

DetECCIÓN DE PRESENCIA DE SOJA POR CONTAMINACIÓN CRUZADA EN ALIMENTOS COMERCIALES POR MÉTODO REAL TIME PCR Y MÉTODOS DE ELISA

Cattapan Renata**; Cellerino Karina*; Binaghi M. Julieta*; Cinalli Mariana**; Cetrángolo Mercedes**;
Hostench M. Clara**; Alvarez Marcela A**; López María Cristina** y López Laura B*.

*Cátedra de Bromatología. Departamento de Sanidad, Nutrición, Bromatología y Toxicología.
Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. Argentina.

** Centro de Cereales y Oleaginosas - Instituto Nacional de Tecnología Industrial.
San Martín, Provincia de Buenos Aires. Argentina.

laulop@ffyb.uba.ar



Resumen

El objetivo del presente trabajo es evaluar una metodología real time PCR y metodología ELISA con dos kits diferentes para la detección y/o cuantificación de soja en alimentos susceptibles de contaminación cruzada. Se analizaron doce muestras: fideos secos (cinco); producto con harina y sémola; producto en polvo a base de harinas para lactantes y niños en la primera infancia; salchichas de pollo; salame de jabalí; jamón cocido y lecitina de soja. Se analizó además un material de referencia que declara la presencia de soja. Se utilizaron dos kits de ELISA para la detección y cuantificación de soja de las marcas Neogen y Romer y un kit de Real Time PCR de la marca r-Biopharm. Todas las muestras analizadas presentaron resultados positivos utilizando Real Time PCR. Aunque este método es aparentemente el más sen-

sible, para determinar si un alimento genera o no alergia se necesita confirmar la presencia de las proteínas alergénicas. Ambos kits de ELISA permitieron la detección y cuantificación de soja en tres de las muestras analizadas. Dado que el kit de Romer es más sensible, permitió la detección de soja en algunas muestras en las que el kit de Neogen no las detectó. Ambos kits presentan ventajas y desventajas, el kit de Romer es más sensible pero los resultados finales se expresan en ppb de STI (inhibidor de tripsina de soja) por lo que deben realizarse diferentes suposiciones para expresar el resultado final en ppm de proteínas de soja. El kit de Neogen es menos sensible pero los resultados finales se expresan directamente en ppm de

aislado proteico de soja. De acuerdo con los resultados obtenidos, no hay un método de elección para la detección y/o cuantificación de soja en los alimentos. Parecería que resulta necesaria la realización de 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 técnica Real Time PCR 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.

Palabras clave: alérgenos, soja, Real Time PCR, ELISA.

Introducción

Las alergias alimentarias constituyen un problema creciente en los países desarrollados pero también en los países emergentes como el nuestro. En las últimas décadas la prevalencia de las alergias a alimentos ha aumentado considerablemente y este tema constituye un desafío tanto desde el punto de vista clínico como para la industria de alimentos⁽¹⁾. 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 tres años y el 3% de la población general padece alergia alimentaria.

Existen ocho grupos de alimentos que son responsables del 90% de las alergias alimentarias. Estos alimentos son: leche, huevo, soja, trigo, maní, frutos secos, pescados y mariscos^(2,3 y 4). El 6 de octubre de 2010 fue publicada en el Boletín Oficial la Resolución Conjunta 57/2010 y 548/2010 de la Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca que establecía la incorporación del artículo 235 séptimo al Código Alimentario Argentino (CAA) sobre la rotulación de alérgenos en alimentos. De acuerdo con esta Resolución pasarían a ser de declaración obligatoria los alérgenos y sustancias capaces de producir reacciones adversas en individuos susceptibles. Los mismos deberían ser declarados a continuación de la lista de ingredientes del rótulo, siempre que ellos o derivados de ellos estén presentes en los productos alimenticios envasados, ya sean añadidos como ingredientes o como parte de otros ingredientes.

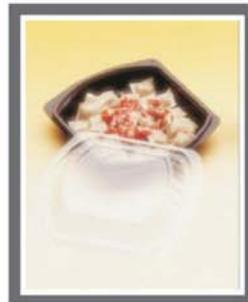
Los alérgenos contemplados comprenderían: cereales que contienen gluten: trigo, centeno, cebada, avena y sus variedades híbridas y productos de éstos; crustáceos y productos derivados; huevos y productos de los huevos; pescado y productos de la pesca; maní y productos derivados; soja y productos derivados; leche y productos lácteos (incluida lactosa), frutas secas (almendras, avellanas, castañas, nueces, piñones, pistacho) y productos derivados; dióxido de azufre y sulfitos, y tartrazina⁽⁵⁾. De acuerdo con la Resolución Conjunta N°106-2011 y N°297-2011 desde el 6 de junio de 2011 la aplicación de la Resolución Conjunta N°57 y 548/2010 se encuentra suspendida hasta tanto la Comisión Nacional de Alimentos elabore una propuesta de adecuación del artículo 235 séptimo del CAA⁽⁶⁾.

Debido a la inminente incorporación al CAA del artículo 235 séptimo que contempla la rotulación de alérgenos en alimentos, resulta necesario realizar el control de productos comerciales para detectar la posible presencia de proteínas alergénicas.

La 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 como ingrediente en la elaboración de diferentes ali-

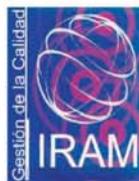


COTNYL S.A.
COMPROMISO CON LA CALIDAD



Fábrica argentina de bandejas, pots y vasos descartables de Polipropileno, aptos para freezer y microondas.

Con Sistema de Gestión de la Calidad Certificada bajo Normas Iso 9001:2000 IRAM R.I. 9000-567



Conozcalos !!!
y descubra las diferencias

COTNYL®



Servicio gratuito 0-800-555-0175

Calle 97 Nro. 869 (B1650IAA) Gral. San Martín
Bs. As. - Argentina - Tel.: (54 11) 4754-4446
www.cotnyl.com - info@cotnyl.com

mentos: fiambres, embutidos, panificados, caramelos, helados, postres, salsas, entre otros. El CAA establece que, como información obligatoria, debe figurar en la rotulación de alimentos envasados la lista de ingredientes. Los mismos deberán enumerarse en orden decreciente de peso inicial. Los aditivos alimentarios están incluidos dentro del concepto de ingredientes⁽⁷⁾. Sin embargo no todos los rótulos presentan completa su lista de ingredientes, en particular en productos cárnicos muchas veces es posible detectar la presencia de proteínas de soja que no fueron declaradas en la lista de ingredientes⁽⁸⁾.

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 ingredientes.

Las metodologías utilizadas internacionalmente para la detección de alérgenos en alimentos comprenden: métodos inmunocromatográficos, métodos de enzimoimmunoensayo (ELISA) sándwich y ELISA competitivo con anticuerpos poli o monoclonales, Real Time PCR y espectrometría de masa^(9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15). A nivel internacional hay desarrollados kits comerciales que mediante métodos ELISA permiten la detección o cuantificación de diferentes alérgenos: soja, huevo, leche, gluten, maní, almendras, etc. También se comercializan kits Real Time PCR para la determinación de algunos alérgenos (pescado, crustáceos, moluscos, soja, sésamo, nueces, gliadina, etc). Además se comercializan test inmunocromatográficos que permiten la detección rápida de alérgenos en las plantas industriales (huevo, gluten, leche, maní, soja, etc).

El objetivo del presente trabajo es evaluar una metodología real time PCR y dos métodos de ELISA para la detección y/o cuantificación de soja en alimentos susceptibles de contaminación cruzada.

Materiales y métodos

Muestras

Se analizaron doce muestras que pueden presentar contaminación cruzada con soja. Las muestras analizadas fueron: fideos secos (cinco); producto con harina y sémola; producto en polvo a base de harinas para lactantes y niños en la primera infancia; salchichas de pollo; salame de jabalí; jamón cocido y lecitina de soja. Se analizó además un material de referencia que declara la presencia de soja en su certificado: FAPAS T2778C. La denominación de venta y la lista de ingredientes de cada producto analizado se presentan en la tabla 1.

Metodologías

Test de ELISA Veratox para soja de Neogen (Veratox Quantitative Soy allergen Test de Neogen). Todas las muestras se analizaron por duplicado siguiendo el protocolo de trabajo del kit⁽¹⁶⁾. El límite de cuantificación del kit es 10 ppm de aislado proteico de soja y el rango de cuantificación es 10 - 100 ppm de aislado proteico de soja. El resultado final se expresa en ppm de aislado proteico de soja.

Test ELISA para soja de Romer (AgraQuant Soy Assay de Romer). Todas las muestras se analizaron por duplicado siguiendo el protocolo de trabajo del kit⁽¹⁷⁾. Este kit determina la presencia de soja en los alimentos a través de anticuerpos específicos contra inhibidor de tripsina de soja (STI). El rango de cuantificación es de 40 a 1000 ppb de STI y el límite de detección es de 16 ppb de STI. Como STI corresponde a una fracción de las proteínas de soja, para determinar la cantidad de soja en el alimento se debe aplicar un factor de corrección detallado en el protocolo del kit. Por ejemplo para expresar el resultado final como harina de soja sin tostar el resultado obtenido en ppb de STI se debe multiplicar por 42,5; mientras que para expresarlo como harina de soja tostada se debe multiplicar por 475. De acuerdo con estas indicaciones, para convertir el resultado de STI a producto de soja resultaría necesario determinar cuál es la posible fuente de contaminación de los alimentos analizados.

Real Time PCR: 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⁽¹⁸⁾. 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 (Ct). 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 Ct 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 Ct (threshold cycle) está definido como el número de ciclos en los que la fluorescencia emitida excede el umbral fijado. Los valores de Ct son inversamente proporcionales a la concentración inicial de ADN presente en la muestra. Además del control negativo provisto por el kit se evaluó la especificidad del kit con muestras de manzana y de almidón de maíz. Ambas muestras presentaron un Ct de 34.

Tabla 1 - Resultados de la detección de soja con el kit de Real Time PCR de r-biopharm y resultados promedio obtenidos en la cuantificación de soja con los kits de Neogen y de Romer, de las 11 muestras comerciales analizadas y de la muestra de referencia FAPAS

Denominación de venta	Ingredientes	Kit Real Time PCR r-biopharm +: Ct < 30	Kit Soja Neogen ppm Aislado de Proteínas de Soja	Kit Soja Neogen ppm Proteínas de Soja	Kit Soja Rommer ppb STI	Kit Soja Rommer ppm Harina de Soja sin tostar	Kit Soja Rommer ppm Proteína de Soja
Fideos de harina de trigo pan	Harina de trigo, sulfato ferroso, cúrcuma	+ 27,1	21,0	18,9	431,7	18,3	6,4
Fideos secos fortificados con hierro, vitamina B1 y ácido fólico	Harina de trigo, sulfato ferroso, hierro, niacina, vitaminas B1 y B2, ácido fólico, colorante: cúrcuma	+ 27,7	< 10,0	< 9,0	263,5	11,2	3,9
Fideos secos A	Harina de trigo enriquecida	+ 26,1	< 10,0	< 9,0	145,2	6,2	2,2
Fideos secos B	Semolín de trigo pan, semolín de trigo candeal, agua, colorante natural cúrcuma	+ 27,8	< 10,0	< 9,0	116,0	4,9	1,7
Fideos elaborados con sémola de trigo candeal	Sémola de trigo candeal, espinaca	+ 28,1	< 10,0	< 9,0	< 40	< 1,7	< 0,6
Producto con harina y sémola	Harina enriquecida, sémola, zapallo deshidratado, azúcar, zanahoria deshidratada, carbonato de calcio, espinaca deshidratada, niacina, hierro, óxido de zinc, pantotenato de calcio, vitaminas B6, B2, B1 y B12, ácido fólico y cúrcuma	+ 24,4	64,5	58	963,8	40,9	14,3
Producto en polvo a base de harina de trigo, cebada, avena, maíz, arroz, vitaminas y minerales para lactantes a partir del 6º mes de vida y niños de la 1ª infancia	Harina de trigo, azúcar, agua, harina de cebada, extracto de malta, harina de avena, harina de maíz, harina de arroz, carbonato de calcio, fosfato disódico, cultivos bifidus (<i>Bifidobacterium lactis</i>). Vitaminas (A,D,E,C,Niacina, ácido Pantoténico, B1,B6, ácido Fólico, Biotina), sulfato de zinc, fumarato ferroso. Aromatizante (vainilla)	+ 25,3	< 10	< 9,0	< 40,0	< 1,7	< 0,6
Salchicha cocida de pollo	Carne de pollo, agua, almidón, sal, estabilizante (INS 451), antioxidante (INS 316), conservante (INS 251 y 250)	+ 16,2	88,2	79,4	> 1000	> 42,5	> 14,9
Salame de jabalí	Carne de jabalí, tocino de cerdo, sal, dextrosa, especias, resaltador de sabor (INS 621), conservante (INS 250)	+ 28,8	< 10,0	< 9,0	47,1	2,0	0,7
Jamón cocido	Pernil de cerdo, sal, azúcar, especias, espesante (INS 407), estabilizante (INS 452 i), resaltador de sabor (INS 621), antioxidante (INS 316), conservantes (INS 251 – 250), colorante natural (INS 120)	+ 27,5	< 10,0	< 9,0	< 40	< 1,7	< 0,6
Lecitina de soja	Lecitina de soja	+ 29,7	nd	nd	236,3	10,0	3,5
FAPAS T2778C	Harina de trigo	+ 28,5	nd	nd	< 40	< 1,7	< 0,6

nd: no se determinó

Resultados

En la tabla 1 se presentan los resultados de la detección de soja con el kit de Real Time PCR de r-biopharm y los resultados promedio obtenidos en la cuantificación de soja con los kits de Neogen y de Romer, de las once muestras comerciales analizadas y de la muestra de referencia FAPAS.

Discusión

Según los resultados obtenidos en Real time PCR, se observa que los alimentos analizados presentan contaminación cruzada con soja. Todas las muestras analizadas presentaron resultados positivos ($Ct < 30$) 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 elaborados con sémola de trigo candeal, 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. La técnica de PCR podría ser una importante herramienta para la industria de alimentos y entes reguladores porque determina con precisión si se cumplen las Buenas Prácticas Agrícolas y las Buenas Prácticas de Manufactura.

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. Una desventaja de este kit sería la gran aproximación que se debe hacer para la conversión de proteínas inhibitoras de tripsina a producto de soja. Como no se sabe exactamente cuál es la fuente de contaminación y la influencia del proceso de elaboración del producto en la soja presente, se necesitan realizar suposiciones para lograr la conversión a proteína 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 cocción. 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 descascada 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 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⁽⁷⁾.

Al evaluar los resultados obtenidos con ambos kits de ELISA se observa que el kit de Romer resulta más sensible que el kit de Neogen. En las muestras fideos secos fortificados con hierro, vitamina b1 y ácido fólico, fideos secos a y b y salame de jabalí, con el kit de Romer se obtuvieron valores bajos de soja pero comprendidos dentro del rango de cuantificación del kit. En cambio, las mismas muestras analizadas con el kit de Neogen dieron por debajo del límite de cuantificación de dicho kit. En otras tres muestras (fideos de harina de trigo pan, 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 Real Time PCR. En la muestra lecitina de soja se detectaron proteínas de soja con el kit de Romer. Si bien resultaría necesario analizar otras lecitinas de soja, en principio estos resultados corroboran la obligatoriedad internacional de alertar sobre la posible presencia de alérgenos de soja en alimentos que contienen lecitina de soja en su lista de ingredientes.

Si bien no existe un consenso internacional en cuanto a valores umbrales de alérgenos en alimentos, en Australia y Nueva Zelanda se desarrolló el programa VITAL 2.0. (Food Industry Guide to the Voluntary Incidental Trace Allergen Labelling Program)⁽¹⁹⁾. El mismo establece dosis de referencia que corresponden al nivel de mg de proteínas (proteínas totales de un alimento alergénico) por debajo del cual sólo los individuos más sensibles (entre 1 y 5% dependiendo de los datos disponibles) en las poblaciones alérgicas son propensos a experimentar una reacción adversa. Esta dosis de referencia se asigna a una ocasión de consumo es decir a una porción de alimento ingerida y en el caso del alérgeno soja el valor asignado es 1 mg de proteínas de soja. El programa VITAL 2.0 establece dos niveles de acción. El nivel 1 establece que si la porción de alimento aporta un valor por debajo de la dosis de referencia el alimento no requiere una frase precautoria que alerte sobre la posible presencia del alérgeno, en este caso soja. En el nivel 2 establece que si la porción aporta una cantidad igual o superior a la de la dosis de referencia entonces el alimento debe presentar una frase precautoria en cuanto a la posible presencia del alérgeno en cuestión, en este caso soja. La frase permitida es *Puede estar presente soja*.

Si consideramos los valores hallados de proteínas de soja en las diferentes muestras utilizando ambos kits de ELISA, podemos observar que por ejemplo una porción de fideos de trigo pan (80 gramos) aportaría de acuerdo con el valor hallado con el kit de Neogen 1,5 mg de proteínas de soja y de acuerdo con el valor hallado con el kit de Romer 0,5 mg de proteínas de soja. Una porción del producto con harina y sémola (50 gramos) aportaría de acuerdo con el valor hallado con el kit de Neogen 2,9 mg de proteínas de soja y de acuerdo con el valor hallado con el kit de Romer 0,7 mg de proteínas de soja. Por último una porción de salchichas cocidas de pollo (50 gramos) aportaría de acuerdo con el valor hallado con el kit de Neogen 4 mg de proteínas de soja y de acuerdo con el valor hallado con el kit de Romer más de 0,7 mg de proteínas de soja. En los tres alimentos presentados, los valores hallados en una porción utilizando el kit de Neogen indican que estos alimentos deberían tener una frase precautoria advirtiendo la posible presencia de soja. Los valores hallados con el kit de Romer se encuentran por debajo de la dosis de referencia, pero considerando las aproximaciones que deben realizarse para expresar el resultado final en ppm de proteína de soja y que las determinaciones realizadas con el kit de Neogen y con la metodología Real Time PCR resultaron positivas, creemos que de hallarse estos valores con el kit de Romer también resultaría conveniente aplicar una frase de advertencia en estos alimentos.

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 que resulta necesaria la realización de 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 éste resulte negativo se podría corroborar dicho resultado con el kit de Romer. Por otro lado, la metodología Real Time PCR 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.

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por UBACyT 20020090100184.

Referencias

- (1) Besler M. Determination of allergens in foods. Trends in analytical chemistry. 2001; 20 (11): 662-672.
- (2) Poms RE. Klein CL. Anklam E. Methods for allergen analysis in food: a review. Food Additives and Contaminants. 2004; 21 (1): 1-31.
- (3) Tsuji H. Kimoto M. Natori Y. Allergens in major crops. Nutrition Research. 2001; 21: 925-934.
- (4) Lehrer SB. Ayuso R. Reese G. Current Understanding of Food Allergens. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2002; 964: 69-85.
- (5) Resolución Conjunta 57/2010 y 548/2010 de la Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_V.pdf, visitada octubre 2012.
- (6) Resolución Conjunta N° 106-2011 y N° 297-2011 de la Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_V.pdf, visitada octubre 2012.
- (7) Código Alimentario Argentino, actualizado 2012. Disponible en: www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp, visitada octubre 2012.
- (8) López Laura B, Binaghi María J, Greco Carola B, Mambrín María C, Cellerino K. y Valencia Mirta E. Salazones y chacinados embutidos secos: detección por electroforesis de especies cárnicas y de proteínas extrínsecas agregadas. DIAETA. 2010. 28 (131) . 7 - 13.
- (9) Chirido F. Añón MC. Fossati CA. Desarrollo de un ELISA de alta detectabilidad y especificidad para la cuantificación de gliadinas en alimentos destinados a enfermos celíacos. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 1996; XXX (4). 389-399.
- (10) Docena G. Fernandez R. Chirido F. Fossati C. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow milk. Allergy. 1996; 51 (6): 412-416.
- (11) Belitz H. Grosch W. Química de los Alimentos. 2ª Edición. Zaragoza, España. Editorial Acribia, S.A. 1997.
- (12) González-Córdova A. Calderón de la Barca A. Cota M. Vallejo-Córdoba B. Detección inmunoquímica de la adulteración de chorizo de cerdo con proteína de soja. Food Sci. Tech. Int. 1998; 4: 257-262.
- (13) Rozenfeld P. Docena GH. Añón MC. Fossati CA. Detection and identification of a soy protein component that cross reacts with caseins from cow milk. Clinical and Experimental Immunology. 2002; 130 (1): 49-58.
- (14) Monaci L, Van Hengel A., 2008. Development of a method for the quantification of whey allergen traces in mixed-fruit juices based on liquid chromatography with mass spectrometric detection. Journal of chromatography A. 1192 ;113-120).
- (15) Polenta G, Godefroy-Benrejeb S, Delahaut P, Dorcas W and Abbot M. 2009. Development of a Competitive ELISA for the detection of Pecan (*Carya illinoensis* (Wangenh.)K. Koch) traces in food. Food Anal. Methods. Vol. 3. N°4. 375 - 381. DOI 10.1007/s12161-009-9075-2.
- (16) ELISA Veratox for soy allergen (Código: 8410). Neogen. 2012. Disponible en: www.neogen.com/Food-Safety/pdf/ProdInfo/Page_V-Soy.pdf, visitada octubre 2012.
- (17) AgraQuant Soy Assay de Romer (COKAL 0448), Disponible en: <http://shop.romerlabs.com/en/AgraQuant-ELISA/AgraQuant-Allergens/AgraQuant-ELISA-Soy>, visitada octubre 2012.
- (18) SureFood® Allergen Soya (Product Code S3101), Disponible en: 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.
- (19) Version 2.0, 2012. Food Industry Guide to the Voluntary Incidental Trace Allergen Labelling (VITAL) Program. Disponible en: www.allergenbureau.net/downloads/vital/VITAL-Guidance-document-15-May-2012.pdf, visitada octubre 2012.