

## DETECCIÓN DE DE SOJA EN ALIMENTOS COMERCIALES POR MÉTODOS REAL TIME PCR Y 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>2</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.

e-mail: kitty@inti.gob.ar

### **OBJETIVO**

Este trabajo se encuadra dentro del proyecto de detección de alérgenos en alimentos que desarrolla el Centro de Agroalimentos desde el año 2010 junto con otras Instituciones de I&D y Universidades a través de la Plataforma Alérgenos en alimentos. Su objetivo fundamental es ser referente para la industria, junto con otros laboratorios de investigación a nivel nacional, en la detección de alérgenos en alimentos

Las alergias alimentarias constituyen un problema creciente en los países desarrollados pero también en los países emergentes como el nuestro. Si bien en nuestro país no existen estudios que permitan determinar la prevalencia de las alergias alimentarias se calcula que el 6% de los niños menores de 3 años y el 3% de la población general las padece. Existen 8 grupos de alimentos que son responsables del 90 % de las alergias alimentarias. Estos son: leche, huevo, soja, trigo, maní, frutos secos, pescado y mariscos (1,2, y 3). Argentina es uno de los mayores productores de soja en el mundo, esto contribuye en la posible contaminación cruzada de los demás granos producidos en el país. Además en las últimas décadas la industria alimentaria aumentó considerablemente el uso de soja en la elaboración de diferentes alimentos.

El objetivo del presente trabajo es evaluar distintas metodologías: PCR "Real Time" (Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real) y dos kits diferentes de ELISA (Enzimoimmuno ensayo) para la detección y/o cuantificación de soja en alimentos susceptibles de contaminación cruzada.

### **DESCRIPCIÓN**

Se analizaron doce muestras: Fideos secos (cinco); Producto con harina y sémola, Alimento en polvo para lactantes, Salchichas de pollo, Salame de jabalí, Jamón cocido y Lecitina de soja. Se analizó además un material de referencia FAPAS T2778C que declara la presencia de soja.

Se utilizaron como metodologías dos kits comerciales de ELISA (Veratox para soja de Neogen y AgraQuant para soja de Romer) y un

kit comercial de PCR "Real Time" 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 de cada kit (4, 5, 6). El kit de Veratox de Neogen expresa los resultados como aislado proteico de soja (SPI) y presenta un rango de cuantificación de 10 a 100 ppm, mientras que el kit AgraQuant de Romer determina la presencia de soja en los alimentos a través de anticuerpos específicos contra inhibidor de tripsina de soja (STI). El límite de detección es de 16 ppb y el rango de cuantificación es de 40 a 1000 ppb de STI. Para expresar los resultados como producto de soja, el kit presenta diferentes factores de conversión según la fuente de contaminación de soja supuesta.

Para la determinación de ADN de soja se utilizó además el kit de extracción de ADN, SureFood® PREP ALLERGEN de R-Biopharm.

El límite de detección del kit comercial para la detección de ADN de soja es de 4 ppm de soja y fue detectado en el ciclo 30 (C<sub>t</sub>). 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 este valor como punto de corte.

### **RESULTADOS**

En la Tabla N° 1 se presentan los resultados promedios de la detección de soja de las doce muestras por las tres metodologías estudiadas.

Según los resultados obtenidos en PCR "Real time" se observa que todos los alimentos analizados presentan contaminación cruzada con soja. Todas las muestras analizadas presentaron resultados positivos (C<sub>t</sub><30) y por lo tanto se puede decir que según este método contienen más de 4 ppm de soja. Sin embargo, aunque se detecte la presencia de ADN no implica que las proteínas de soja estén presentes. De hecho, tres de las muestras analizadas (Fideos E, Producto en polvo a base de harinas y jamón cocido) dieron negativas por ambos test de ELISA y positivas en PCR. Por lo tanto, aunque el método de PCR es aparentemente el más sensible, para

determinar si un alimento genera o no alergia se necesita evaluar si las proteínas están presentes. Ambos kits de ELISA presentan ventajas y desventajas, el kit de Romer resulta más sensible, sin embargo presenta el inconveniente de que los resultados finales se expresan en ppb de STI. Es necesario hacer una gran aproximación para la conversión de proteínas inhibidoras de tripsina a producto de soja. En nuestro país existe una importante contaminación cruzada de soja en los granos de trigo y en otros cereales. Las maquinarias, los silos y también los sistemas de transporte son comunes para estos cultivos. Por lo tanto, se infiere que la contaminación encontrada sea principalmente debida a los porotos de soja mezclados con el trigo. Como la molienda del trigo no presenta ningún tipo de procesamiento térmico y en los productos analizados éste es bajo, consideramos que el contaminante encontrado es harina de soja sin tostar. Por lo tanto, se utiliza el factor de conversión de 42,5 para transformar los resultados de STI a harina de soja sin cocción. El CAA determina que la harina descascarada sin desgrasar presenta una composición de 35% de proteínas (7). De acuerdo con estas consideraciones se llega a los resultados finales expresados como ppm de proteína de soja presentados en la Tabla N° 1. El kit de Neogen si bien resultaría ser menos sensible permite obtener los resultados finales en ppm de aislado proteico de soja. Considerando que el CAA establece un contenido mínimo de 90 % de proteínas para los aislados proteicos de soja el resultado final en ppm de proteína de soja se obtiene multiplicando al valor hallado por el kit por 0,90.

En otras tres muestras (Fideos A, Producto con harina y sémola y salchicha cocida de pollo) ambos kits permitieron detectar y cuantificar la presencia de soja aunque los resultados finales expresados como ppm de proteínas de soja difieren entre ambos kits. Con respecto al material de referencia FAPAS no se detectaron proteínas de soja con el kit de Romer y sí se detectó presencia de ADN utilizando PCR "Real Time". En la muestra lecitina de soja se detectaron proteínas de soja con el kit de Romer.

### **CONCLUSIONES**

De acuerdo con los resultados hallados no hay un método de elección para la detección y/o cuantificación de soja en los alimentos. Parecería necesario utilizar más de un método para una toma de decisión. Probablemente resulte de utilidad realizar un primer análisis con el kit de Neogen y en caso de que este resulte negativo se podría corroborar dicho resultado con el kit de Romer. Por otro lado la metodología PCR "Real Time" podría ser una importante herramienta porque determina con precisión si se cumplen las Buenas Prácticas Agrícolas y las Buenas Prácticas de Manufactura. Además podría permitir confirmar la presencia de soja cuando los tests de ELISA presenten resultados discordantes. Es necesario seguir trabajando en el tema utilizando sistemas modelos de composición conocida de diferentes matrices de alimentos para poder evaluar los alcances de cada una de las metodologías estudiadas.

Muestra	RealTime(PCR) r-biopharm + : C <sub>t</sub> <30	ELISA Neogen ppm SPI	ELISA Neogen ppm Proteína de soja	ELISA Romer ppb STI	ELISA Romer ppm Harina de soja sin tostar	ELISA Romer ppm Proteína de soja
Fideos A	27,1	21,0	18,9	431,7	18,3	6,4
Fideos B	27,7	<10,0	<9,0	263,5	11,2	3,9
Fideos C	26,1	<10,0	<9,0	145,2	6,2	2,2
Fideos D	27,8	<10,0	<9,0	116,0	4,9	1,7
Fideos E	28,1	<10,0	<9,0	<40,0	<1,7	<0,6
Producto con harina y sémola	24,4	64,5	58	963,8	40,9	14,3
Alimento en polvo para lactantes	25,3	<10,0	<9,0	<40,0	<1,7	<0,6
Salchicha cocida de pollo	16,2	88,2	79,4	>1000	>42,5	>14,9
Salame de jabalí	28,8	<10,0	<9,0	47,1	2,0	0,7
Jamón cocido	27,5	<10,0	<9,0	<40,0	<1,7	<0,6
Lecitina de soja	29,7	nd	nd	236,3	10,0	3,5
FAPAS	28,5	nd	nd	<40,0	<1,7	<0,6

**Tabla 1-**Resultados de la detección de soja con los Kits de ELISA de Neogen, Romer y el Kit de Real Time PCR de R-Biopharm (nd: no se determinó)

## Bibliografía

- (1) Poms RE. Klein CL. Anklam E. Methods for allergen analysis in food: a review. Food Additives and Contaminants. 2004; 21 (1): 1-31.
- (2) Tsuji H. Kimoto M. Natori Y. Allergens in major crops. Nutrition Research. 2001; 21: 925-934.
- Lehrer SB. Ayuso R. Reese G. Current Understanding of Food Allergens. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2002; 964: 69-85.
- ELISA Veratox for soy allergen (Código: 8410). Neogen. 2012. Disponible en: [http://www.neogen.com/Food-Safety/pdf/ProdInfo/Page\\_V-Soy.pdf](http://www.neogen.com/Food-Safety/pdf/ProdInfo/Page_V-Soy.pdf), visitada octubre 2012.
- (3) Lehrer SB. Ayuso R. Reese G. Current Understanding of Food Allergens. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2002; 964: 69-85.
- (4) AgraQuant Soy Assay de Romer (COKAL 0448), Disponible en: <http://shop.romerlabs.com/en/AgraQuant-ELISA/AgraQuant-Allergens/AgraQuant-ELISA-Soy>, visitada octubre 2012.
- (5) SureFood® Allergen Soya (Product Code S3101), Disponible en: [http://www.r-biopharm.com/product\\_site.php?product\\_id=509&product\\_class\\_one=QWxsZXJnZW5z&product\\_class\\_two=U295YQ==&product\\_class\\_three=&product\\_class\\_four=&product\\_range=Food%20and%20Feed%20Analysis&](http://www.r-biopharm.com/product_site.php?product_id=509&product_class_one=QWxsZXJnZW5z&product_class_two=U295YQ==&product_class_three=&product_class_four=&product_range=Food%20and%20Feed%20Analysis&), visitada octubre 2012.
- (6) ELISA Veratox for soy allergen (Código: 8410). Neogen. 2012. Disponible en: [http://www.neogen.com/Food-Safety/pdf/ProdInfo/Page\\_V-Soy.pdf](http://www.neogen.com/Food-Safety/pdf/ProdInfo/Page_V-Soy.pdf), visitada octubre 2012.
- (7) Código Alimentario Argentino, actualizado 2012. Disponible en : [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas\\_alimentos\\_caa.asp](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp), visitada octubre 2012.