real time PCR y métodos de ELISA" Cattapan Renata<sup>1</sup>, Cellerino Karina<sup>2</sup>, Binaghi M. Julieta<sup>2</sup>, Cinalli Mariana<sup>1</sup>, Cetrangolo Mercedes<sup>1</sup>, Hostench M. Clara<sup>1</sup>, Alvarez Marcela A<sup>1</sup>, López María Cristina<sup>1</sup> y López Laura B<sup>1</sup>. <sup>1</sup>INTI-Agroalimentos, <sup>2</sup>Cátedra de Bromatología. Departamento de Sanidad, Nutrición,

Bromatología y Toxicología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Revista la Alimentación Latinoamericana Nº 303 Abril 2013.

<sup>(3)</sup>Cuaderno Tecnológico: Detección por PCR de alérgenos en alimentos, OGM, e identificación de especies. Autores: Dra. Carmen Díaz Amigo, Dr. Bert Popping, 2014.