

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

**UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS GENÉTICAS
Y ANTICUERPOS RECOMBINANTES
PARA LA DETECCIÓN DE ALÉRGENOS
ALIMENTARIOS DE ORIGEN VEGETAL**

TESIS DOCTORAL
AINA GARCÍA GARCÍA



Directoras

Dra. Isabel González Alonso

Dra. Teresa García Lacarra

Dra. Rosario Martín de Santos

Madrid, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS



**UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS GENÉTICAS
Y ANTICUERPOS RECOMBINANTES
PARA LA DETECCIÓN DE ALÉRGENOS
ALIMENTARIOS DE ORIGEN VEGETAL**

TESIS DOCTORAL

AINA GARCÍA GARCÍA

Madrid, 2019

©Aina García García, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS



**UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS GENÉTICAS Y ANTICUERPOS
RECOMBINANTES PARA LA DETECCIÓN DE ALÉRGENOS
ALIMENTARIOS DE ORIGEN VEGETAL**

TESIS DOCTORAL

Memoria que, para optar al título de Doctor con mención honorífica de
“Doctorado Internacional”, presenta la graduada
Aina García García

Madrid, 2019



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Aina García García,
estudiante en el Programa de Doctorado en Veterinaria,
de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

Utilización de técnicas genéticas y anticuerpos recombinantes para la detección de alérgenos
alimentarios de origen vegetal

y dirigida por: Isabel González Alonso
Teresa García Lacarra
Rosario Martín de Santos

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 8 de julio de 2019

Fdo.: _____

Madrid, 2019



Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos
Facultad de Veterinaria

Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91-394 3749. Fax: 91-394 3743

M^a ISABEL GONZÁLEZ ALONSO (Profesora Titular de Nutrición y Ciencia de los Alimentos), TERESA GARCÍA LACARRA (Catedrática de Nutrición y Ciencia de los Alimentos) y M^a DEL ROSARIO MARTÍN DE SANTOS (Catedrática de Nutrición y Ciencia de los Alimentos),

CERTIFICAN QUE:

La Tesis Doctoral titulada “Utilización de técnicas genéticas y anticuerpos recombinantes para la detección de alérgenos alimentarios de origen vegetal”, de la que es autora la Graduada en Química Dña. Aina García García, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la UCM, bajo la dirección conjunta de las que suscriben, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor por la UCM con mención honorífica de “Doctorado Internacional”.

Y, para que así conste, firmamos la presente en Madrid, a ocho de julio de dos mil diecinueve.

Las Directoras de la Tesis Doctoral,

Fdo.: Isabel González Alonso

Fdo.: Teresa García Lacarra

Fdo.: Rosario Martín de Santos

A mi madre

“Llegarás cuando vayas
más allá del intento.”

Rosana

“Queda prohibido no sonreír a los problemas,
no luchar por lo que quieres, abandonarlo todo
por miedo, no convertir en realidad tus sueños.”

Pablo Neruda

“The difference between impossible
and possible is a willing heart.”

Lolly Daskal

AGRADECIMIENTOS

Tantas hojas escribiendo con la cabeza y ahora ha llegado el momento de dejar hablar al corazón, porque tal y como dice un sabio proverbio africano: *“si quieres ir rápido, camina solo, pero si quieres llegar lejos, mejor hacerlo en buena compañía”*.

En primer lugar, me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento a mis directoras de Tesis por acogerme dentro de su grupo de investigación. Teresa, gracias por tu completa disposición para ayudarme en todo cuanto he necesitado, tus visitas por el laboratorio siempre nos han sacado de más de un quebradero de cabeza. Isabel, muchas gracias por la gran dedicación que has mostrado para enseñarme a redactar y organizar resultados de manera que todo fuera más comprensible, admiro la paciencia con la que has revisado una y otra vez artículos, comunicaciones y estas hojas que hoy ponen fin a una intensa etapa de aprendizaje. Charo, gracias por la gran confianza que has depositado en mí durante estos años, por las conversaciones motivadoras y, especialmente, por las que me han enseñado tanto de la vida, es envidiable la serenidad con la que has hecho que aborde más de un problema. A las tres, muchas gracias por vuestra cercanía y apoyo.

A las diferentes entidades públicas que han permitido la financiación de este trabajo y al Ministerio de Educación Cultura y Deporte por la concesión de un contrato predoctoral dentro del Programa de Formación de Profesorado Universitario y una ayuda para la realización de una estancia en el extranjero.

Mi más sincero agradecimiento también a todo el profesorado y personal del Departamento por su cálida acogida. A Pablo, por las agradables conversaciones mantenidas por los pasillos. A Juan Miguel, por la inmensa colección de risas que hemos compartido y su inacabable fuente de historias y sabiduría. A Luis, Ana, Paloma, María, Fernanda y Carmen, por vuestras muestras de interés acompañadas siempre por una sonrisa, gracias por ser tan atentos. A Alberto, Santiago, Andrés y Aurora, por haberme ayudado siempre que lo he necesitado. Gracias también al resto de profesores con los que he tenido la suerte de compartir mesa en la hora de la comida, por los amenos ratos de distracción compartidos.

Muchas gracias a los compañeros más veteranos, en especial a Silvia, por tu paciencia y minuciosa dedicación para enseñarme cada rincón del Departamento y el modo de trabajo, aprecio sinceramente todo el tiempo que has dedicado a ello, siempre con una sonrisa y tu curiosamente agradable ironía. A Nicolette e Inés, porque vuestros trabajos de investigación me han servido de guía y han contribuido a enriquecer esta Tesis Doctoral. A Alicia, por las

interminables conversaciones matutinas y el apoyo que me diste en los malos momentos. A Estefanía, Carlos, Sara y Javier, porque las visitas a vuestro laboratorio se tradujeron siempre en ánimos y ganas de continuar. A mi compañera del día a día, Raquel, qué habría sido de estos años sin tenerte ahí a mi lado, gracias por ser mi tercera mano en el laboratorio y una gran amiga que ha sabido escucharme y apoyarme en todo momento. A Satyabrata y Hamid, por traer a nuestro laboratorio culturas tan ricas y por el regalo que ha sido conocerlos. Al innumerable séquito de *Rodríguez et al.* (2014/19), en especial a Marina, Irma, Cristina y Rebeca, por las escapadas madrileñas, los abrazos de apoyo y las divertidas charlas compartidas. A las nuevas incorporaciones del laboratorio, Jose y Edu, por el aire fresco de nuevas ideas y las ganas de continuar en esta línea de investigación. A todos, gracias por ser tan especiales, por vuestra complicidad y ánimos constantes y por los grandes momentos que me habéis regalado en este tiempo.

I would also want to thank Marcos Alcocer for hosting me in his laboratory and for supervising my work. Also thank you to all of his wonderful research group: Sam (and Summer), Rui, Nanxi, Ronja, Marina, Scarlett, and lab technicians for their help, I have really learned and enjoyed with all of you. A Valeria, Marcus, Gabriel, Christian, M^a José y Víctor, por convertir Sutton Bonington en mi hogar durante unos meses, sin vosotros allí no hubiese sido lo mismo.

Quisiera también agradecer todos los buenos momentos que me llevé de mi paso por Químicas, donde empezó mi amor por la ciencia. A Carmen Cámara, Rian, Jon y Noemí por meterme de lleno en mi primer trabajo de investigación y a Elisa y Rafi por compartir mis mismas inquietudes.

A mi familia. En primer lugar, gracias a Marisa y mis difuntos abuelos, porque aunque ya haya pasado el tiempo, sé que las valientes decisiones que tomasteis y vuestro trabajo incesante también han hecho que mi vida haya podido tomar esta dirección.

Gracias mamá, por todo cuanto haces por mi día a día y por aguantar pacientemente cuando no tengo uno de mis mejores momentos, eres mi claro ejemplo de esfuerzo y superación, te quiero. A Julio, por ser la mente serena que siempre nos hace entrar en razón. A mi hermana Sara, gracias por hacerme sentir bien con todas las decisiones que he tomado y por apoyarme incondicionalmente, saber que contamos siempre la una con la otra es único. A mi padre y mis tí@s, por vuestro constante apoyo y preocupación por saber que todo me iba bien. En especial, a Marisol por la ayuda prestada en los últimos meses.

Quisiera también agradecer los necesarios y divertidos ratos que durante este tiempo me han ofrecido mis inseparables amig@s. A mis Villalbinos más queridos, gracias por ser únicos y hacerme sentir tan cómoda cuando estamos juntos. A las locas Mocatrices, porque las risas con vosotras me hacen recuperar energía y volver a la carga tras un día juntas. A Ana y Rebe, gracias por escucharme, darme grandes consejos y chincharme como nadie. A Nerea, Pelayo y la reciente incorporación Alena, gracias por enseñarme lo importante que es ser buena gente, aunque sea difícil superaros lo intentaré.

Estefanía, la lengua española todavía no tiene la palabra adecuada que demuestre todo el agradecimiento que te mereces. Si hoy escribo estas palabras, es gracias a ti, porque tú me animaste cada día a 'ponerme a tope' y me ayudaste a despejarme cuando ya no daba lo mejor de mí. Gracias por hacer que las metas sean alcanzables, estoy segura de que juntas superaremos muchas más. Mi más cálido agradecimiento también a mi nueva familia en Leganés, especialmente a Yolanda, Jose, Sergio, Juanma y Ana, gracias por acogerme como a una más.



ÍNDICE

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
RESUMEN/SUMMARY	1
I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR	11
II. INTRODUCCIÓN	17
II. 1. REACCIONES ADVERSAS A LOS ALIMENTOS.....	19
II. 1. 1. ALERGIA ALIMENTARIA	20
II. 1. 1. 1. Alergia alimentaria mediada por IgE (hipersensibilidad tipo I)	23
II. 1. 1. 2. Alergia alimentaria no mediada por IgE	25
II. 1. 2. HIPERSENSIBILIDAD NO ALÉRGICA A LOS ALIMENTOS.....	26
II. 1. 3. REACCIONES ADVERSAS RELACIONADAS CON EL CONSUMO DE CEREALES CON GLUTEN	27
II. 1. 3. 1. Alergia al trigo	29
II. 1. 3. 2. Enfermedad celiaca	30
II. 1. 3. 3. Sensibilidad al gluten no celiaca	34
II. 1. 4. MARCO LEGISLATIVO: INFORMACIÓN ALIMENTARIA FACILITADA AL CONSUMIDOR	36
II. 2. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETECCIÓN DE ALÉRGENOS ALIMENTARIOS.....	41
II. 2. 1. TÉCNICAS BASADAS EN LA DETECCIÓN DE ADN.....	42
II. 2. 1. 1. PCR y PCR en tiempo real	43
II. 2. 1. 2. Amplificación dependiente de ligasa de múltiples sondas	45
II. 2. 1. 3. Amplificación de ADN isotérmica mediada por bucle	47
II. 2. 2. TÉCNICAS BASADAS EN LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS.....	49
II. 2. 2. 1. Inmunoensayos	49
II. 2. 2. 2. Espectrometría de masas.....	53
II. 2. 2. 3. Biosensores	55
II. 3. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN <i>in vitro</i> DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS.....	57
II. 3. 1. TECNOLOGÍA DE <i>PHAGE DISPLAY</i>	58
II. 3. 2. <i>BIOPANNING</i>	61

III. RESULTS AND DISCUSSION.....	65
III. 1. MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA) FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF DNA FROM SUNFLOWER, POPPY, FLAXSEED, SESAME AND SOY ALLERGENIC INGREDIENTS IN COMMERCIAL FOOD PRODUCTS	67
III. 2. USE OF MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA) FOR SCREENING OF WHEAT, BARLEY, RYE AND OATS IN FOODS.....	79
III. 3. A SENSITIVE AND SPECIFIC REAL-TIME PCR TARGETING DNA FROM WHEAT, BARLEY AND RYE TO TRACK GLUTEN CONTAMINATION IN MARKETED FOODS.....	91
III. 4. A NOVEL APPROACH TO PRODUCE PHAGE ANTIBODY FRAGMENTS (dAbs) FOR THE DETECTION OF GLUTEN IN FOODS	103
III. 5. PRODUCTION OF GENETIC CONSTRUCTS FOR GENERATION OF LUMINESCENT AND FLUORESCENT SINGLE-DOMAIN ANTIBODIES AGAINST GLUTEN IN THE METHYLOTROPHIC YEAST <i>Pichia pastoris</i>	129
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	153
IV. 1. EMPLEO DE TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DEPENDIENTE DE LIGASA DE MÚLTIPLES SONDAS (MLPA) PARA LA DETECCIÓN DE INGREDIENTES ALERGÉNICOS DE ORIGEN VEGETAL EN ALIMENTOS	156
IV. 1. 1. DESARROLLO DE LOS SISTEMAS MLPA DE SEMILLAS Y DE CEREALES	158
IV. 1. 2. APLICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE MLPA PARA LA DETECCIÓN DE ESPECIES VEGETALES EN PRODUCTOS COMERCIALES	166
IV. 2. EMPLEO DE TÉCNICAS DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE CEREALES CON GLUTEN (TRIGO, CEBADA Y CENTENO) EN ALIMENTOS	173
IV. 2. 1. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL SISTEMA DE PCR EN TIEMPO REAL	174
IV. 2. 2. APLICACIÓN DEL SISTEMA DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE CEREALES CON GLUTEN EN PRODUCTOS COMERCIALES	178
IV. 2. 3. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS PRODUCTOS COMERCIALES MEDIANTE PCR Y ELISA	181
IV. 3. OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES (dAb) MEDIANTE LA TECNOLOGÍA DE <i>PHAGE DISPLAY</i> PARA LA DETECCIÓN DE GLUTEN EN ALIMENTOS.....	187
IV. 3. 1. AISLAMIENTO DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES FRENTE AL GLUTEN.....	188
IV. 3. 2. DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTO BASADO EN FAGO-ANTICUERPOS RECOMBINANTES (dAb) PARA LA DETECCIÓN DE GLUTEN EN ALIMENTOS	191
IV. 3. 3. APLICACIÓN DEL INMUNOENSAYO DESARROLLADO PARA LA DETECCIÓN DE GLUTEN EN PRODUCTOS COMERCIALES	196
IV. 4. OBTENCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN PARA LA PRODUCCIÓN EN LA LEVADURA METILOTRÓFICA <i>Pichia pastoris</i> DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES (dAb) FRENTE AL GLUTEN CON PROPIEDADES LUMINISCENTES.....	201

V. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	209
VI. TRABAJO FUTURO	215
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	223
ANEXO. OTRAS PUBLICACIONES	247

LISTA DE ABREVIATURAS

α -MF	Factor de acoplamiento α (del inglés <i>α-mating factor</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNmc	ADN monocatenario
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
ALP	Fosfatasa alcalina (del inglés <i>alkaline phosphatase</i>)
AOX	Alcohol oxidasa (del inglés <i>alcohol oxidase</i>)
APPCC	Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico
ARN	Ácido ribonucleico
ATIs	Inhibidores de la α -amilasa/tripsina (del inglés <i>amylase-trypsin inhibitors</i>)
BBQ	<i>Blackberry® Quencher</i>
BCA	Ácido bicinconínico (del inglés <i>bicinchoninic acid</i>)
BFP	Proteína azul fluorescente (del inglés <i>blue fluorescent protein</i>)
BIP	Cebador interno inverso (del inglés <i>backward internal primer</i>)
BLAST	Herramienta informática de alineamiento de secuencias de tipo local (del inglés <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
BLP	Cebador bucle inverso (del inglés <i>backward loop primer</i>)
BMGY	Medio complejo tamponado con glicerol y extracto de levadura (del inglés <i>Buffered minimal glycerol-complex yeast extract medium</i>)
BMMY	Medio complejo tamponado con metanol y extracto de levadura (del inglés <i>Buffered minimal methanol-complex yeast extract medium</i>)
bp	Pares de bases (del inglés <i>base pairs</i>)
BRC	<i>British Retail Consortium</i>
BSA	Albúmina sérica bovina (del inglés <i>bovine serum albumin</i>)
CDEIA	Anafilaxia inducida por ejercicio dependiente de cereales (del inglés <i>cereal-dependent exercise-induced anaphylaxis</i>)
CDR	Regiones determinantes de la complementariedad (del inglés <i>complementary determining regions</i>)
CE	Electroforesis capilar (del inglés <i>capillary electrophoresis</i>)
	Comisión Europea
CG	Citosina y guanina
CH	Cadena constante pesada (del inglés <i>constant heavy</i>)
CL	Cadena constante ligera (del inglés <i>constant light</i>)
CLIA	Inmunoensayo de quimioluminiscencia (del inglés <i>chemiluminescence immunoassay</i>)
Cp	Punto de cruce (del inglés <i>crossing point</i>)
CPA	Célula presentadora de antígenos
CRF-INIA	Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
CRM	Material de referencia certificado (del inglés <i>certified reference material</i>)
Ct	Ciclo umbral (del inglés <i>cycle threshold</i>)
Cy	Cianina (del inglés <i>cyanine</i>)

LISTA DE ABREVIATURAS

dAb	Anticuerpo de dominio único (del inglés <i>single domain-antibodie</i>)
DBPCFC	Prueba de provocación oral doble ciego controlada por placebo (del inglés <i>double-blind placebo-controlled food challenge</i>)
DFL	Dispositivo de flujo lateral
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Ditiotreitol (del inglés <i>dithiothreitol</i>)
dUTP	Desoxiuridina trifosfato (del inglés <i>deoxyuridine triphosphate</i>)
E	Eficiencia (del inglés <i>efficiency</i>)
EAACI	Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (del inglés <i>European Academy of Allergy and Clinical Immunology</i>)
EC	<i>European Commission</i>
ECL	Quimioluminiscencia mejorada (del inglés <i>enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético (del inglés <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (del inglés <i>European Food Safety Authority</i>)
EGFP	Proteína verde fluorescente mejorada (del inglés <i>enhanced green fluorescent protein</i>)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés <i>enzymed-linked immunosorbent assay</i>)
EMBOSS	<i>European Molecular Biology Open Software Suite</i>
ENGL	<i>European Network of GMO Laboratories</i>
ER	Retículo endoplásmico (del inglés <i>endoplasmic reticulum</i>)
ESI	Ionización por electroespray (del inglés <i>electrospray ionization</i>)
EU	Unión Europea (del inglés <i>European Union</i>)
Fab	Fragmento de unión al antígeno (del inglés <i>fragment-antigen-binding</i>)
FACE	Federación de Asociaciones de Celiacos de España
FAM	Carboxifluoresceína (del inglés <i>carboxyfluorescein</i>)
Fc	Región del fragmento cristalizabile (del inglés <i>fragment crystallizable region</i>)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (del inglés <i>Food and Drug Administration</i>)
FDE	<i>FoodDrink Europe</i>
FIP	Cebador interno directo (del inglés <i>forward internal primer</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (del inglés <i>fluorescein isotiocyanate</i>)
FLISA	Inmunoensayo de fluorescencia (del inglés <i>fluorescence-linked immunosorbent assay</i>)
FLP	Cebador bucle directo (del inglés <i>forward loop primer</i>)
FODMAPs	Oligosacáridos, disacáridos, monosacáridos y polialcoholes fermentables (del inglés <i>fermentable oligo-, di-, and mono-saccharides and polyols</i>)
FPIES	Síndrome de enterocolitis inducida por proteínas alimentarias (del inglés <i>food protein-induced enterocolitis syndrome</i>)
FR	Regiones marco (del inglés <i>framework</i>)
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster (del inglés <i>Förster resonance energy transfer</i>)
FSA	Agencia de Normas Alimentarias (del inglés <i>Food Standards Agency</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (del inglés <i>green fluorescent protein</i>)
HLA	Antígeno leucocitario humano (del inglés <i>human leukocyte antigen</i>)
HMW	Alto peso molecular (del inglés <i>high molecular weight</i>)

HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (del inglés <i>high-performance liquid chromatography</i>)
HRP	Peroxidasa de rábano (del inglés <i>horseradish peroxidase</i>)
icS	Sorbitol frío (del inglés <i>ice-cold sorbitol</i>)
IFAAM	Enfoques Integrados para la Gestión de los Alérgenos Alimentarios y el Riesgo de Alergia (del inglés <i>Integrated Approaches to Food Allergen and Allergy Risk Management</i>)
IFN- γ	Interferón- γ
IFS	<i>International Featured Standards</i>
Ig	Inmunoglobulina
IGS	Región espaciadora intergénica (del inglés <i>intergenic spacer</i>)
IL	Interleuquina
IMGT	<i>InMune Gene Tics</i>
IRMM	Instituto de Materiales y Medidas de Referencia (del inglés <i>Institute for Reference Materials and Measurements</i>)
IT	Trampa de iones (del inglés <i>ion trap</i>)
ITS	Espaciador interno de la transcripción (del inglés <i>internal transcribed spacer</i>)
LAMP	Amplificación de ADN isotérmica mediada por bucle (del inglés <i>loop-mediated isothermal amplification</i>)
LB	Medio de cultivo Luria-Bernati (del inglés <i>Luria-Bernati broth</i>)
LHS	Secuencia de hibridación izquierda (del inglés <i>left hybridizing probe</i>)
LIE	Linfocitos intraepiteliales
LMW	Bajo peso molecular (del inglés <i>low molecular weight</i>)
LOD	Límite de detección (del inglés <i>limit of detection</i>)
LOQ	Límite de cuantificación (del inglés <i>limit of quantification</i>)
LPA	Amplificación dependiente de ligasa de sondas (del inglés <i>ligation-dependent probe amplification</i>)
LPO	(Hemi-)sonda de oligonucleótidos izquierda (del inglés <i>left probe oligonucleotide</i>)
mAb	Anticuerpo monoclonal (del inglés <i>monoclonal antibody</i>)
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz (del inglés <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MCS	Sitio de clonación múltiple (del inglés <i>multiple cloning site</i>)
MLPA	Amplificación dependiente de ligasa de múltiples sondas (del inglés <i>multiplex ligation probe amplification</i>)
M-PBS	Tampón fosfato salino con leche desnatada (del inglés <i>skimmed milk phosphate-buffered saline</i>)
MRM	Monitorización de reacciones múltiples (del inglés <i>multiple reaction monitoring</i>)
MS	Espectrometría de masas (del inglés <i>mass spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MW	Peso molecular (del inglés <i>molecular weight</i>)
NC	Control negativo (del inglés <i>negative control</i>)
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica (del inglés <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NGGS	Sensibilidad al gluten no celiaca (del inglés <i>non-coeliac gluten sensitivity</i>)
NFQ	Receptores no fluorescentes (del inglés <i>non fluorescent quenchers</i>)
NIAID	Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (del inglés <i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i>)

LISTA DE ABREVIATURAS

nt	Nucleótido
OD	Densidad óptica (del inglés <i>optical density</i>)
ORF	Marco abierto de lectura (del inglés <i>open reading frame</i>)
PAC	Control positivo de amplificación (del inglés <i>positive amplification control</i>)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (del inglés <i>polyacrylamide del electrophoresis</i>)
pb	Pares de bases
PBS	Sitio de unión de cebadores (del inglés <i>primer binding site</i>)
	Tampón fosfato salino (del inglés <i>phosphate-buffered saline</i>)
PBL	Linfocitos de sangre periférica (del inglés <i>peripheral blood lymphocytes</i>)
PC	Control positivo (del inglés <i>positive control</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polietilenglicol (del inglés <i>polyethylene glycol</i>)
Pho	Fosforilación (del inglés <i>phosphorylation</i>)
PMF	Huella peptídica (del inglés <i>peptide mass fingerprinting</i>)
PVDF	Polifluoruro de vinilideno (del inglés <i>polyvinylidene difluoride</i>)
PWG	Grupo de Trabajo en Prolaminas (del inglés <i>Prolamin Working Group</i>)
Q	Cuadrupolo (del inglés <i>quadrupole</i>)
QCM	Microbalanza de cristal de cuarzo (del inglés <i>quartz crystal microbalance</i>)
qLAMP	LAMP en tiempo real
RASFF	Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (del inglés <i>Rapid Alert System for Food and Feed</i>)
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribosómico (del inglés <i>ribosomal deoxyribonucleic acid</i>)
RFP	Proteínas rojas fluorescentes (del inglés <i>red fluorescent proteins</i>)
RHS	Secuencia de hibridación derecha (del inglés <i>right hybridizing probe</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (del inglés <i>ribonucleic acid</i>)
RPO	(Hemi-)sonda de oligonucleótidos derecha (del inglés <i>right probe oligonucleotide</i>)
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico (del inglés <i>ribosomal ribonucleic acid</i>)
RSDr	Desviación estándar relativa (del inglés <i>relative standard deviation</i>)
RT	Temperatura ambiente (del inglés <i>room temperature</i>)
SCD	Secuencia de hibridación del cebador derecho
scFv	Fragmento variable de cadena sencilla (del inglés <i>single chain variable fragment</i>)
SCI	Secuencia de hibridación del cebador izquierdo
SD	Desviación estándar (del inglés <i>standard deviation</i>)
SDS	Dodecilsulfato sódico (del inglés <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SGNC	Sensibilidad al gluten no celiaca
SHD	Secuencia de hibridación derecha
SHI	Secuencia de hibridación izquierda
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (del inglés <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SOC	Medio óptimo con represión catabólica (del inglés <i>Super optimal broth with catabolite repression</i>)
SPR	Resonancia de plasmones superficiales (del inglés <i>surface plasmon resonance</i>)
SPT	Test por punción (del inglés <i>skin prick test</i>)

SSP	Proteína de almacenamiento de la semilla (del inglés <i>seed storage protein</i>)
TBS	Tampón Tris salino (del inglés <i>Tris buffered saline</i>)
T _m	Temperatura de fusión (del inglés <i>melting temperature</i>)
TMB	Tetrametilbenzidina (del inglés <i>tetramethylbenzidine</i>)
TNF- α	Interferón α
TOF	Tiempo de vuelo (del inglés <i>time of flight</i>)
tTG	Transglutaminasa tisular
UE	Unión Europea
VH	Cadena variable pesada (del inglés <i>variable heavy</i>)
VHH	Cadena variable pesada de anticuerpos de camélidos (<i>variable heavy chain of a camelid antibody</i>)
VITAL	Etiquetado Voluntario de Alérgenos Traza Accidentales (del inglés <i>Voluntary Incidental Trace Allergen Labelling</i>)
VL	Cadena variable ligera (del inglés <i>variable light</i>)
WAO	Organización Mundial de Alergia (del inglés <i>World Allergy Organization</i>)
WBR	Trigo, cebada y centeno (del inglés <i>wheat, barley and rye</i>)
WBRm	Mezcla de trigo, cebada y centeno (del inglés <i>wheat, barley and rye mixture</i>)
WBR.S.S.	Sistema específico de PCR en tiempo real de trigo, cebada y centeno (del inglés <i>wheat, barley and rye specific system</i>)
WDEIA	Anafilaxia inducida por ejercicio dependiente de trigo (del inglés <i>wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis</i>).
YPD	<i>Yeast extract peptone dextrose medium</i>

ÍNDICE DE TABLAS

II. INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Manifestaciones clínicas de las alergias alimentarias (Waserman et al., 2018).....	25
Tabla 2. Manifestaciones clínicas de la enfermedad celiaca y principales grupos de riesgo (adaptada de Connors et al., 2018).....	33
Tabla 3. Métodos empleados en la detección de alérgenos alimentarios (adaptado de EFSA, 2014).....	41

III. RESULTS AND DISCUSSION

III. 1. MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA) FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF DNA FROM SUNFLOWER, POPPY, FLAXSEED, SESAME AND SOY ALLERGENIC INGREDIENTS IN COMMERCIAL FOOD PRODUCTS

Table 1. Specificity of the allergen-MLPA system.....	71
Table 2. Half-probes and primers used in the MLPA method.....	72
Table 3. Description of the primers and probes used in the Taqman real time PCR confirmatory assay.....	73
Table 4. Results after MLPA and real time PCR analysis of 56 commercial food products.....	76

III. 2. USE OF MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA) FOR SCREENING OF WHEAT, BARLEY, RYE AND OATS IN FOODS

Table 1. Specificity of the cereal-MLPA system.....	83
Table 2. Probes and primers of the MLPA systems.....	84
Table 3. Results of the MLPA and real-time PCR analysis of 40 commercial food products.....	88

III. 3. A SENSITIVE AND SPECIFIC REAL-TIME PCR TARGETING DNA FROM WHEAT, BARLEY AND RYE TO TRACK GLUTEN CONTAMINATION IN MARKETED FOODS

Table 1. Specificity of the WBR real-time PCR system for the analysis of DNA extracts from the cereal seeds provided by the Spanish National Centre for Plant Genetic Resources (CRF-INIA).....	94
Table 2. List of heterologous plant and animal species which did not yield amplification signal when tested in the WBR real-time PCR specificity assays.....	95
Table 3. DNA sequences and description of the primers and probes used in this study.....	95
Table 4. Analysis of DNA dilutions of the individual mixtures of wheat, barley and rye cultivars by WBR real-time PCR system.....	96
Table 5. Trueness and repeatability of the WBR real-time PCR system.....	96
Table 6. Results of the WBR real-time PCR analysis of 220 commercial products.....	97

Table 7. *Comparative analysis of food retail samples by the WBR-specific PCR system and the R5-based ELISA.* 100

III. 4. A NOVEL APPROACH TO PRODUCE PHAGE ANTIBODY FRAGMENTS (dAbs) FOR THE DETECTION OF GLUTEN IN FOODS

Table 1. *List of heterologous plant species which did not show cross-reactivity when tested in the indirect phage-ELISA with clones dAb8E and dAb4B.* 122

Table 2. *Results obtained for the detection of gluten in various commercial food products using the developed indirect dAb8E-phage ELISA and the sandwich monoclonal R5 antibody.* 123

III. 5. PRODUCTION OF GENETIC CONSTRUCTS FOR GENERATION OF LUMINESCENT AND FLUORESCENT SINGLE DOMAIN ANTIBODIES AGAINST GLUTEN IN THE METHYLOTROPHIC YEAST *Pichia pastoris*

Table 1. *List of primers employed in this work.* 145

Table 2. *List and features of the constructed plasmids.* 146

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4. *Hemi-sondas diseñadas para la detección de especies vegetales alergénicas en alimentos.* ... 163

Tabla 5. *Sistemas de PCR en tiempo real (cebadores específicos y sondas de hidrólisis Taqman®) empleados para la confirmación de los resultados obtenidos en los ensayos de MLPA desarrollados en esta Tesis Doctoral.* 170

Tabla 6. *Comparación de los límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) obtenidos en el análisis del patrón de gliadina-PWG con los fago-anticuerpos dAb8E y dAb4B mediante la técnica de ELISA indirecto. Se muestran también los niveles de gluten a los que corresponderían dichos límites en un producto comercial analizado mediante estos fago-anticuerpos.* 195

ÍNDICE DE FIGURAS

II. INTRODUCCIÓN

Figura 1. Clasificación de las reacciones adversas a los alimentos (Johansson et al., 2004; Rosas, 2006).....	20
Figura 2. Diagrama de la prevalencia mundial de la alergia alimentaria (adaptada de Renz et al., 2017).....	22
Figura 3. Translocación del gluten desde el lumen hasta la lámina propia a través de mecanismos paracelulares y transcelulares. Cascada de reacciones desencadenadas por el sistema inmune innato y adaptativo tras la exposición a fragmentos de gluten. LIE: linfocitos intraepiteliales; tTG: transglutaminasa tisular; CPA: célula presentadora de antígeno.....	32
Figura 4. Árbol filogenético de los cereales más comúnmente empleados en alimentación humana. F: familia, SF: subfamilia, T: tribu, G: género, NC: nombre común (adaptada de Mamone et al., 2011).....	36
Figura 5. Representación de los 14 grupos de ingredientes de declaración obligatoria recogidos en el Reglamento (UE) 1169/2011 (Anexo II) por causar alergias o intolerancias alimentarias.....	38
Figura 6. Esquema de las hemi-sondas empleadas para la detección de secuencias específicas de ADN mediante la técnica de MLPA.....	47
Figura 7. Representación esquemática de los cebadores empleados en la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle en tiempo real (qLAMP).....	48
Figura 8. Representación esquemática de una inmunoglobulina IgG y de algunos de los principales fragmentos de anticuerpos empleados en técnicas inmunológicas: fragmento de unión al antígeno (Fab) fragmento variable de cadena pesada (scFv) y anticuerpo de dominio único (dAb). VH: región variable de la cadena pesada; CH(1-3): región constante de la cadena pesada; VL: región variable de la cadena ligera; CL: región constante de la cadena ligera; CDR: regiones hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad. Puentes disulfuro indicados en amarillo.....	50
Figura 9. Esquema de un dispositivo de flujo lateral.....	52
Figura 10. Representación esquemática de un biosensor (adaptada de Yasmin et al. 2016).....	56
Figura 11. Representación esquemática de las cinco proteínas de recubrimiento del fago M13 (pIII, pVI, pVIII, pVII y pIX), número de copias de estas proteínas que contiene cada virión y su respectivo peso molecular. ADNmc: ADN monocatenario.....	59
Figura 12. Representación esquemática de un sistema de phage display con dos fuentes de proteína pIII: fago auxiliar y fagémido. El virión resultante presenta un fenotipo heterogéneo combinación de ambos genotipos. gIII: gen que codifica para la proteína de recubrimiento pIII; Kan y Amp: genes de resistencia a la kanamicina y ampicilina, respectivamente.....	61

Figura 13. Representación esquemática del proceso de selección in vitro de anticuerpos recombinantes mediante el uso de fagémidos por phage display..... 63

III. RESULTS AND DISCUSSION

III. 1. MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA) FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF DNA FROM SUNFLOWER, POPPY, FLAXSEED, SESAME AND SOY ALLERGENIC INGREDIENTS IN COMMERCIAL FOOD PRODUCTS

Figure 1. Capillary electrophoresis of the MLPA system using a mixture of sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy DNAs (20 ng/μl) as template. All five targets plus the positive amplification control (PAC) are detected in one experiment. 74

Figure 2. (A): Capillary electrophoresis after allergen MLPA of a model cookie spiked with sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy at 10 mg/kg concentration. (B, C): MLPA analysis of commercial food products 4, 8 respectively (Table 3). 75

III. 2. USE OF MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA) FOR SCREENING OF WHEAT, BARLEY, RYE AND OATS IN FOODS

Figure 1. Electropherograms obtained from the MLPA analysis of (A) a mixture of wheat, barley, rye and oats DNAs (20 ng/μL) and (B) a self-prepared model cake with decreasing spiked levels of the target cereals: (1) 500 mg/kg, (2) 50 mg/kg and (3) 10 mg/kg (4) un-spiked maize dough. 86

Figure 2. Electropherograms obtained from the MLPA analysis of different commercial food products. A, B, C, D: products 3, 15, 8 and 12, respectively (Table 3), containing several target cereals. E, F: products 31 and 36, respectively (Table 3), not containing wheat, barley, rye nor oats. 89

III. 3. A SENSITIVE AND SPECIFIC REAL-TIME PCR TARGETING DNA FROM WHEAT, BARLEY AND RYE TO TRACK GLUTEN CONTAMINATION IN MARKETED FOODS

Figure 1. Deoxyribonucleic acid sequence alignment of the ITS region PCR products from common wheat (*Triticum aestivum* vulgare DQ981410.1), durum wheat (*Triticum turgidum* durum HQ285920.1), rye (*Secale cereale* AF303400.1), barley (*Hordeum vulgare* AJ608147.1), oats (*Avena sativa* AY520821.1), rice (*Oryza sativa* JN402192.1), soy (*Glycine max* FJ609734.1) and maize (*Zea mays* DQ683016.1). Primers WBR-ITSfw and WBR-ITSrev, and probe WBR-ITSp are highlighted. 98

Figure 2. Crossing point values (Cp) obtained from the analysis of reference wheat/barley/rye binary mixtures (WBRm) plotted versus the logarithm of the target concentrations (0.001 %, 0.005 %, 0.01 %, 0.02 %, 0.05 %, 0.1 % and 1 %) which could be theoretically equated to 1, 5, 10, 20, 50, 100 y 1000 mg/kg of gluten. Error bars indicate the standard deviation and mean value derived from three independent DNA extractions of the untreated (●), soft heat-treated (□) and intense heat-treated binary mixtures (Δ) in maize flour. Right chart summarizes the calculated in-house-validation parameters of the WBR real-time PCR system (linearity test, regression line, and sensitivity). 98

III. 4. A NOVEL APPROACH TO PRODUCE PHAGE ANTIBODY FRAGMENTS (dAbs) FOR THE DETECTION OF GLUTEN IN FOODS

- Figure 1.** Indirect phage-ELISA analysis of the single-domain antibody naïve library and the polyclonal phage rescued after each round of selection. Results show the absorbance values (450 nm) obtained against common wheat extract, the biotinylated synthetic peptide used for affinity enrichment of the library and streptavidin un-treated plates. Mean values of three independent determinations and standard deviation for each set of data are shown.....124
- Figure 2.** Amino acid sequences analysis of the four selected gluten binding dAb clones deduced from the nucleotide sequences by Expasy Web site. Germline VH3-23 sequence (UniProtKB accession number P01764.2) was included for comparison purposes. Frameworks (FR1-4) and complementary determining regions of the variable domain of the heavy chain (CDR1-3) are indicated according to IMGT system.....125
- Figure 3.** DAb-phage reactivity analysis of the two selected clones with suitable specificity results. Individual reference mixtures of the three main gluten-containing cereals (wheat, n = 40; barley, n = 10; and rye, n = 10) were analysed in the concentration range 0.1 to 30 µg/mL with the (A) dAb8E-phage and (B) dAb4B-phage. (C) Comparison of the PWG-gliadin standard curves by means of the dAb8E and dAb4B indirect phage-ELISA performed with gliadin dilutions from 0.01 to 25 µg/mL. (D) Decreasing number of phage particles from dAb8E and dAb4B clones were applied to 1 µg/mL of the PWG-gliadin reference material to confirm recognition in a concentration-dependent manner. In all cases (A-D), mean values and standard deviation of triplicate results from one representative experiment are shown.....126
- Figure 4.** Results obtained from the indirect dAb8E-phage ELISA: (A) Representative dose-response curve from the analysis of experimental rice-based binary mixtures spiked with decreasing amounts of a proportional mixture of wheat, barley and rye (WBRm) in the range 0.1-100 mg/g; (B) Study of the influence of heat treatment intensity on assay performance by analyzing serial protein dilutions of the un-treated, softly heat-treated (160 °C/13 min) and intensely heat-treated (200 °C/20 min) WBRm extracts. (C) Linear regression obtained from the analysis of the PWG-gliadin standard material (0.01-2.5 µg/mL) used to interpret the gluten content of the tested commercial food products. Each curve shows the average value and standard deviation of triplicate results from one representative experiment.....127

III. 5. PRODUCTION OF GENETIC CONSTRUCTS FOR GENERATION OF LUMINESCENT AND FLUORESCENT SINGLE DOMAIN ANTIBODIES AGAINST GLUTEN IN THE METHYLOTROPHIC YEAST *Pichia pastoris*

- Figure 1.** (A) Scheme of the acceptor plasmid (pMJA282) used for the construction of expression vectors to produce recombinant proteins secreted by *Pichia pastoris*. MCS (multiple cloning site). (B) Kex2 cleavage site at the end of the prepro-region α -mating factor secretion signal and the engineered single domain antibody (sdAb) sequence in frame with the secretion signal. The shaded nucleotide has been mutated from the original sequence (Q → E).....147
- Figure 2.** (A) Map of the expression vectors obtained for the recombinant production of single domain antibodies against gluten (dAb8E and dAb4B) and their respective cloned sequences. (B) Map of the expression vectors obtained for the recombinant production

of chimeric dAbs fused to luminescent and red fluorescent proteins (Lucia, DsRed-Express2 and mCherry) and their respective cloned sequences.148

Figure 3. (A) Dot-blotting analysis of induced and non induced culture supernatants from five isolated clones of *P. pastoris* transformed with pMJA302 and pMJA303. The PVDF membrane was revealed with a mouse monoclonal anti-c-myc antibody. NC: PBS as negative control. PC: scFv antibody fragment containing the c-myc epitope. (B) SDS-PAGE and Western Blot analysis of the supernatant from one selected clone transformed with pMJA302 (line 1, single domain antibody fragment MW ~ 15 kDa) and the scFv used as positive control (line 2, single-chain antibody fragment MW ~ 30 kDa). The PVDF membrane was revealed with a rabbit polyclonal anti-HisTag-HRP antibody.....149

Figure 4. Bar charts and pictures illustrating the expression levels of the *P. pastoris* transformed clones. (A) Luminescence signals obtained from the supernatants of 24 induced clones transformed with the Lucia expression vectors (pMJA311 and pMJA312) and 24 induced clones transformed with the red fluorescent proteins (RFP) expression vectors as negative control. (B) Picture of flasks exhibiting coloured cells after the induction of two different clones transformed with the expression vectors of the red (mCherry) and orange (DsRed-Express2) fluorescent proteins. (C) Comparison of the fluorescence signals obtained for the supernatants and cell cultures of 24 induced clones transformed with the mCherry expression vectors (pMJA304 and pMJA309). (D) Comparison of the fluorescence signals obtained for the supernatants and cell cultures of 24 induced clones transformed with the DsRed-Express2 expression vectors (pMJA313 and pMJA314).....150

Figure 5. (A) SDS-PAGE and Western Blot analysis of Ni-column purified supernatant from one selected clone transformed with pMJA304: (lines 1-6) different fractions of the purified dAb8E-mCherry (MW~37.7 kDa), (line 7) flow-through of the column and (line 8) PBS. The PVDF membrane was revealed with a rabbit polyclonal anti-HisTag-HRP antibody. (B) Picture of a glass vial containing the purified dAb8E-mCherry protein and a representative image of the structure of this kind of chimeric nanobodies (Rothbauer et al., 2006). (C) Amino acid sequence of the dAb8E-mCherry recombinant protein. Red amino acids in bold correspond to the peptides identified by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry and the underlined amino acids correspond to the complementary determining regions of the variable domain of the heavy chain (CDR1-3) in the dAb sequences according to IMGT system. (D) ELISA analysis of two-fold PWG-gliadin serial dilutions by means of the purified dAb8E-mCherry revealed with the anti-HisTag-HRP antibody.151

Figure 6. Scheme of the site-directed mutagenesis of the pMJA304 plasmid to remove the internal PstI recognition site.152

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 14. Representación esquemática de la región del ADN ribosómico en especies vegetales. Se muestra la repetición en tándem dentro de un determinado locus cromosómico de las regiones codificantes (18S-5.8S-26S), separadas dentro de un mismo bloque por los espaciadores internos de la transcripción (ITS1 e ITS2) y entre bloques mediante la región espaciadora intergénica (IGS) (adaptada de Poczai et al., 2010).
.....159

Figura 15.	<i>Esquema de la composición estructural de las hemi-sondas de MLPA con las principales reglas recomendadas para su diseño por la compañía MRC-Holland.</i>	<i>164</i>
Figura 16.	<i>Familia de proteínas fluorescentes derivadas de DsRed. Los círculos muestran el color de longitud de onda de excitación/emisión de la proteína. Las dos proteínas seleccionadas en este trabajo de investigación están resaltadas (adaptado de la base de datos FPbase, www.fpbase.org).</i>	<i>204</i>
Figura 17.	<i>La levadura Pichia pastoris puede expresar proteínas recombinantes de manera intracelular o extracelular. La ruta de secreción involucra el paso de las proteínas por diferentes orgánulos celulares, como el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, lo que ofrece la posibilidad de obtener proteínas con modificaciones post-traduccionales pero también puede dar lugar al efecto de "cuello de botella" que bloquea la ruta de secreción.</i>	<i>206</i>
 VI. TRABAJO FUTURO		
Figura 18.	<i>Modelado de los anticuerpos de dominio único (dAbs) frente al gluten obtenidos en esta Tesis Doctoral empleando el servidor Rosetta.</i>	<i>220</i>
Figura 19.	<i>Esquema metodológico para la generación de una genoteca de fago-anticuerpos a partir de donantes celíacos para la obtención de anticuerpos recombinantes frente al gluten (adaptada de Diebold y Krawczyk, 2017).</i>	<i>221</i>

The page is framed by two overlapping rectangular borders. The inner border is a dark blue line, and the outer border is a light blue line. Both are centered on the page.

RESUMEN
SUMMARY

UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS GENÉTICAS Y ANTICUERPOS RECOMBINANTES PARA LA DETECCIÓN DE ALÉRGENOS ALIMENTARIOS DE ORIGEN VEGETAL

El correcto etiquetado de los alimentos es un elemento fundamental para garantizar la seguridad alimentaria y prevenir los fraudes comerciales. En este marco, el Reglamento (CE) 178/2002 reconoce a los consumidores el derecho a estar debidamente informados respecto a los alimentos que adquieren para que puedan elegir con conocimiento de causa los productos adecuados a sus necesidades. Este hecho se hace especialmente relevante en el caso de personas que sufren algún tipo de alergia alimentaria dado que, en estos individuos, incluso pequeñas cantidades del alérgeno pueden desencadenar una reacción adversa severa. Para proteger a los consumidores alérgicos, el Reglamento (UE) 1169/2011 establece un total de 14 grupos de ingredientes que obligatoriamente deben declararse en el etiquetado de los productos que los contengan por ser los causantes de una elevada parte de las reacciones alérgicas humanas. Para dar cumplimiento a estas normativas, las industrias y agencias encargadas de la seguridad alimentaria deben disponer de técnicas analíticas sensibles y específicas para identificar aquellos alérgenos que puedan estar presentes, tanto de forma voluntaria como accidental, en los productos alimenticios.

Las metodologías más extendidas para la detección de alérgenos en alimentos se basan en el análisis del ADN o de las proteínas. Entre las primeras, las técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real con sondas específicas son las más empleadas debido a su rapidez, especificidad y sensibilidad. Por otra parte, destacan también técnicas como la amplificación dependiente de ligasa de múltiples sondas (MLPA) que permiten la detección simultánea de varias dianas, si bien su desarrollo y aplicación al análisis de alérgenos alimentarios es aún escasa. Con relación a los métodos basados en el análisis de proteínas, los ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) tienen una amplia aceptación debido a su rapidez, sencillez, sensibilidad y capacidad de automatización. No obstante, la mayoría presentan los inconvenientes inherentes a la utilización de anticuerpos producidos en animales de experimentación. En este sentido, el desarrollo de inmunoensayos basados en anticuerpos recombinantes que no dependen de inmunizaciones *in vivo* es aún incipiente y proporciona una novedosa y prometedora alternativa para la detección de alérgenos alimentarios.

Teniendo en cuenta estos aspectos, en esta Tesis Doctoral se han empleado diferentes metodologías, genéticas e inmunológicas, para la detección de especies vegetales con potencial alergénico en alimentos. En primer lugar, se ha abordado el desarrollo de dos sistemas de MLPA para la detección simultánea de girasol, amapola, lino, sésamo y soja (MLPA de semillas) y de cereales de declaración obligatoria en el etiquetado de alérgenos: trigo, cebada, centeno y avena (MLPA de cereales). Asimismo, se ha desarrollado una técnica de PCR en tiempo real con sondas de hidrólisis Taqman para la detección conjunta de las tres principales especies de cereales con gluten (trigo, cebada y centeno). Por último, empleando la tecnología de *phage display*, se ha diseñado una nueva estrategia para la obtención de anticuerpos recombinantes que puedan emplearse en técnicas de ELISA para la detección de gluten en alimentos. Además, haciendo uso de las ventajas de esta tecnología, se han obtenido vectores de expresión para la producción en la levadura *Pichia pastoris* de los anticuerpos recombinantes frente al gluten fusionados a proteínas con propiedades luminiscentes con el fin de desarrollar nuevas metodologías analíticas basadas en las propiedades inherentes de estos anticuerpos.

A continuación se resumen los principales resultados obtenidos tras la consecución de los objetivos mencionados:

(1) El sistema MLPA de semillas, diseñado en la región espaciadora interna de la transcripción (ITS) del ARN ribosómico (ARNr) de girasol, amapola, lino, sésamo y soja, demostró un adecuado potencial para la detección múltiple y específica de ADN procedente de estas especies vegetales. El análisis de una matriz alimentaria enriquecida con diferentes concentraciones de las especies de interés y tratada a 180 °C/10 min, permitió establecer el límite de detección (LOD) de la técnica en 10 mg/kg. La aplicabilidad del sistema de MLPA se corroboró mediante el análisis de 56 productos comerciales y la posterior confirmación de los resultados por PCR en tiempo real, evidenciando la presencia de una o más especies alergénicas no declaradas en un 35,7 % de las muestras analizadas.

(2) El sistema MLPA de cereales, diseñado en la región ITS del ARNr de avena y cebada, y en los genes de la glutenina de bajo peso molecular del trigo y la ω -secalina de centeno, consiguió la detección simultánea y específica de ADN procedente de diferentes cultivares de las especies de interés. El LOD de la técnica se estableció en este caso en 50 mg/kg, tras el análisis de una matriz alimentaria enriquecida con diferentes concentraciones de las especies diana y tratada a 180 °C/10 min. El análisis de 40 productos comerciales y la confirmación de los resultados mediante PCR en tiempo real, corroboró la adecuada aplicabilidad de la técnica, que evidenció la presencia de cereales alergénicos no declarados en un 25 % de las muestras analizadas.

(3) El sistema de PCR en tiempo real diseñado en la región ITS del ARNr para la detección de cereales con gluten, permitió la amplificación específica de trigo, cebada y centeno con una eficiencia homogénea para todos los cultivares analizados. El análisis de una mezcla binaria de harina de maíz enriquecida con diferentes concentraciones de un homogeneizado de las tres especies de cereales (*wheat/barley/rye mixture*, WBRm) indicó que la sensibilidad de la técnica dependía de la intensidad del tratamiento térmico aplicado a las muestras. Por tanto, el LOD del ensayo se estableció en el intervalo de 10-50 mg/kg de WBRm, equivalente a una concentración teórica de gluten de 1-5 mg/kg. La aplicabilidad del método de PCR en tiempo real se demostró mediante el análisis de 220 productos comerciales y la posterior validación de los resultados obtenidos empleando el inmunoensayo oficial de ELISA basado en el anticuerpo R5 para la determinación de gluten en alimentos. El sistema de PCR desarrollado, fundamentado en la selección de dos valores umbrales de C_p , permitió la discriminación cualitativa de alimentos con niveles de cereales con gluten potencialmente peligrosos para los consumidores sensibles ($C_p < 26$) y alimentos libres de gluten ($C_p > 33$).

(4) El cribado de una genoteca no inmune de anticuerpos de dominio único (dAbs) mediante selección por afinidad frente a un péptido sintético con repeticiones aminoácidas presentes en las prolaminas del gluten, permitió el aislamiento de dos fago-anticuerpos (dAb8E y dAb4B) específicos para la detección de gluten procedente de trigo, cebada y centeno. El fago-anticuerpo dAb8E mostró las mejores cualidades para ser empleado como sonda de afinidad para el análisis de gluten en alimentos mediante ELISA. El LOD fue de 0,01 $\mu\text{g/mL}$ cuando se analizaron diluciones seriadas del estándar de gliadina-PWG (*Prolamin Working Group*) y de 0,15 mg/g al analizar mezclas binarias de WBRm en una matriz de harina de arroz. Estos resultados evidenciaron el potencial de la técnica de ELISA basada en el fago-anticuerpo dAb8E para la detección de gluten en alimentos hasta una concentración de 20 mg/kg. El análisis comparativo de 50 productos comerciales mediante el inmunoensayo desarrollado y el ELISA comercial basado en el anticuerpo R5, mostró una buena correlación entre los resultados obtenidos por ambas técnicas.

(5) Las secuencias codificadoras de los anticuerpos recombinantes específicos de gluten (dAb8E y dAb4B) se clonaron exitosamente en vectores de expresión para ser producidos en *P. pastoris* como proteínas de fusión a tres proteínas con propiedades luminiscentes: la luciferasa Lucia y las proteínas rojas fluorescentes mCherry y DsRed-Express2. La inducción de clones de *P. pastoris* transformados con las diferentes construcciones genéticas indicó que esta levadura es capaz de secretar anticuerpos funcionales fusionados a la proteína mCherry,

a diferencia de los anticuerpos quiméricos dAb-DsRed-Express2 que parecen retenerse en el interior celular.

El análisis de los resultados obtenidos evidencia que las técnicas propuestas en esta Tesis Doctoral ofrecen un enorme potencial para la detección de alérgenos alimentarios. Las metodologías genéticas desarrolladas poseen una especificidad y sensibilidad adecuadas para garantizar el cumplimiento de las normas de etiquetado vigentes en la Unión Europea y mejorar la trazabilidad y autenticidad de los productos comercializados. Asimismo, la estrategia de obtención de fragmentos de anticuerpos a partir de genotecas de fagos recombinantes y su posterior modificación funcional mediante la fusión genética con proteínas luminiscentes, se presenta como una potente herramienta en el desarrollo de métodos inmunológicos para la detección de gluten en alimentos evitando el empleo de animales de experimentación.

USE OF GENETIC TECHNIQUES AND RECOMBINANT ANTIBODIES FOR DETECTION OF PLANT FOOD ALLERGENS.

Correct food labelling is a critical element to ensure food safety and prevent commercial fraud. In this framework, Regulation (EC) 178/2002 recognises consumer's right to be well-informed about the food they purchase so that they can choose the products that best meet their needs. This fact is especially relevant for people suffering from food allergies since in these individuals even small amounts of the allergen can trigger a severe adverse reaction. To protect allergic consumers, Regulation (EU) 1169/2011 establishes a total of 14 groups of ingredients that must be declared on the labelling of foodstuffs, as they are responsible for a high proportion of human allergic reactions. To comply with these regulations, industries and food agencies must be provided with sensitive and specific analytical techniques to identify those allergens that may be voluntarily or accidentally present in food products.

The most widespread methodologies for detection of allergens in foods are based on DNA or protein analysis. Among DNA-based techniques, real-time PCR (polymerase chain reaction) with specific probes are the most commonly used due to their speed, specificity and sensitivity. In addition, techniques such as multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) that allow simultaneous detection of several targets are also of particular interest, although their development and application to food allergen analysis is still scarce. With regard to protein-based methods, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) are widely accepted due to their speed, simplicity, sensitivity and automation capacity. However, most show the inherent drawbacks of employing antibodies raised in animals. In this sense, the development of immunoassays based on recombinant antibodies that do not depend on *in vivo* immunizations is still incipient and provides a novel and promising alternative for the detection of food allergens.

Considering these aspects, different genetic and immunological methodologies have been employed in this Doctoral Thesis for detection of plant species with allergenic potential in foods. Firstly, the development of two MLPA systems has been addressed for the simultaneous detection of sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy ("seeds MLPA") and allergenic cereals requiring mandatory labelling: wheat, barley, rye and oats ("cereals MLPA"). In addition, a real-time PCR with Taqman hydrolysis probes has been developed for the concurrent detection of the three main gluten-containing cereal species (wheat, barley and rye). Finally, by means of phage display technology, a new strategy has been designed to produce recombinant

antibodies that can be used in ELISA techniques for the detection of gluten in foods. Moreover, taking advantage of this technology, expression vectors have been obtained for production of recombinant antibodies against gluten fused to proteins with luminescent properties in the yeast *Pichia pastoris* in order to develop new analytical methodologies based on the inherent properties of these antibodies.

The main results obtained in relation to the above mentioned objectives are summarised below:

(1) The seeds MLPA system, designed in the internal transcribed spacer (ITS) region of the ribosomal RNA (rRNA) of sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy, demonstrated an adequate potential for the multiple and specific detection of DNA from these plant species. The analysis of a food matrix enriched with different concentrations of the target species and treated at 180 °C/10 min, allowed to establish the limit of detection (LOD) of the method in 10 mg/kg. The applicability of the MLPA system was corroborated through the analysis of 56 commercial food products and the subsequent confirmation of the results by real-time PCR, evidencing the presence of one or more undeclared allergenic species in 35,7 % of the analysed samples.

(2) The cereals MLPA system, designed in the rRNA ITS region of oats and barley, and in the genes of the low molecular weight glutenin of wheat and the ω -secaline of rye, allowed simultaneous and specific detection of DNA from different cultivars of the target species. In this case, the LOD of the technique was established at 50 mg/kg, upon analysis of a food matrix enriched with different concentrations of the target species and treated at 180 °C/10 min. The analysis of 40 commercial food products and the validation of the results by real-time PCR confirmed the adequate applicability of the technique, which evidenced the presence of undeclared allergenic cereals in 25 % of the analysed samples.

(3) The real-time PCR system designed in the rRNA ITS region for detection of the main gluten containing-cereals, allowed the specific amplification of wheat, barley and rye with a homogeneous efficiency for all the tested cultivars. The analysis of a maize-based binary mixture spiked with different concentrations of a mixture of the three cereal species (*wheat/barley/rye mixture*, WBRm) indicated that the sensitivity of the technique was affected by the intensity of the heat treatment applied to the samples. Therefore, the LOD of the assay was established in the range of 10-50 mg/kg of WBRm, content which could be theoretically equated to 1-5 mg/kg of gluten. The applicability of the real-time PCR method was

demonstrated through the analysis of 220 commercial food products and the subsequent validation of the obtained results using the official R5-ELISA immunoassay for gluten determination in foods. The developed real-time PCR system, based on the selection of two C_p threshold values, allowed qualitative discrimination of foods with potentially harmful levels of gluten-containing cereals for sensitive consumers ($C_p < 26$) and gluten-free foods ($C_p > 33$).

(4) The screening of a naïve single-domain antibody (dAb) library against a synthetic peptide of amino acid repeats present in the gluten prolamins, enabled the isolation of two phage antibodies (dAb8E and dAb4B) specific for detection of gluten from wheat, barley and rye. The phage-antibody dAb8E exhibited the most suitable attributes to be used as affinity probe for the analysis of gluten in foods by ELISA. The LOD was 0.01 $\mu\text{g/mL}$ when analysing serial dilutions of the PWG (Prolamin Working Group)-gliadin standard and 0.15 mg/g of WBRm when rice based binary mixtures were tested. These results highlighted the potential of the ELISA methodology based on the antibody dAb8E-phage for the detection of gluten in foods up to a concentration of 20 mg/kg. Comparative analysis of 50 commercial food products by means of the developed immunoassay and the commercial ELISA based on R5 antibody, showed a good correlation between the results obtained by both techniques.

(5) The coding sequences of the gluten-specific recombinant antibodies (dAb8E and dAb4B) were successfully cloned into expression vectors to be produced in *P. pastoris* as fusion proteins to three proteins with luminescent properties: the luciferase Lucia and the red fluorescent proteins mCherry and DsRed-Express2. The induction of *P. pastoris* clones transformed with the different genetic constructs indicated that this yeast is able to secrete functional antibodies fused to the mCherry protein, as opposed to the dAb-DsRed-Express2 chimeric antibodies that seem to be retained inside the cell.

Analysis of the results obtained demonstrates that the techniques proposed in this work possess significant potential in the field of food allergen detection. The developed genetic methodologies provide adequate specificity and sensitivity to ensure compliance with European labelling rules and to improve traceability and authenticity of marketed products. Likewise, the production of antibody fragments from recombinant phage libraries and their subsequent functional modification through genetic fusion with luminescent proteins is proposed as a powerful tool in the development of immunological methods for the detection of gluten in foods avoiding the use of experimental animals.

Capítulo I

**EXPOSICIÓN GENERAL
DEL PROBLEMA A
INVESTIGAR**

El aumento en la incidencia de diversas reacciones adversas a los alimentos observado en las últimas décadas conlleva una importante preocupación, tanto para la población general como para la industria alimentaria y las autoridades sanitarias. En este sentido, el diagnóstico cada vez más frecuente de alergias e intolerancias alimentarias, ha reforzado la importancia de verificar la autenticidad y el correcto etiquetado de los alimentos. Por ello, para proteger a los consumidores sensibles es especialmente importante asegurar la trazabilidad de todos los ingredientes empleados en la preparación de un alimento y su declaración en un etiquetado veraz y libre de ambigüedades, sobre todo en el caso de los componentes potencialmente alergénicos.

Debido a que en la actualidad no existe tratamiento para la mayoría de las reacciones de hipersensibilidad a los alimentos, la principal medida de control consiste en evitar la exposición involuntaria de los consumidores sensibles a los alérgenos alimentarios. Desde la implantación del Reglamento (UE) 1169/2011, que establece la obligatoriedad de declarar los ingredientes recogidos en su Anexo II, la información disponible en el etiquetado de los alimentos relativa a los alérgenos ha mejorado significativamente. Sin embargo, no siempre es fácil garantizar la ausencia de un determinado ingrediente alergénico, ya que en ocasiones éste puede estar presente en el alimento de manera accidental y, como consecuencia, no aparecer reflejado en el etiquetado. En este sentido, el último informe anual de la Comisión Europea sobre el Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF) mostró un preocupante número de notificaciones por la presencia de alérgenos alimentarios ocultos, entre los que la leche, el gluten, la soja y los frutos de cáscara son los más frecuentemente comunicados. La industria y las autoridades competentes se enfrentan, por tanto, al reto de asegurar una gestión adecuada del riesgo de alergenidad en toda la cadena alimentaria, desde los ingredientes hasta los productos comercializados. En este escenario, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) considera una línea prioritaria de actuación la investigación en métodos fiables de detección y cuantificación de componentes alergénicos en los alimentos, tanto aquellos de declaración obligatoria como otros alérgenos emergentes que también pueden causar reacciones graves en consumidores sensibles.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, en la presente Tesis Doctoral se han abordado los siguientes objetivos: (1) desarrollo de metodologías de MLPA para la detección simultánea de especies vegetales como girasol, amapola, lino, sésamo, soja y cereales de declaración obligatoria (trigo, cebada, centeno y avena) en alimentos; (2) desarrollo de una técnica de PCR en tiempo real para la detección conjunta de ADN procedente de los principales cereales con gluten (trigo, cebada y centeno) en alimentos; (3) puesta a punto de una estrategia

de selección de fago-anticuerpos recombinantes para la detección de gluten en alimentos a partir del cribado mediante *phage display* de una genoteca de fagos comercial; y (4) obtención de vectores de expresión para la producción, empleando como sistema de expresión la levadura *P. pastoris*, de anticuerpos recombinantes con propiedades luminiscentes frente al gluten.

Para llevar a cabo los objetivos mencionados ha sido necesaria la consecución de los siguientes objetivos específicos:

OBJETIVO 1. Empleo de técnicas de MLPA para la detección múltiple en alimentos de especies vegetales alergénicas como girasol, amapola, lino, sésamo y soja (MLPA de semillas) y cereales de declaración obligatoria en el etiquetado: trigo, cebada, centeno y avena (MLPA de cereales).

1.1. Selección de marcadores genéticos adecuados y diseño de parejas de hemi-sondas de hibridación específicas para cada una de las especies vegetales objeto de estudio.

1.2. Desarrollo de dos sistemas de MLPA (semillas y cereales) empleando las hemi-sondas diseñadas para la detección simultánea de las especies diana en alimentos.

1.3. Evaluación de la aplicabilidad de las metodologías de MLPA desarrolladas para la detección de los alérgenos de interés en productos comerciales y validación de los resultados obtenidos mediante técnicas de PCR en tiempo real.

OBJETIVO 2. Empleo de una técnica de PCR en tiempo real con sondas de hidrólisis Taqman® para la detección conjunta del grupo de los cereales con gluten (trigo, cebada y centeno) en alimentos.

2.1. Selección de marcadores genéticos adecuados y diseño de cebadores específicos y sonda de hidrólisis Taqman® para la amplificación conjunta de trigo, cebada y centeno.

2.2. Desarrollo y validación del sistema de PCR en tiempo real empleando los cebadores y sonda de hidrólisis diseñados para la detección de las especies diana en alimentos.

2.3. Evaluación de la aplicabilidad de la técnica de PCR en tiempo real desarrollada para la detección de trigo, cebada y centeno en productos comerciales, y posterior validación de los resultados obtenidos con el inmunoensayo oficial de ELISA para la determinación de gluten en alimentos.

OBJETIVO 3. Obtención de fago-anticuerpos recombinantes mediante la tecnología de expresión de proteínas heterólogas en la superficie de fagos (*phage display*) para su empleo como sondas de afinidad en técnicas de ELISA para la detección de gluten en alimentos.

3.1. Selección de fragmentos de anticuerpos de dominio único (dAb) mediante *phage display* en función de su afinidad por un péptido sintético que comprende repeticiones aminoacídicas presentes en el gluten.

3.2. Caracterización de los fago-anticuerpos aislados a través del análisis de sus secuencias nucleotídicas y selección del clon que presente mejores características analíticas para detectar de manera específica y sensible el gluten presente en trigo, cebada y centeno.

3.3. Evaluación de la aplicabilidad del fago-anticuerpo seleccionado para su empleo en una técnica rápida de ELISA para la determinación de gluten en productos comerciales y posterior validación de los resultados obtenidos con el inmunoensayo oficial de ELISA para la determinación de gluten en alimentos.

OBJETIVO 4. Modificación funcional de los anticuerpos recombinantes frente al gluten mediante la obtención de vectores de expresión para la producción en la levadura *Pichia pastoris* de fragmentos de anticuerpos fusionados a proteínas con propiedades luminiscentes.

4.1. Obtención de vectores de expresión adecuados para la expresión extracelular empleando *P. pastoris* de las secuencias de los dAbs específicos de gluten fusionadas genéticamente a la luciferasa Lucia y a las proteínas rojas fluorescentes mCherry y DsRed-Express2.

4.2. Inducción de los clones de *P. pastoris* transformados con las diferentes construcciones para evaluar la capacidad de secreción de las proteínas de fusión diseñadas al emplear como sistema de expresión esta levadura metilotrófica.

A decorative border consisting of two overlapping rectangular frames. The inner frame is a dark blue line, and the outer frame is a light blue line. They are offset from each other, creating a layered effect.

Capítulo II

INTRODUCCIÓN

II. 1. REACCIONES ADVERSAS A LOS ALIMENTOS

En las últimas décadas, la oferta de productos alimenticios disponibles en la dieta de los países desarrollados se ha ampliado notablemente. Ello ha determinado un considerable aumento en la prevalencia de reacciones adversas a los alimentos, término que engloba tanto a las alergias como a las intolerancias alimentarias, entre otras patologías. Una reacción adversa a un alimento se define como cualquier respuesta clínicamente anormal que puede atribuirse a la ingestión, contacto o inhalación de dicho alimento, los derivados del mismo o un aditivo que lo contenga, cuyo mecanismo puede tener, o no, un componente inmunológico (Cianferoni y Spergel, 2009; Montalto *et al.*, 2008; Ruiz-Sánchez *et al.*, 2018).

Los grandes avances en el conocimiento de las reacciones adversas a los alimentos han promovido diversas iniciativas para unificar la nomenclatura empleada en su denominación. La Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI, *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*) propuso en 2001 una serie de definiciones, revisadas en 2003 por la Organización Mundial de Alergia (WAO, *World Allergy Organization*) (Johansson *et al.*, 2001; 2004). En esta clasificación se propone una primera diferenciación entre reacciones adversas tóxicas y no tóxicas (**Figura 1**). Las primeras están producidas por alimentos que contienen toxinas, metales pesados, plaguicidas o sustancias con actividad farmacológica, entre otros. En estos casos, a pesar de que la sintomatología puede variar según el individuo, es común que afecte a todos aquellos que consuman el alimento si la cantidad ingerida es lo suficientemente alta. Las reacciones no tóxicas se describen bajo el amplio término de hipersensibilidad alimentaria y dependen de la susceptibilidad individual del consumidor. Cuando la reacción de hipersensibilidad está iniciada por mecanismos inmunológicos, se conoce como alergia alimentaria. Por el contrario, la hipersensibilidad no alérgica, comúnmente denominada intolerancia alimentaria, engloba a un conjunto de patologías asociadas con mecanismos muy diversos de origen no inmunológico (Besler, 2001; Rosas, 2006; Ruiz-Sánchez *et al.*, 2018). Esta clasificación fue asimismo aceptada en 2010 por un panel de expertos del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (NIAID, *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*) (Sicherer y Sampson, 2018).

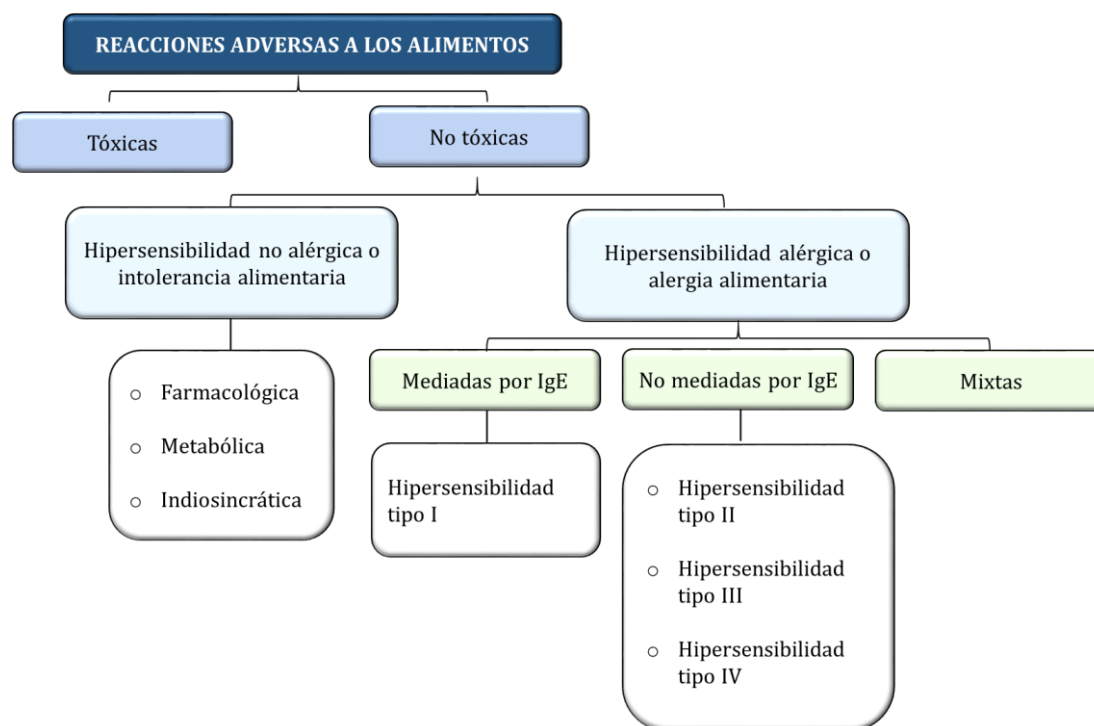


Figura 1. Clasificación de las reacciones adversas a los alimentos (Johansson et al., 2004; Rosas, 2006).

II. 1. 1. Alergia alimentaria

El término de alergia alimentaria recoge a aquellas reacciones adversas a un alimento en las que se ha comprobado que existe una respuesta inmunitaria implicada en su patogénesis, por lo que se producen únicamente en individuos previamente sensibilizados. Se han descrito diversos factores, tanto genéticos como ambientales, que junto a una serie de características antigénicas de las proteínas alimentarias influyen en el desarrollo de la alergia alimentaria. En 1963, los inmunólogos británicos Philip G. H. Gell y Robert R. A. Coombs propusieron una clasificación de las reacciones alérgicas que, a día de hoy, sigue empleándose (**Figura 1**). De este modo, dependiendo de los componentes del sistema inmunitario que inician la respuesta, pueden darse cuatro tipos de hipersensibilidades: tipo I o inmediata (mecanismo mediado por inmunoglobulinas IgE), tipo II o citotóxica (mecanismo mediado por inmunoglobulinas IgG e IgM), tipo III o de inmunocomplejos (mecanismo mediado por complejos inmunitarios antígeno-IgG/IgM) y tipo IV o retardado (mecanismo mediado por linfocitos T). La hipersensibilidad no mediada por IgE recoge las reacciones de tipo II, III y IV. Además, ciertas enfermedades presentan una patogénesis donde intervienen mecanismos mixtos como la esofagitis y gastroenteritis eosinofílicas, la dermatitis atópica y el asma alérgico (Macías-Iglesias, 2018; Uzzaman y Komarow, 2013). En todos estos procesos, lo que se produce de

manera general es una pérdida de la tolerancia a un determinado componente alimentario (Renz *et al.*, 2017, Ahrens *et al.*, 2016).

Las alergias alimentarias representan un problema de salud pública importante, particularmente en los países desarrollados donde se ha observado un paulatino aumento de su prevalencia a nivel mundial en las últimas décadas (**Figura 2**) (de la Cruz *et al.*, 2018; Nwaru *et al.*, 2014; Renz *et al.*, 2017). Este hecho es especialmente alarmante en el caso de la población infantil ya que, si bien la prevalencia en adultos es de aproximadamente un 2-4 %, se estima que alrededor del 6-8 % de los niños padecen alergias alimentarias y, hasta un 3 %, ha experimentado complicaciones sanitarias (Gupta *et al.*, 2011; Rona *et al.*, 2007; Taylor-Black y Wang, 2012; Zuidmeer *et al.*, 2008). Concretamente en Europa, se calcula que alrededor de 20 millones de ciudadanos sufren o han sufrido a lo largo de su vida algún tipo de alergia alimentaria. El hecho de que la población adulta presente una menor incidencia que la infantil refleja cómo ciertos individuos acaban desarrollando una tolerancia natural al alimento por mecanismos que, a día de hoy, no se conocen del todo (Ahrens *et al.*, 2016). No obstante, cada vez se comprenden mejor los posibles factores de riesgo cuyo control podría ayudar a prevenir la alergia a los alimentos en el futuro, como el exceso de higiene, la influencia del microbioma, la insuficiencia de vitamina D, el menor consumo de ácidos grasos poliinsaturados y antioxidantes, o el riesgo de retrasar la ingesta de determinados alérgenos en los primeros meses de vida (Allen y Koplin, 2012; Cochrane *et al.*, 2009; Renz *et al.*, 2017; Sicherer y Sampson, 2018). Asimismo, las variaciones en la dieta y la modificación de los métodos de procesado de los alimentos también podrían ser factores ambientales influyentes en el desarrollo de alergias alimentarias (EFSA, 2014).

Los alérgenos son sustancias extrañas al organismo que poseen la capacidad de generar una respuesta inmunológica exacerbada. La patogénesis de una alergia alimentaria comienza con un proceso de sensibilización que tiene lugar principalmente a través del tracto gastrointestinal, aunque en algunas ocasiones se puede producir sensibilización por vía pulmonar frente a alérgenos alimentarios que poseen reactividad cruzada con el polen de algunas plantas (Uzzaman y Komarow, 2013). Prácticamente todos los alérgenos que producen una sensibilización a través del tracto gastrointestinal presentan características moleculares que incrementan su estabilidad térmica y su resistencia a la digestión ácida o enzimática (proteasas). Por el contrario, los alérgenos vegetales relacionados con el polen poseen una menor estabilidad, por lo que solo inducen síndrome de alergia oral y a menudo pierden su capacidad inmunogénica con el cocinado. Los alérgenos alimentarios se engloban en un número limitado de familias proteicas atendiendo a secuencias de aminoácidos compartidas y

estructuras tridimensionales conservadas, por lo que frecuentemente una misma familia comparte la ruta de sensibilización. Las principales familias de alérgenos de origen animal son las tropomiosinas, las caseínas y las parvalbúminas. Por su parte, las especies de origen vegetal poseen diferentes alérgenos clasificados dentro las siguientes superfamilias: las prolaminas (que engloban a las proteínas transportadoras de lípidos no específicas, a las albúminas 2S o las proteínas inhibidoras de la α -amilasa/tripsina), las cupinas (globulinas 7S y 11S), los homólogos de Bet v 1 y proteínas de defensa como las proteasa de cisteína (Breiteneder y Mills, 2014; Breiteneder y Radauer, 2004; Villaño *et al.*, 2012).

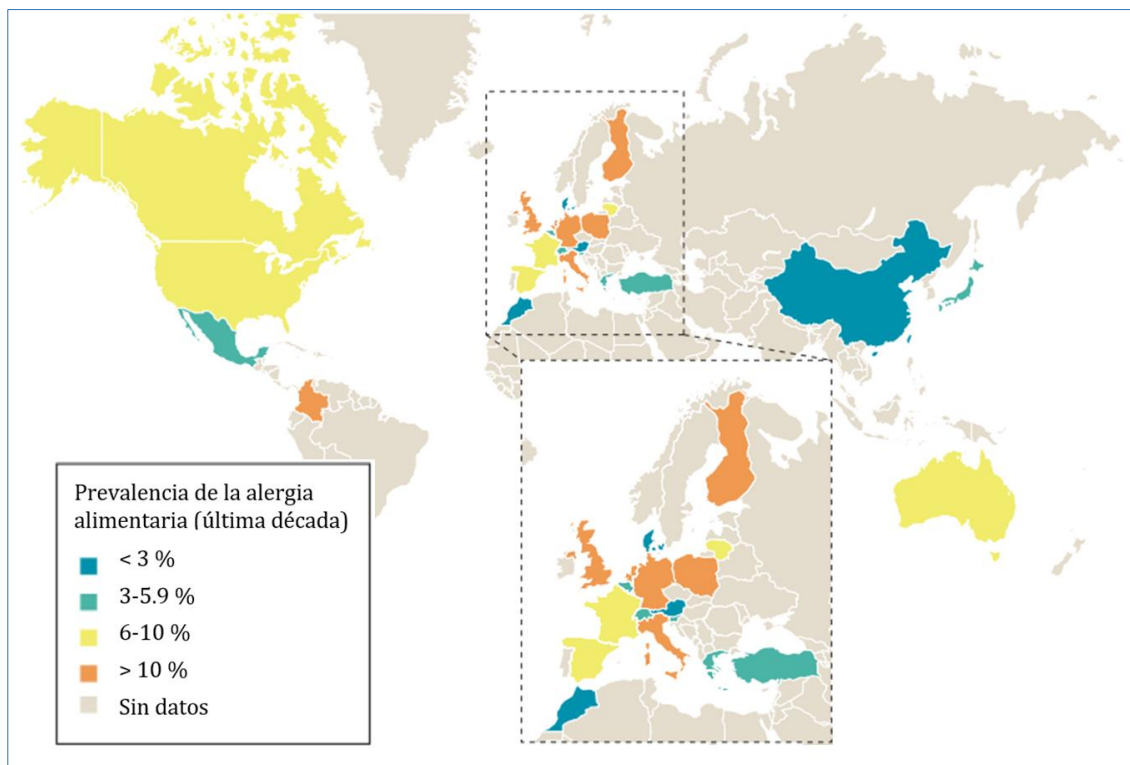


Figura 2. Diagrama de la prevalencia mundial de la alergia alimentaria (adaptada de Renz *et al.*, 2017).

A pesar de que existe una gran cantidad de sustancias potencialmente alergénicas en los alimentos (principalmente de naturaleza proteica), el 90 % de las reacciones adversas están causadas por un número reducido de ellos. Se trata de ocho grupos de alimentos conocidos como “*the big eight*”: leche de vaca, huevo, pescado, crustáceos, cacahuets, soja, frutos de cáscara y trigo (Alves *et al.*, 2016). En un estudio reciente realizado en Europa, se describe una prevalencia en los últimos años de entre el 0,1 y el 0,6 % para cada uno de estos grupos de alimentos, lo que supone una prevalencia global en la población de aproximadamente un 6 % (Nwaru *et al.*, 2014). En general, la mayoría de niños alérgicos a la leche, huevo, soja y trigo

desarrollan tolerancia a estos alimentos durante la primera década de vida, mientras que las alergias a los frutos de cáscara, cacahuete, sésamo, pescado, mariscos y crustáceos, suelen permanecer en la edad adulta (Savage y Johns, 2015; Sicherer y Sampson, 2018; Wasserman *et al.*, 2018).

II. 1. 1. 1. Alergia alimentaria mediada por IgE (hipersensibilidad tipo I)

La hipersensibilidad de tipo I está desencadenada por una respuesta humoral a un antígeno mediada por inmunoglobulina E. Se trata del tipo de reacción adversa más comúnmente asociada con la alergia alimentaria y los síntomas suelen aparecer rápidamente (entre varios minutos y dos horas tras la ingesta), por lo que también se conoce como hipersensibilidad de tipo inmediata. Esta reacción requiere, en cualquier caso, una primera exposición al alérgeno capaz de producir la sensibilización del individuo, que en muchas ocasiones puede haber sido asintomática (Berciano y Caro, 2008; Cianferoni y Spergel, 2009; Sicherer y Sampson, 2018). Esta primera etapa de sensibilización o de inducción comienza con la absorción del alérgeno a través del epitelio intestinal, de manera que accede a la mucosa donde se encuentran las células efectoras del sistema inmunitario. Cuando se produce el contacto con el alérgeno, los linfocitos B secretan grandes cantidades de IgE específicas que circulan por todo el organismo a través del torrente sanguíneo. Cuando estos anticuerpos se unen a los receptores de alta afinidad de mastocitos y basófilos se considera que estas células se han sensibilizado frente al alérgeno que ha provocado la producción de IgE. En el caso de una segunda exposición al alérgeno alimentario (o a un epítipo similar presente en otro antígeno), se produce la denominada fase de provocación o fase efectora, que induce la degranulación de estos mastocitos y basófilos sensibilizados y la liberación de mediadores que actúan como sustancias inflamatorias que desencadenan la reacción alérgica. En esta fase, se produce la liberación de mediadores químicos preformados como la histamina, triptasa y quimasa, y la síntesis de *novo* de mediadores como el factor activador de plaquetas y los metabolitos lipídicos derivados del ácido araquidónico (leucotrienos, prostaglandinas, etc.). Todo este proceso desencadena en las diferentes respuestas fisiológicas de la reacción alérgica (vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, activación de los nervios nociceptores, etc.) (Cianferoni y Spergel, 2009; Renz *et al.*, 2017).

Las manifestaciones clínicas de la alergia alimentaria inmediata pueden desencadenar síntomas de diferente severidad que afectan tanto a la piel como a los sistemas respiratorio, digestivo y cardiovascular (**Tabla 1**) (Wasserman *et al.*, 2018). A excepción de las migrañas, no suelen producirse efectos sobre el sistema nervioso central y tampoco es frecuente que

provoquen asma o rinitis. La aparición de estos síntomas no es dosis-dependiente; es decir, una mínima ingesta de la sustancia tóxica podría desencadenar los síntomas. Además, el nivel de sensibilidad a un mismo alérgeno puede variar en varios órdenes de magnitud en función de la susceptibilidad individual. En los casos más severos, el individuo puede sufrir un cuadro fatal conocido como anafilaxia, que se define como una reacción de hipersensibilidad grave, potencialmente mortal, generalizada o sistémica, que suele presentarse dentro de un lapso de tiempo limitado tras la exposición al antígeno. La ingesta de cacahuets está descrita como la causa más común de muerte por anafilaxia alimentaria, pero también puede deberse al consumo de otros alimentos como frutos de cáscara, soja, sésamo, huevo, marisco y pescados (Villaño *et al.*, 2012).

El diagnóstico de una alergia alimentaria no suele basarse en una única prueba. Entre las más utilizadas se encuentran el test por punción (SPT, *skin prick test*) y la determinación de IgEs específicas en el suero de los pacientes, que permiten además reconocer frecuentemente el alimento implicado y el posible mecanismo inmunológico subyacente (Berciano y Caro, 2008; Renz *et al.*, 2017; Rosas, 2006; Savage y Johns, 2015). En casos dudosos en los que el historial del paciente constata la presencia de una alergia alimentaria, también se puede recurrir a pruebas de provocación oral controladas, dietas de eliminación de alimentos o grupos de alimentos y diarios que reflejen la dieta seguida y los síntomas desarrollados (Sicherer y Sampson, 2014; Soares-Weiser *et al.*, 2014).

A nivel mundial, la mayor prevalencia de alergia alimentaria mediada por IgE se da en Australia, donde un 10 % de la población infantil ha sido diagnosticada con esta patología (Renz *et al.*, 2017; Sicherer y Sampson, 2018). Sin embargo, otras áreas desarrolladas como Europa y los Estados Unidos tienen una prevalencia poblacional menor, estimada en el intervalo de 1-5 % (Rosas, 2006). A pesar de ello, se debe tener en cuenta que los estudios sobre prevalencia son a menudo imprecisos dado que, para permitir una correcta comparativa, deberían estar basados en metodologías armonizadas como la prueba de provocación oral doble ciego controlada por placebo (DBPCFC, *double-blind placebo-controlled food challenge*) (Allen y Koplin, 2012; Wasserman *et al.*, 2018). En este sentido, existe una clara sobreestimación de la prevalencia de la alergia alimentaria, y se calcula que aproximadamente solo un tercio de las alergias auto-informadas se han confirmado en las pruebas de provocación oral (Macías-Iglesias, 2018).

Tabla 1. Manifestaciones clínicas de las alergias alimentarias (Waserman et al, 2018).

Manifestación clínica	Hipersensibilidad mediada por IgE	Hipersensibilidad no mediada por IgE
Dérmicas		
Urticaria	X	
Angioedema	X	
Eritema	X	X
Prurito	X	X
Lesiones ecematosas	X	X
Respiratorias		
Edema laríngeo	X	
Rinorrea	X	
Broncoespasmos	X	
Congestión nasal	X	
Tos	X	
Disnea	X	
Digestivas		
Angioedema	X	
Inflamación de la lengua	X	
Vómitos	X	X
Diarrea	X	X
Dolor	X	X
Cardiovasculares		
Síncope	X	
Hipotensión	X	
Taquicardia	X	
Reacciones generales		
Anafilaxia	X	
Anafilaxia inducida por el ejercicio	X	
Anafilaxia inducida por AINEs, aspirina o alcohol	X	

II. 1. 1. 2. Alergia alimentaria no mediada por IgE

Gran parte de las reacciones alérgicas no mediadas por IgE se producen mediante un mecanismo de hipersensibilidad de tipo IV, donde los linfocitos T son los principales mediadores de la reacción inflamatoria. Dado que los síntomas pueden aparecer desde horas hasta semanas después de la ingesta del alimento, también se conoce como hipersensibilidad alimentaria retardada, lo que suele dificultar su diagnóstico. Existen evidencias que sugieren

que las enfermedades alérgicas gastrointestinales no mediadas por IgE están fuertemente asociadas con la disfunción de la barrera epitelial gastrointestinal (Uzzaman y Komarow, 2013).

Entre los trastornos que abarca este tipo de hipersensibilidad se encuentran principalmente patologías gastrointestinales, siendo la enfermedad celiaca una de las más conocidas. Otras enfermedades gastrointestinales asociadas a este tipo de hipersensibilidad son el síndrome de enterocolitis inducida por proteínas alimentarias (FPIES, *food protein-induced enterocolitis syndrome*), la proctocolitis alérgica, la enteropatía inducida por proteínas alimentarias o la anemia por deficiencia de hierro inducida por proteínas de la leche de vaca. Además, también se han descrito dentro de este grupo manifestaciones cutáneas como la dermatitis por contacto y la dermatitis herpetiforme (conocida como la enfermedad celiaca de la piel), y pulmonares como el síndrome de Heiner. El diagnóstico de estas patologías es más complejo que el de las asociadas a la hipersensibilidad mediada por IgE, ya que frecuentemente se requiere de técnicas invasivas para obtener un diagnóstico fiable. Por ello, es importante entender los síntomas que desencadenan los diferentes desórdenes clínicos asociados con la alergia alimentaria (**Tabla 1**) y normalmente es necesaria la exclusión diagnóstica de otras enfermedades no alérgicas con sintomatología similar. Además, la implicación de un alimento concreto en este tipo de alergias solo se puede determinar a través del historial clínico y la evolución del paciente en dietas de eliminación y provocación (Connors *et al.*, 2018; Sicherer y Sampson, 2018).

Aunque pueden producirse por diferentes tipos de alimentos, la mayoría de las reacciones de hipersensibilidad retardada están causadas por la leche de vaca, la soja, el trigo y el huevo. Tras su diagnóstico, los pacientes deben eliminar de la dieta el alimento que causa la reacción. Sin embargo, dado que algunas de estas patologías se resuelven en los primeros años de vida, en algunos casos se recomienda reintroducir el alimento pasado el tiempo para comprobar si se ha adquirido tolerancia al mismo (Nowak-Węgrzyn *et al.*, 2015).

II. 1. 2. Hipersensibilidad no alérgica a los alimentos

Comúnmente conocida como intolerancia alimentaria, la hipersensibilidad no alérgica a los alimentos comprende aquellas respuestas adversas a un alimento que se originan por un mecanismo no inmunológico. Este tipo de patologías representa un elevado porcentaje de las reacciones adversas humanas producidas por los alimentos (Montalto *et al.*, 2008; Ortolani y Pastorello, 2006). Las intolerancias alimentarias pueden ser de tipo farmacológico, metabólico

o de idiosincrasia indeterminada (con mecanismo desconocido o de origen múltiple). Una intolerancia farmacológica está causada por una hiperreactividad a sustancias que se encuentran de manera natural en los alimentos (como histamina, fenilalanina y tiamina), originando diversas manifestaciones en determinados individuos incapaces de metabolizarlas correctamente. Las intolerancias metabólicas ocurren cuando el individuo presenta un déficit de ciertos componentes (generalmente enzimas) necesarios durante el proceso de digestión o absorción del alimento. Este es el caso de la conocida intolerancia a la lactosa, que afecta a una alta proporción de la población mundial que carece de la enzima lactasa. La sintomatología es similar a la de una reacción alérgica, con la diferencia de que su intensidad es dosis-dependiente y, por tanto, la persona afectada podrá ingerir pequeñas dosis del alimento en cuestión sin presentar ningún síntoma. En los pacientes con intolerancias alimentarias, también existe un componente genético o epigenético que origina una determinada predisposición del individuo. A diferencia del tratamiento de la alergia alimentaria, que requiere la retirada de la dieta del alérgeno sospechoso, algunos individuos con intolerancias alimentarias pueden seguir un tratamiento farmacológico basado en la administración de las enzimas necesarias para facilitar la adecuada digestión, absorción y metabolización de las sustancias causantes de la intolerancia (Cianferoni y Spergel, 2009; Montalto *et al.*, 2008; Ortolani y Pastorello, 2006; Rosas, 2006; Ruiz-Sánchez *et al.*, 2018).

II. 1. 3. Reacciones adversas relacionadas con el consumo de cereales con gluten

Los cereales se consumen de manera habitual en la dieta, dado que constituyen una de las principales fuentes de hidratos de carbono, proteínas y fibra para la nutrición humana (McKevith, 2004). El endospermo de los cereales está principalmente compuesto por almidón y una compleja mezcla de proteínas que presentan un alto grado de polimorfismo. Según el método de fraccionamiento de Osborne, estas proteínas pueden clasificarse atendiendo a su solubilidad en: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas), prolaminas (solubles en etanol al 60-70 % o 1-propanol al 50 %) y glutelinas (solubles en ácidos y bases diluidos, o soluciones alcohólicas con detergentes o agentes reductores) (Hajas *et al.*, 2018, Osborne, 1924). Las albúminas y globulinas desempeñan principalmente funciones estructurales, mientras que las prolaminas y glutelinas sirven como fuente de nitrógeno para el crecimiento de la planta, por lo que se clasifican dentro de las proteínas de almacenamiento de la semilla (Kucek *et al.*, 2015). En los cereales pertenecientes a la tribu *Triticeae* (trigo, cebada y centeno), esta fracción proteica insoluble en agua integrada por prolaminas y glutelinas es conocida como gluten (Shewry, 2019).

El gluten se define como la “masa elástica que queda tras el lavado de la harina de trigo para eliminar el almidón y otros constituyentes solubles” (Shewry *et al.*, 2002). El término gluten deriva del latín “*glutinis*” que significa “cola o pegamento” y hace referencia a un conjunto de proteínas que presentan importantes propiedades funcionales para la producción de alimentos como el pan.

Las prolaminas (llamadas así por su alto contenido en prolina y glutamina) son proteínas monoméricas que contribuyen a la cohesión y extensibilidad del gluten, propiedades que confieren a la masa panificable su característica viscosidad y capacidad de esponjarse. Su elevado contenido en prolina provoca que las prolaminas sean altamente resistentes a la digestión proteolítica completa por las peptidasas gástricas y pancreáticas. Esta circunstancia conduce a la formación de péptidos de gran tamaño (hasta 50 aminoácidos) que se acumulan en el intestino y pueden provocar una reacción adversa en individuos sensibles. Las prolaminas poseen un peso molecular entre 30-60 kDa y se pueden subdividir, atendiendo a su movilidad electroforética, en alfa (α), beta (β), gamma (γ) y omega (ω) (Tatham *et al.*, 2000). Según el cereal del que provengan, las prolaminas adquieren diferentes nombres: gliadinas (trigo), secalinas (centeno), hordeínas (cebada) y aveninas (avena) (Biesiekierski, 2017; Wieser, 2007).

Por su lado, las glutelinas desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la elasticidad y la fuerza del gluten, permitiendo a los productos panificados mantener su forma final. Se corresponden con un grupo de proteínas poliméricas muy heterogéneo, formadas por subunidades enlazadas por puentes disulfuro que pueden separarse mediante electroforesis en más de una docena de fracciones de diferentes pesos moleculares: glutelinas de alto peso molecular (HMW, *high molecular weight*) entre 80-120 kDa y glutelinas de bajo peso molecular (LMW, *low molecular weight*) entre 30-45 kDa. En el caso particular de trigo, estas proteínas se conocen con el nombre de gluteninas (Balakireva y Zamyatnin, 2016; Bruins-Slot *et al.*, 2016; Cebolla *et al.*, 2018; Kucek *et al.*, 2015; Mujico, 2007).

Hoy en día, el consumo de cereales con gluten se ha relacionado con el desarrollo de una gran diversidad de patologías entre las que destacan la alergia al trigo, la enfermedad celiaca y la sensibilidad al gluten no celiaca (Valenti *et al.*, 2017; Vaquero *et al.*, 2015). En febrero de 2011, tras la reunión de un panel de 15 expertos en la materia, se propuso una clasificación de estos trastornos en función del mecanismo de respuesta del sistema inmunológico frente a los componentes alimentarios que desencadenan la reacción adversa (Sapone *et al.*, 2012). La alergia al trigo engloba un conjunto de manifestaciones en las que los mecanismos de acción

implican una hipersensibilidad mediada por IgE, mientras que la enfermedad celiaca se incluye dentro de las patologías de base autoinmune desencadenadas por la ingesta de cereales con gluten. Por último, la sensibilidad al gluten no celiaca (SGNC) es una entidad recientemente adoptada para definir un tipo de trastorno que no presenta una patogénesis ni autoinmune ni de hipersensibilidad mediada por IgE (Clímaco-Henggeler *et al.*, 2017; Hadjivassiliou *et al.*, 2015; Sapone *et al.*, 2012; Scherf *et al.*, 2015).

II. 1. 3. 1. Alergia al trigo

La alergia al trigo se define como una reacción de hipersensibilidad de tipo inmediato hacia las proteínas del trigo, por lo que comúnmente se presenta al poco tiempo de producirse la ingesta. Dependiendo de la ruta de exposición al alérgeno, se pueden producir diferentes tipos de manifestaciones. Por ejemplo, su ingestión puede ocasionar la clásica alergia alimentaria (con manifestaciones cutáneas, gastrointestinales y/o respiratorias) o la denominada anafilaxia inducida por ejercicio dependiente de trigo (WDEIA, *wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis*). Si la vía de exposición es inhalatoria puede causar alergia respiratoria (comúnmente conocida como “asma del panadero”) o rinitis, y cuando el alérgeno contacta con la piel puede provocar urticaria y dermatitis atópica (Inomata, 2009; Šotkovský *et al.*, 2011). Las pruebas cutáneas y los estudios serológicos de IgEs no arrojan datos para un diagnóstico preciso de estas condiciones, por lo que la prueba diagnóstica más fiable es la provocación oral. La alergia al trigo afecta especialmente en etapas tempranas del desarrollo humano, con una prevalencia de entre un 2-9 % en niños, si bien se estima que sólo entre un 0,5-3 % de los pacientes mantienen esta sensibilidad en su edad adulta (Leonard *et al.*, 2017; Sapone *et al.*, 2012). La sintomatología observada incluye las típicas reacciones alérgicas de aparición inmediata (urticaria, angioedema, obstrucción bronquial, náuseas, dolor abdominal), pero algunas veces aparecen síntomas pasadas unas 24 horas de la ingesta, como complicaciones gastrointestinales y exacerbación de la dermatitis atópica (Inomata, 2009). Una de las manifestaciones más severas de la alergia al trigo es la WDEIA, que afecta con mayor frecuencia a adolescentes y adultos cuando el consumo de este cereal va acompañado de otros cofactores como la realización de ejercicio, el uso de medicamentos (aspirina y antiinflamatorios no esteroideos o AINEs) o la ingesta de alcohol. Los pacientes con WDEIA presentan diferentes síntomas clínicos, desde urticaria local o generalizada hasta disnea, hipotensión, colapso y shock (Chinuki y Morita, 2012; Feldweg, 2017; Scherf *et al.*, 2015; Seoane-Rodríguez *et al.*, 2016).

Se han identificado multitud de proteínas del trigo potencialmente activadoras de la respuesta inmune (Pastorello *et al.*, 2007; Šotkovský *et al.*, 2011). Entre ellas, destacan los inhibidores de la α -amilasa/tripsina (ATIs, *amylase-trypsin inhibitors*), unas proteínas de la familia de las albúminas que suponen entre un 2–4 % del contenido proteico del trigo y desempeñan funciones de defensa en la planta (Biesiekierski, 2017). Estas proteínas son las principales responsables de la alergia alimentaria que cursa con dermatitis atópica. Otro grupo importante son las proteínas transportadoras de lípidos, como el alérgeno Tri a 14 que está implicado tanto en el desarrollo de la alergia alimentaria como del asma del panadero, o el Tri tu 14 recientemente identificado por Safi *et al.* (2019) en las variedades de trigo duro. Se ha observado que las IgEs de pacientes con alergia al trigo reconocen también otras proteínas como las β -amilasa-peroxidasas, las tiorredoxinas (Tri a 25), las serpinas (inhibidores de proteasas de serina) y proteínas de la fracción del gluten como las gluteninas de bajo peso molecular y las α -/ ω -gliadinas. En especial, la ω 5-gliadina (Tri a 19) se ha identificado como el principal alérgeno del trigo en el desarrollo de la WDEIA y la urticaria por contacto (Inomata, 2009).

II. 1. 3. 2. Enfermedad celiaca

La enfermedad celiaca es una patología autoinmune sistémica que afecta aproximadamente a un 1 % de la población mundial y que produce una enteropatía inflamatoria crónica debido a la ingesta de gluten en individuos genéticamente predispuestos. Esta prevalencia varía en función del sexo (60-70 % de los pacientes celíacos son mujeres), la edad (se da mayoritariamente en niños) y la localización geográfica (incidencias más altas en Europa, Oceanía y Asia). Estos datos convierten a la enfermedad celiaca en la afección crónica gastrointestinal más frecuente en humanos. Además, se sospecha que debido a la dificultad del diagnóstico y a la existencia de formas de la enfermedad con pocos o ningún síntoma (enfermedad celiaca silente, latente y potencial), el número de individuos afectados se encuentra subestimado (Elli *et al.*, 2015; Ferguson *et al.*, 1993; Haboubi *et al.*, 2006; Lionetti *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2018).

El desarrollo de la enfermedad celiaca está gobernado por una combinación de factores de riesgo, tanto genéticos como ambientales. La predisposición genética juega un papel fundamental en el curso de esta patología, ya que está fuertemente asociada a la existencia en los individuos afectados de determinadas variantes de las moléculas del sistema del antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II, denominadas HLA-DQ2 y HLA-DQ8. (Koehler *et al.*, 2014; Lebwohl *et al.*, 2018). La presencia de estos haplotipos es condición necesaria, pero no

suficiente, para que se desarrolle la enfermedad celiaca, habiéndose descrito otros factores ambientales, además de la exposición al gluten, que podrían estar relacionados con la aparición de la enfermedad celiaca: edad de introducción del gluten en la dieta, episodios previos de infecciones gastrointestinales (rotavirus, infección por *Campylobacter*, etc.), uso de antibióticos y de inhibidores de las bombas de protones o la microbiota intestinal (Bouziat *et al.*, 2017; Ortiz *et al.*, 2017; Tye-Din *et al.*, 2018).

A diferencia de lo que ocurre en la alergia al trigo, la enfermedad celiaca no es una reacción de hipersensibilidad dependiente de IgE, sino que la exposición a fragmentos de gluten en el epitelio del intestino delgado es lo que origina la activación inmunológica de los linfocitos T (De Re *et al.*, 2013). Tras la ingesta de gluten, se produce un aumento de la permeabilidad del intestino cuando el receptor de quimiocinas CXCR3 reconoce ciertos fragmentos proteicos no digeridos, hecho que induce la liberación de zonulina (proteína encargada de modular la permeabilidad de las uniones estrechas entre las células de la pared intestinal). Mientras que para la mayoría de personas no tiene ninguna consecuencia, en individuos cuyo sistema inmunitario reconoce al gluten como un agente extraño, el paso de estos fragmentos desde el lumen hasta la lámina propia es capaz de desencadenar un proceso inflamatorio. Además, durante la fase aguda de la enfermedad, los péptidos del gluten pueden también atravesar la barrera intestinal por la vía transcelular a través del receptor de transferrina CD71 (**Figura 3**) (Hernández, 2015; Leonard *et al.*, 2017).

Las cascadas de reacciones que se originan involucran tanto al sistema inmune innato como al adaptativo. La inmunidad innata juega un papel crítico en la iniciación de la enfermedad celiaca. La producción de citoquinas, como la interleuquina-15 (IL-15) o el α -interferón (TNF- α), activan la respuesta inmunitaria que culmina en la producción de linfocitos intraepiteliales y el reclutamiento de neutrófilos a través de la producción de IL-8. Sin embargo, el mecanismo más característico de esta enfermedad implica al sistema inmune adaptativo y es dependiente de que se produzca la deamidación de los péptidos de gluten por acción de la transglutaminasa tisular (tTG), identificada como el autoantígeno de la enfermedad celiaca (Dieterich *et al.*, 1997). Esta enzima convierte los residuos de glutamina en ácido glutámico, lo que aumenta la carga negativa del péptido y su afinidad para interactuar con los receptores HLA-DQ2/DQ8 expresados en la superficie de las células presentadoras de antígenos (CPAs). Las CPAs presentan estos péptidos a los linfocitos T CD4⁺, lo que induce su activación y proliferación en células efectoras Th1 que estimulan la producción de citoquinas pro-inflamatorias como el interferón- γ (IFN- γ), TNF- α , IL-18 e IL-21. Además, la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas produce la secreción de anticuerpos

anti-transglutaminasa (anti-tTG) y anti-péptidos de gluten deamidados. El resultado de este proceso es la liberación de mediadores de daño tisular que inducen un estado inflamatorio en la mucosa intestinal, originando una hiperplasia de las criptas con atrofia subtotal o total de las vellosidades intestinales. A pesar de que la enfermedad primeramente afecta a la integridad de la pared intestinal causando síntomas digestivos, el proceso inflamatorio puede extenderse a otros órganos como piel y articulaciones (Bruins-Slot *et al.*, 2016; Lebwohl *et al.*, 2018; Leonard *et al.*, 2017; Ortiz *et al.*, 2017).

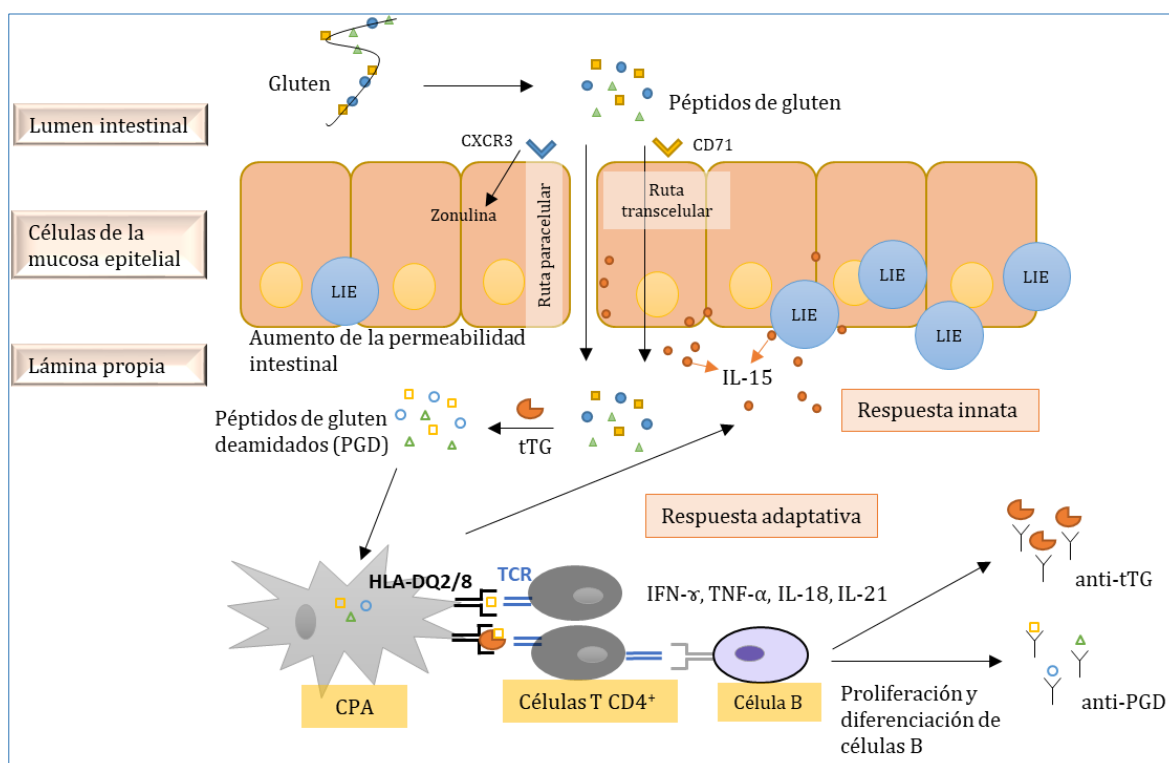


Figura 3. Translocación del gluten desde el lumen hasta la lámina propia a través de mecanismos paracelulares y transcelulares. Cascada de reacciones desencadenadas por el sistema inmune innato y adaptativo tras la exposición a fragmentos de gluten. LIE: linfocitos intraepiteliales; tTG: transglutaminasa tisular; CPA: célula presentadora de antígeno.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad celiaca son muy variables (**Tabla 2**). Algunas de las presentaciones más clásicas suelen darse mayoritariamente en la población infantil, como por ejemplo diarrea, distensión abdominal, falta de apetito o retraso en el crecimiento debido a la malabsorción intestinal. Sin embargo, la población adulta afectada por esta patología suele presentar síntomas de naturaleza extraintestinal, como anemia, osteoporosis, dolor de cabeza y articular, fatiga e incluso manifestaciones neurológicas. Además, determinados grupos de riesgo presentan una mayor probabilidad de desarrollar la

enfermedad celiaca, como los pacientes con enfermedades autoinmunes (diabetes mellitus tipo 1, tiroiditis autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, hepatitis crónica o enfermedad de Addison) o cromosopatías (síndrome de Down, de Turner o de Williams) (Connors *et al.*, 2018; Ortiz *et al.*, 2017).

Tabla 2. Manifestaciones clínicas de la enfermedad celiaca y principales grupos de riesgo (adaptada de Connors *et al.*, 2018).

Síntomas clásicos	Síntomas no clásicos	Síntomas neurológicos
Distensión abdominal	Anemia ferropénica	Ataxia
Dolor abdominal	Estomatitis aftosa	Neuropatía periférica
Diarrea crónica	Defectos dentales del esmalte	Depresión
Anorexia	Estreñimiento crónico	Ansiedad
Irritabilidad	Menarquia retrasada	Fatiga
Pérdida de peso	Infertilidad	Epilepsia con calcificaciones occipitales
Debilidad muscular	Artritis/artralgias	
Dermatitis herpetiforme	Osteoporosis/osteopenia	
	Vómito persistente y recurrente	
	Estatura baja	
	Síndrome del intestino irritable	
	Niveles anormales de enzimas del hígado	
Grupos de riesgo		
Familiars de primer grado de pacientes celiacos		
Pacientes con enfermedades asociadas:		
Enfermedades autoinmunes	Neurológicas y psiquiátricas	Otras enfermedades
Dermatitis herpetiforme	Encefalopatía progresiva	Síndrome de Down
Diabetes tipo I	Síndrome cerebeloso	Fibrosis quística
Déficit selectivo de IgA	Demencia con atrofia cerebral	Síndrome de Turner
Tiroiditis	Leucoencefalopatía	Síndrome de Williams
Síndrome de Sjögren	Epilepsia y calcificaciones	Enfermedad de Hartnup
Enfermedad inflamatoria intestinal		Cistinuria
Lupus eritematoso sistémico		
Enfermedad de Addison		
Nefropatía por IgA		
Artritis reumatoide		
Cirrosis biliar primaria		
Psoriasis y alopecia areata		

En el pre-diagnóstico de esta enfermedad interviene principalmente el análisis serológico de los anticuerpos IgA anti-transglutaminasa (anti-tTG), los IgA anti-endomisio y anticuerpos IgA e IgG frente a péptidos de gluten deamidados. Debido a que los pacientes celíacos presentan frecuentemente déficit de IgA, para validar los resultados se debe determinar conjuntamente el nivel total de estas inmunoglobulinas. Sin embargo, el examen endoscópico y la biopsia duodenal continúan siendo la mejor forma de confirmación de la enfermedad, ya que permiten observar la lesión y analizar la morfología de la mucosa intestinal. Finalmente, en casos dudosos y en aquellos que muestran discordancias entre el resultado serológico y la biopsia intestinal, puede ser de utilidad la determinación de la presencia de los alelos HLA-DQ2/DQ8 en los pacientes (Ortiz *et al.*, 2017).

II. 1. 3. 3. Sensibilidad al gluten no celiaca

La sensibilidad al gluten no celiaca (SGNC), también conocida como sensibilidad al trigo no celiaca, es una entidad emergente que ha sido mal definida durante décadas. Los pacientes diagnosticados con SGNC presentan síntomas gastrointestinales (dolor abdominal, distensión abdominal, diarrea, etc.) y extraintestinales (bradipsiquia o "*foggy-brain*", cefaleas, dolores articulares, fatiga, depresión, etc.) que responden rápidamente a la retirada y reintroducción de gluten en la dieta. Sin embargo, no manifiestan las lesiones típicas de la mucosa duodenal ni la serología características de la enfermedad celiaca. De este modo, la ausencia en este tipo de pacientes de los mecanismos característicos de la celiaquía y de la alergia al trigo (resultados negativos de IgE), sitúa a la comunidad científica ante un nuevo concepto de trastorno alimentario no del todo conocido, asociado con la ingesta de cereales con gluten (Sapone *et al.*, 2012; Volta y De Giorgio, 2012). Debido a la ausencia de marcadores específicos, existe una evidente falta de consenso en el diagnóstico de esta enfermedad que, a día de hoy, se fundamenta principalmente en un diagnóstico de exclusión de otros trastornos relacionados y en la mejoría clínica tras retirar el gluten de la dieta (Biesiekierski *et al.*, 2011; Catassi y Fasano, 2010). A pesar de que la patogénesis de la SGNC no se ha precisado, se piensa que, a diferencia de la enfermedad celiaca, involucra principalmente a mecanismos del sistema inmunitario innato con liberación de IL-15 y estimulación de linfocitos intraepiteliales (Clímaco-Henggeler *et al.*, 2017; Molina-Infante *et al.*, 2014).

La SGNC no se ha vinculado exclusivamente a las proteínas de gluten. Otras proteínas como los ATIs o las aglutininas del germen del trigo (Barbaro *et al.*, 2018; Junker *et al.*, 2012), así como determinados compuestos no proteicos como los oligosacáridos, disacáridos, monosacáridos y polialcoholes fermentables o FODMAPs (*fermentable oligo-, di-, and*

mono-saccharides and polyols), parecen jugar un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad (Catassi *et al.*, 2015; Dieterich *et al.*, 2018). Por lo tanto, los estudios actuales sobre las restricciones dietéticas en la SGNC no permiten concluir de forma definitiva si es la retirada del gluten, la exclusión del trigo o una dieta baja en FODMAPs lo que realmente beneficia a los pacientes (Imperatore *et al.*, 2016; Molina-Infante *et al.*, 2014). Además, a diferencia de la enfermedad celiaca, que implica una enteropatía intestinal crónica, algunos trabajos sugieren que la SGNC podría ser una condición transitoria, por lo que se recomienda comprobar los efectos de la reintroducción del gluten en la dieta pasados 1-2 años del comienzo del tratamiento (Polanco-Allué y Martínez-Ojinaga, 2014).

Se estima que la proporción de individuos afectados con SGNC es incluso superior a la de la enfermedad celiaca, con prevalencias que oscilan entre el 0,6-6 % de la población (Clímaco-Henggeler *et al.*, 2017). Sin embargo, la dificultad de obtener un diagnóstico fiable de esta enfermedad, muchas veces estrechamente solapado con las manifestaciones clínicas de la celiaquía y el síndrome del intestino irritable, provoca que su verdadera prevalencia sea todavía incierta (Molina-Infante *et al.*, 2014).

El único tratamiento disponible para los pacientes que padecen cualquiera de las mencionadas patologías relacionadas con el consumo de cereales con gluten, es la estricta adherencia a una dieta libre de estos ingredientes. De este modo, eliminando de la dieta el trigo, la cebada y el centeno, se logra recuperar la funcionalidad de la mucosa intestinal y la remisión completa de los síntomas (Koehler *et al.*, 2014; Lebowohl *et al.*, 2018; Ortiz *et al.*, 2017). Actualmente, sigue existiendo una gran controversia en lo que se refiere a la seguridad de incluir la avena dentro de la dieta libre de ingredientes con gluten. La avena es el cereal más estrechamente relacionado con el grupo de los cereales con gluten (tribu *Triticeae*), pero pertenece a una tribu separada denominada *Aveneae* dentro de la misma subfamilia (*Pooideae*) (**Figura 4**) (Balakireva y Zamyatnin, 2016; Mamone *et al.*, 2011; Vaquero *et al.*, 2015). El hecho de que la avena esté filogenéticamente más alejada de la tribu *Triticeae* determina que sus prolaminas presenten menos homologías con las prolaminas del trigo, cebada y centeno. En este sentido, su contenido en prolina y glutamina es inferior al de estos últimos cereales, lo que podría contribuir a su menor toxicidad. Sin embargo, diversos trabajos sugieren que la avena es capaz de desencadenar la reacción inmunológica en algunos pacientes celíacos como consecuencia de la activación de las células T de la mucosa intestinal (Lundin *et al.*, 2003; Tuire *et al.*, 2012). Por el contrario, numerosos estudios clínicos afirman que la avena pura es segura para la mayoría de los individuos sensibles (80 %) y que su toxicidad estaría ligada a determinados cultivares de avena y, fundamentalmente, a la contaminación con otras fuentes

de cereales a lo largo de la cadena alimentaria (Comino *et al.*, 2013, 2015; Diaz-Amigo y Popping, 2013; Holm *et al.*, 2006; Kaukinen *et al.*, 2013; Kemppainen *et al.*, 2007; Pinto-Sánchez *et al.*, 2017).

Dado el alto contenido de la avena en proteínas, lípidos, vitaminas, minerales y fibra, se ha descrito que su inclusión en una dieta libre de gluten permite mejorar el estado nutricional de los pacientes celíacos, elevando su calidad de vida y la aceptabilidad de los alimentos formulados específicamente para este colectivo (Fric *et al.*, 2011; Pulido *et al.*, 2009). Por todo ello, el control de las posibles fuentes de contaminación cruzada con otros cereales durante el cultivo de la avena y de todo el proceso de elaboración y manipulación de los productos hasta su envasado, ha permitido la formulación de productos a base de avena aptos para aquellos consumidores celíacos no sensibles a este cereal (Comino *et al.*, 2015; Rosell *et al.*, 2014).

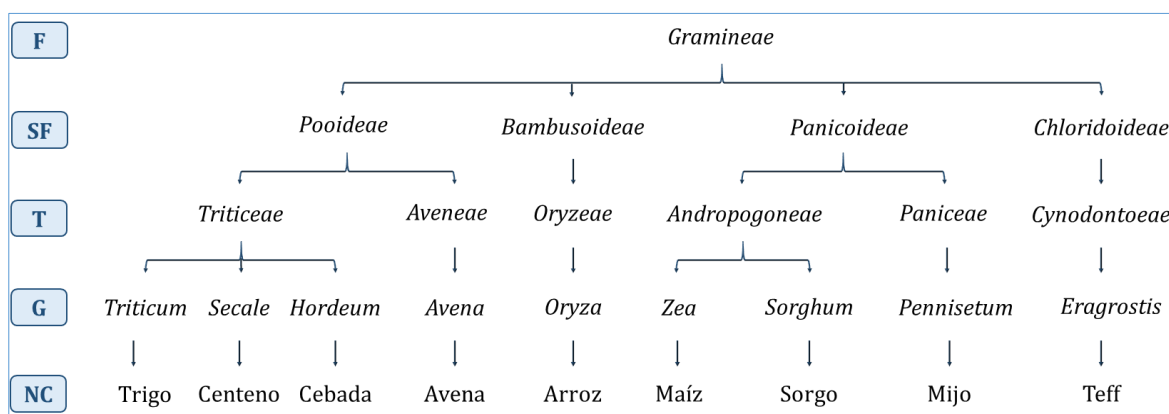


Figura 4. Árbol filogenético de los cereales más comúnmente empleados en alimentación humana. F: familia, SF: subfamilia, T: tribu, G: género, NC: nombre común (adaptada de Mamone *et al.*, 2011).

II. 1. 4. Marco legislativo: información alimentaria facilitada al consumidor

En los últimos años, se han realizado grandes avances en el estudio de terapias alternativas para el tratamiento de la alergia alimentaria, como son la inmunoterapia oral, sublingual y epicutánea o las vacunas con péptidos y proteínas modificadas (Renz *et al.*, 2017; Sicherer y Sampson, 2014). En el caso particular de la enfermedad celíaca, se siguen estudiando diferentes estrategias que abordan desde la detoxificación del gluten de la dieta, hasta el uso de probióticos, parásitos intestinales (*hookworms*), vacunas (*Nexvax2*) o fármacos que permitan modular la respuesta inmune (Croese *et al.*, 2015; Gil-Humanes *et al.*, 2014; Goel *et al.*, 2016; Krishnareddy y Green, 2017; Nylund *et al.*, 2016; Shewry y Tatham, 2016; Tye-Din *et al.*, 2018). A pesar de todos estos avances, la única medida realmente eficaz para proteger a los

consumidores que sufren alguna alergia alimentaria es, a día de hoy, la estricta adherencia de por vida a una dieta de exclusión del ingrediente que desencadena la reacción (Mills *et al.*, 2004; Ortolani y Pastorello, 2006; Sampson *et al.*, 2014).

Para lograr un alto nivel de protección de los consumidores, el Reglamento (CE) 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de enero de 2002, establece que uno de los pilares de la legislación alimentaria es mantenerles debidamente informados para que puedan elegir con conocimiento de causa los alimentos que adquieren. En los últimos años, la disponibilidad de información sobre la gestión de la presencia de alérgenos en los alimentos ha mejorado significativamente, existiendo diversas disposiciones legislativas, europeas y nacionales, que rigen los procesos de producción, distribución, publicidad y venta de alimentos. Entre ellas, el Reglamento (UE) 1169/2011 sobre información facilitada al consumidor, aplicable desde el 13 de diciembre de 2014, establece un total de 14 grupos de ingredientes o sustancias con demostrado potencial alergénico (Anexo II del Reglamento, **Figura 5**) que deben declararse obligatoriamente en el etiquetado de los productos alimenticios que los contengan, independientemente de la concentración final encontrada en el mismo (a excepción del dióxido de azufre y sulfitos). Asimismo, el Real Decreto 126/2015 extiende esta información obligatoria a los alimentos que se presenten sin envasar, tanto al consumidor final como a las colectividades, en los envasados en los lugares de venta a petición del comprador o por los titulares del comercio al por menor, y en los contemplados en los supuestos anteriores y ofrecidos para la venta mediante comunicación a distancia. Recientemente, el 13 de julio de 2017, la Comisión Europea adoptó la Comunicación 428/1 objeto de consulta pública con el fin de ayudar a los consumidores, operadores alimentarios y autoridades nacionales a entender y aplicar estos nuevos requisitos en materia de seguridad alimentaria.

La elaboración de esta lista de ingredientes de declaración obligatoria está basada en dictámenes científicos adoptados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Safety Authority*) para reunir aquellos alérgenos catalogados como prioritarios, es decir, atendiendo a su prevalencia, gravedad de las reacciones que provocan y dosis umbral (en caso de conocerse) (EFSA, 2014; Gendel, 2012). Sin embargo, se ha descrito un amplio espectro de frutas, verduras, semillas, especias y carnes, que también poseen potencial alergénico (Breiteneder y Mills, 2014). En este sentido, los cambios alimentarios debidos a la incorporación de nuevos productos, la elaboración de recetas extranjeras, así como la adherencia a nuevas tendencias alimentarias (vegetarianismo, veganismo, productos orgánicos, etc.), pueden conllevar la introducción de nuevos ingredientes alergénicos en la dieta humana. Por lo tanto, la Comisión Europea no descarta que el listado de ingredientes de

II. INTRODUCCIÓN

alérgenos de declaración obligatoria pueda actualizarse en un futuro próximo para tener en cuenta los últimos avances científicos y conocimientos técnicos al respecto, tal y como recoge el Artículo 21 del Reglamento (UE) 1169/2011.



Figura 5. Representación de los 14 grupos de ingredientes de declaración obligatoria recogidos en el Reglamento (UE) 1169/2011 (Anexo II) por causar alergias o intolerancias alimentarias.

A pesar del marco normativo vigente, la elección de productos adecuados para los consumidores alérgicos no siempre es una tarea fácil, ya que los alérgenos pueden estar presentes en el alimento de forma oculta como resultado de su presencia involuntaria o no declarada en las materias primas empleadas en su elaboración y, consiguientemente, no aparecer reflejados en el etiquetado (Añíbarro *et al.*, 2007; Puglisi y Frieri, 2007; Spanjersberg *et al.*, 2010). Aunque los productores de alimentos se esfuerzan cada vez más por adherirse a unas buenas prácticas de fabricación, los ingredientes alergénicos pueden acabar de manera accidental en los alimentos por diversos factores como las contaminaciones cruzadas derivadas del uso compartido de equipos y plantas de procesado, los errores previos de declaración cometidos por los proveedores o el uso de aditivos y materiales reciclados (Allen *et al.*, 2013). Además, la sustitución fraudulenta de un ingrediente por otro de menor valor económico, especialmente en el caso de productos procesados en los que es difícil reconocer

las características de los ingredientes, puede conllevar también la omisión de ingredientes alergénicos en el etiquetado (Alves *et al.*, 2016; Charlebois *et al.*, 2016; Danezis *et al.*, 2016).

La legislación actual no establece las dosis umbrales de referencia para los alérgenos alimentarios, ni la forma de proceder cuando se produce una contaminación accidental. Este hecho, unido a la incertidumbre sobre los riesgos para la salud de los consumidores sensibles asociados con la ingesta de incluso mínimas cantidades del componente alergénico, ha llevado a la industria alimentaria a adoptar el denominado etiquetado voluntario o preventivo para advertir de la posible presencia de alérgenos no declarados en la lista de ingredientes (Soon y Manning, 2017). Sin embargo, la falta de directrices para la aplicación consistente de este tipo de etiquetado ha conducido al uso abusivo del mismo. Esto limita considerablemente el número de productos seguros disponibles para la población alérgica y conlleva frecuentemente a que este tipo de mensajes sea ignorado, con el consiguiente riesgo asociado con el consumo del alimento (Ward *et al.*, 2010). En este sentido, la EAACI y el sistema VITAL (*Voluntary Incidental Trace Allergen Labelling*) de la industria australiana *Allergen Bureau*, han establecido dosis umbrales de algunos alérgenos principales que no causarían efectos adversos en el 95 % de los consumidores sensibles y que podrían, por tanto, emplearse para proporcionar una mayor seguridad y credibilidad a este tipo de declaración (Allen *et al.*, 2013).

En el caso de la población celiaca, una estricta dieta de exclusión de gluten permite recuperar la normalidad de las microvellosidades intestinales, con una remisión completa de los síntomas en la mayoría de los pacientes (Akobeng y Thomas, 2008). Por el contrario, una mala adherencia a la dieta se ha asociado con un aumento en la incidencia de padecer complicaciones graves como adenocarcinoma y linfoma de células T asociado a enteropatía (Al-Bawardy *et al.*, 2017). Una dieta estricta sin gluten es por lo general difícil de cumplir, ya que esta proteína no se encuentra solo en derivados de cereales fácilmente reconocibles (harinas, panes, bollería, pastas, cervezas, etc.), sino también en numerosos aditivos (espesantes, potenciadores del sabor, emulsionantes, ingredientes de relleno, etc.) empleados en la elaboración de una gran variedad de productos alimenticios, además de en suplementos nutricionales, medicamentos y cosméticos (Bruins-Slot *et al.*, 2016). Por otra parte, es frecuente encontrar contaminaciones de gluten en los granos naturalmente libres de este componente (avena, arroz, maíz, trigo sarraceno, quinoa, etc.) como consecuencia de la rotación de los cultivos o el uso de las mismas instalaciones para su molienda, procesado o transporte (Hernando *et al.*, 2008; Kanerva *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2010; Remington, 2013; Scherf y Poms, 2016).

Con el fin de proteger a la sociedad celiaca, el Codex Alimentarius (Codex Standard 118-1979 de 2008) y los Reglamentos (CE) 41/2009 y (UE) 828/2014, establecen que sólo podrán ser etiquetados como libres de gluten aquellos productos alimentarios que, tal y como se venden al consumidor final, no superen los 20 mg de gluten/kg de producto (Catassi *et al.*, 2007). Asimismo, en el caso de aquellos productos constituidos por uno o más ingredientes procedentes de cereales con gluten que hayan sido específicamente tratados para reducir su contenido en gluten a un nivel comprendido entre 20 y 100 mg/kg, podrán ser etiquetados con la mención “muy bajo contenido en gluten”. La existencia de estos niveles de actuación determina el estándar que deben cumplir los métodos de detección de gluten en alimentos, si bien algunos organismos de certificación solo otorgan la mención “sin gluten” a productos con concentraciones inferiores a 10 mg/kg (como la Federación de Asociaciones de Celiacos de España, FACE).

Para minimizar la exposición involuntaria de los individuos sensibles a los alérgenos alimentarios, la industria sigue esforzándose en mejorar los planes de gestión de alérgenos implantados dentro de sus programas de inocuidad alimentaria. Esta responsabilidad debe cumplirse mediante la aplicación de un programa de prerrequisitos y su integración en el sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) de la empresa, abarcando todas las operaciones que se realizan en la industria, desde la evaluación de proveedores de materias primas, hasta la fabricación y envasado del producto terminado. Además de un correcto etiquetado, los elementos críticos para una adecuada gestión de alérgenos alimentarios incluyen el control de materias primas y proveedores, la formulación de productos, el control del personal (formación y capacitación), el diseño y mantenimiento de equipos e instalaciones, el control del proceso de fabricación y la aplicación de procedimientos de limpieza validados (de la Cruz *et al.*, 2018).

Actualmente, son numerosos los organismos que ofrecen guías para un mejor cumplimiento de la legislación relativa al control de alérgenos alimentarios, como la FDA (*Food and Drug Administration*), la FSA (*Food Standards Agency*) o la FDE (*FoodDrink Europe*). Asimismo, estándares de certificación de seguridad alimentaria mundialmente extendidos, como los desarrollados por BRC (*British Retail Consortium*) o IFS (*International Featured Standards*), incluyen cláusulas con protocolos detallados acerca del manejo y gestión de los alérgenos en las instalaciones de las industrias alimentarias.

II. 2. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETECCIÓN DE ALÉRGENOS ALIMENTARIOS

El peligro asociado a la presencia de alérgenos no declarados en los alimentos ha impulsado la necesidad de disponer de metodologías fiables para detectar y cuantificar estos componentes en los alimentos. Este tipo de análisis requiere de una alta sensibilidad y especificidad, ya que los alérgenos pueden encontrarse en cantidades traza dentro de un alimento formado por varios ingredientes (Parker *et al.*, 2015).

En función del alérgeno a analizar, el tipo de matriz alimentaria en la que se encuentre y los tratamientos tecnológicos aplicados al producto, se han abordado diferentes estrategias analíticas para la detección de ingredientes alergénicos. Dichas estrategias pueden basarse en la detección de las proteínas alergénicas (métodos directos), o bien ir dirigidas a la detección de un marcador que indique la presencia de un determinado ingrediente (métodos indirectos), generalmente la molécula de ADN. Entre los métodos directos más empleados se encuentran el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, *Enzymed-Linked Immunosorbent Assay*) y la espectrometría de masas (MS, *Mass Spectrometry*). En cuanto a los métodos genéticos, la mayoría se basan en la amplificación de fragmentos específicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), principalmente a través de la técnica de PCR en tiempo real. Sin embargo, cabe mencionar que hay también disponibles otras técnicas inmunológicas, fisicoquímicas y genéticas que pueden emplearse para el análisis de alérgenos alimentarios (**Tabla 3**) (EFSA, 2014; Heick *et al.*, 2011; Kirsch *et al.*, 2009; Luber *et al.*, 2014; Monaci y Visconti, 2009; Scherf y Poms, 2016).

Tabla 3. Métodos empleados en la detección de alérgenos alimentarios (adaptado de EFSA, 2014).

Análisis de proteínas		Análisis de ADN
Métodos inmunológicos	Métodos físico-químicos	Métodos basados en la PCR
ELISA	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	PCR convencional
Dispositivos de flujo lateral		PCR en tiempo real
Inmunotransferencia (o <i>Western Blot</i>)	Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	Amplificación isotérmica mediada por loop (qLAMP)
<i>Dot-blot</i>	Electroforesis capilar	MLPA
Biosensores de proteínas	Espectrometría de masas	PCR-ELISA
Microarrays de proteínas		Biosensores de ADN
		Microarrays de ADN

Independientemente de su base analítica, la técnica seleccionada debe sustentarse en un método de extracción que proporcione un elevado porcentaje de recuperación de la molécula diana (proteína o ADN) y debe cumplir los criterios de sensibilidad, especificidad y robustez (repetibilidad y reproducibilidad) necesarios para generar resultados fiables. Hay que señalar que, para la mayoría de alérgenos, se desconoce la dosis mínima que desencadena la reacción alérgica y esta dosis frecuentemente varía con la susceptibilidad individual y el alérgeno en cuestión. A pesar de ello, existe un consenso que establece que para proteger a la mayor parte de los individuos sensibles, los métodos dirigidos al análisis de alérgenos alimentarios deben alcanzar límites de detección de entre 1 y 100 mg/kg del ingrediente alergénico o entre 1 y 10 mg/kg de una determinada proteína o fracción proteica alergénica (Allen *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2016; Blom *et al.*, 2013). Además, para asegurar la adecuada aplicabilidad de la técnica, es necesario estudiar el posible efecto de la matriz alimentaria y del procesado en la determinación del componente alergénico (Poms *et al.*, 2004a).

Una de las mayores limitaciones en la cuantificación de alérgenos alimentarios es la escasez de materiales de referencia certificados (CRMs, *Certified Reference Materials*) disponibles comercialmente. Para poder utilizarse en el desarrollo y validación de un método analítico, los CRMs deben poseer una composición bien establecida y suficientemente homogénea. A pesar de que existen materiales de referencia para la mayoría de los alérgenos prioritarios, hasta la fecha únicamente se ha certificado un CRM para la detección de cacahuete (IRMM-481).

II. 2. 1. Técnicas basadas en la detección de ADN

La mayor estabilidad térmica de la molécula de ADN en comparación con las proteínas y la disponibilidad de un mayor número de dianas a las que dirigir el análisis, han impulsado el empleo de diversas metodologías genéticas para la detección de alérgenos en los alimentos, constituyendo una aproximación relativamente nueva en un campo tradicionalmente dominado por el empleo de los inmunoensayos (Monaci y Visconti, 2010; Poms *et al.*, 2004b). Las técnicas genéticas se han empleado con éxito en áreas como la verificación de la autenticidad de los ingredientes empleados en su elaboración y la detección de contaminantes y agentes patógenos (Holzhauser y Röder, 2014; Mafra *et al.*, 2008; Słowianek y Majak, 2011). Sin embargo, se debe tener en cuenta que, al tratarse de métodos indirectos, en el caso del análisis de alérgenos alimentarios lo que detectan es la presencia de fragmentos de ADN del ingrediente alergénico, pero no la propia proteína causante de la alergia.

II. 2. 1. 1. PCR y PCR en tiempo real

Los métodos genéticos más empleados en el análisis de alimentos se basan en la amplificación de fragmentos específicos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), bien a través de técnicas de PCR convencionales o de punto final (*end-point PCR*) que generan resultados cualitativos, o mediante la técnica de PCR en tiempo real, dotada de potencial cuantitativo. Los análisis de ADN comprenden tres etapas fundamentales: la extracción y purificación del ADN, la amplificación mediante PCR de secuencias específicas y la detección del ADN amplificado.

Kary B. Mullis recibió el Premio Nobel de Química de 1993 en reconocimiento a su trabajo en la década de los ochenta sobre la amplificación *in vitro* de ADN (Mullis *et al.*, 1986). La PCR consigue la amplificación selectiva de una secuencia de ADN mediante una reacción enzimática con una polimerasa termoestable y oligonucleótidos específicos (cebadores o iniciadores de la reacción) que hibridan en regiones del ADN diana que flanquean el fragmento a amplificar (amplicón). La acumulación exponencial del amplicón se consigue gracias a ciclos repetitivos de enfriamiento y calentamiento que implican la desnaturalización de la doble hélice molde, la hibridación de los cebadores y la extensión de estos cebadores por la polimerasa de ADN. Como los nuevos productos sintetizados en cada ciclo sirven de molde para el siguiente, el número de fragmentos se duplica en cada ciclo permitiendo alcanzar niveles detectables tras repetir entre 20-40 ciclos.

La metodología de PCR convencional se basa en la visualización de los resultados de amplificación mediante la separación electroforética de los productos de PCR en geles de agarosa y tinción con un agente fluorescente o mediante electroforesis capilar (Cheng *et al.*, 2016; Lian y Zeng, 2017). En 1993, Higuchi y colaboradores desarrollaron un revolucionario ensayo cinético capaz de monitorizar el transcurso de la PCR al registrar, tras cada ciclo de amplificación, el incremento de fluorescencia generado por el bromuro de etidio que se intercala en el ADN de doble cadena producido (Higuchi *et al.*, 1993).

En los últimos años, los sistemas de PCR en tiempo real han ido evolucionando hasta prácticamente sustituir a los métodos de PCR convencional como técnicas mucho más rápidas y precisas, ya que permiten realizar la amplificación y detección en un único paso. Para ello, los equipos utilizados incorporan detectores de fluorescencia que permiten monitorizar la presencia de los fluorocromos empleados para visualizar el transcurso de la reacción. El valor numérico, que se corresponde con el número del ciclo en el cual el nivel de fluorescencia sobrepasa un determinado nivel umbral definido por el usuario, se denomina Ct (*cycle*

threshold, o ciclo umbral) o *Cp* (*crossing point*, o punto de cruce) y puede relacionarse con la concentración de la especie diana presente en la muestra. Entre las principales ventajas que presenta la técnica de PCR en tiempo real en comparación con la PCR convencional, destacan: (1) visualización del progreso de la PCR conforme se producen los sucesivos ciclos de amplificación, (2) obtención de un resultado numérico que facilita la cuantificación de ADN diana inicial en las muestras, (3) reducción del tiempo necesario para el análisis, (4) minimización de la posibilidad de contaminación con ADN exógeno al realizarse todo el proceso en un mismo tubo y (5) posibilidad de automatización.

A día de hoy, existe una amplia variedad de estrategias para medir los productos de PCR generados en la reacción. Uno de los procedimientos más extendidos por su simplicidad consiste en el empleo de intercaladores de ADN (bromuro de etidio, *SYBR Green*[®], etc.). Sin embargo, este tipo de marcaje presenta el inconveniente de que detecta la acumulación de productos de PCR, tanto específicos como inespecíficos. En este sentido, el empleo de sondas con marcación fluorogénica permite mejorar la especificidad de los sistemas de PCR en tiempo real.

A diferencia de las técnicas que emplean sistemas no específicos para monitorizar la reacción de PCR, las sondas de hidrólisis TaqMan[®] hibridan específicamente con la secuencia de ADN diana, evitando falsos positivos si se generan productos de PCR inespecíficos o dímeros de cebadores (Salihah *et al.*, 2016). Estas sondas están formadas por oligonucleótidos marcados con dos fluorocromos llamados donador (*reporter*) y receptor (*quencher*), situados respectivamente en los extremos 5' y 3'. Cuando la sonda se encuentra íntegra, la proximidad de ambos fluorocromos provoca un fenómeno denominado transferencia de energía de resonancia fluorescente o transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET, *Förster Resonance Energy Transfer*) que bloquea la señal del donador debido al solapamiento entre su espectro de excitación y el espectro de emisión del receptor, anulándose así la fluorescencia de la sonda. Durante la reacción de extensión de los cebadores, si la sonda ha hibridado con la secuencia diana, se produce su hidrólisis debido a la actividad 5'-exonucleasa de la *Taq* polimerasa. Este hecho provoca la liberación del donador que, al separarse del agente receptor, comienza a emitir fluorescencia permitiendo detectar la generación de los productos de PCR a través del incremento de la señal fluorescente (Nagy *et al.*, 2017; Navarro *et al.*, 2015). Uno de los parámetros críticos para el éxito de esta metodología, consiste en emplear sondas de hidrólisis con una temperatura de fusión superior a la de los cebadores de amplificación para garantizar que la sonda hibrida con la secuencia diana en primer lugar. De esta manera, dado que la amplificación del ADN se inicia tan pronto como se produce la hibridación de los

cebadores, la secuencia de hibridación de la sonda no se enmascarará con el ADN sintetizado de *novo*. Además, esta técnica permite la realización de ensayos con capacidad de detección múltiple, ya que pueden emplearse fluoróforos que emitan luz de diferentes longitudes de onda de modo que puedan ser recogidas en canales diferentes del fluorímetro (Köppel *et al.*, 2010; 2012; López-Calleja *et al.* 2015b; 2016).

Debido a su sencillez, rapidez, especificidad y sensibilidad, las técnicas genéticas basadas en la PCR se han convertido en el método complementario a los ensayos inmunológicos más comúnmente empleado para garantizar la autenticidad y seguridad de los productos alimenticios (Mafra *et al.*, 2008; Słowianek y Majak, 2011). En este sentido, los numerosos trabajos publicados en el ámbito de la detección de alérgenos alimentarios sitúan a los análisis de ADN entre las herramientas más potentes y sensibles, alcanzando límites de detección en el intervalo de 0,1-10 mg/kg (de la Cruz, 2017; Holzhauser y Röder, 2014; Martín-Fernández, 2015; Monaci y Visconti, 2010). Además, diferentes casas comerciales disponen de kits de PCR para la detección de alérgenos en alimentos, entre las que destacan *R-Biopharm*, *4Lab Diagnostics*, *Innosieve Diagnostics* y *Mayflower Bioscience*, por la amplia variedad de dianas de detección que ofrecen.

Una alternativa diferente para detectar la presencia de secuencias de ADN amplificadas del ingrediente alergénico es la técnica de PCR-ELISA, que combina la alta especificidad de las técnicas genéticas con la simplicidad analítica de los ensayos ELISA. Para ello, el gen de interés se amplifica mediante PCR en presencia de desoxiuridina trifosfato (dUTP) marcada con digoxigenina. Los productos de PCR generados se incuban a continuación con sondas específicas marcadas con biotina en su extremo 5'. Tras la hibridación, las sondas se inmovilizan sobre una superficie tapizada con estreptavidina y se procede como en un ELISA convencional empleando un anticuerpo anti-digoxigenina para detectar los amplicones inmovilizados mediante una reacción colorimétrica (Holzhauser *et al.*, 2002; Sue *et al.*, 2014).

II. 2. 1. 2. Amplificación dependiente de ligasa de múltiples sondas

La amplificación dependiente de ligasa de múltiples sondas (MLPA, *Multiplex Ligation Probe Amplification*), también conocida como amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples, es una técnica capaz de detectar hasta 50 secuencias genómicas de ADN en una única reacción. Esta metodología, patentada en 1996 por John Carrino, fue descrita por Schouten *et al.* (2002) para la detección simultánea de mutaciones genéticas humanas y actualmente la desarrolla y comercializa la empresa MRC-Holland. Las primeras aplicaciones de la MLPA se

centraron en el campo del diagnóstico clínico enfocado a la detección de variaciones en el número de copias del genoma y el estudio de mutaciones, duplicaciones, deleciones, aneuploidías, SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) y aberraciones cromosómicas asociadas con diferentes enfermedades humanas.

La técnica de MLPA hace uso de dos hemi-sondas de oligonucleótidos para la detección de cada secuencia de interés (**Figura 6**). Cada hemi-sonda consta de una región diseñada específicamente para hibridar en regiones adyacentes del ADN diana (SHI o SHD) y una segunda región complementaria a los cebadores de amplificación (SCI o SCD). En una primera etapa, el ADN de la muestra se desnaturaliza y se incuba con la mezcla de hemi-sondas MLPA. Si la secuencia homóloga está presente en la muestra, los oligonucleótidos complementarios de las hemi-sondas hibridan con secuencias inmediatamente adyacentes. La modificación de fosforilación introducida en el extremo-5' de la hemi-sonda derecha, permite que la enzima ligasa fusione ambas hemi-sondas dando como resultado una sonda de tamaño único para cada secuencia de nucleótidos diana. Dependiendo de las necesidades del experimento, el tamaño de las hemi-sondas puede también modularse añadiendo un adaptador o secuencia de nucleótidos de relleno (*stuffer sequence*) que sirva de espaciador entre las regiones complementarias a los cebadores y las regiones de hibridación con la secuencia diana. Como todas las sondas ligadas poseen secuencias idénticas en sus extremos, la posterior amplificación mediante PCR se lleva a cabo empleando una misma pareja de cebadores universales. Dado que cada hemi-sonda contiene la secuencia específica de uno de los cebadores, el éxito de la reacción de amplificación está condicionado a la ligación previa de ambas hemi-sondas y, consiguientemente, el número de productos de amplificación está ligado al número de secuencias diana presentes en la muestra. Uno de los cebadores se encuentra marcado con un fluoróforo que se incluirá por tanto en el producto final tras el proceso de amplificación. Por último, aprovechando la diferencia de tamaño de cada una de las sondas MLPA, se puede estimar la cantidad de producto de amplificación generado mediante un análisis de fragmentos por electroforesis capilar. Si alguna secuencia no está presente en la muestra, las hemi-sondas correspondientes no se ligarán y por consiguiente, al no amplificarse exponencialmente, no generarán señal.

Comparando la capacidad de *multiplexing* con respecto a los ensayos de PCR en tiempo real múltiple, la técnica de MLPA permite la detección de un mayor número de secuencias en una misma reacción. Además, al emplear una única pareja de cebadores, se simplifican los pasos previos necesarios para optimizar las condiciones de la reacción que maximizan la eficiencia de la amplificación (Köppel *et al.*, 2012; Mustorp *et al.*, 2011).

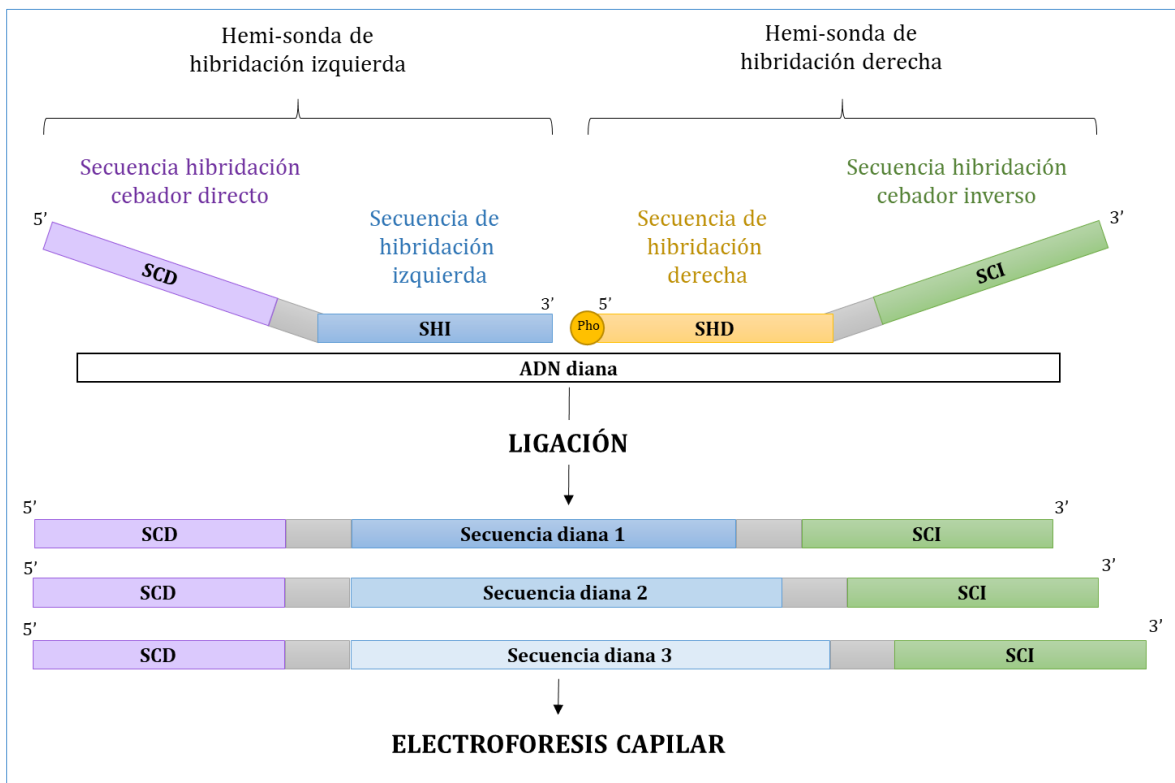


Figura 6. Esquema de las hemi-sondas empleadas para la detección de secuencias específicas de ADN mediante la técnica de MLPA.

Las primeras aplicaciones de la técnica de MLPA al análisis de alimentos estuvieron dirigidas a la detección de organismos modificados genéticamente (Ehlert *et al.*, 2008; Guertler *et al.*, 2014; Holck *et al.*, 2009; Moreano *et al.*, 2006). La detección de alérgenos alimentarios mediante esta técnica es todavía incipiente, pero los trabajos publicados en este área demuestran el gran potencial de multidetección de la técnica, que alcanza límites de detección de 5-10 mg/kg de los ingredientes alergénicos (Ehlert *et al.*, 2009; Mustorp *et al.*, 2011; Unterberger *et al.*, 2014).

II. 2. 1. 3. Amplificación de ADN isotérmica mediada por bucle

La técnica de amplificación de ADN isotérmica mediada por bucle (LAMP, *Loop-Mediated Isothermal Amplification*), al igual que la PCR, tiene la capacidad de amplificar selectivamente fragmentos específicos de ADN de la secuencia diana, con la ventaja de que la reacción puede completarse en un menor tiempo y empleando condiciones isotérmicas. Esta técnica emplea enzimas como la Bst polimerasa aislada de *Bacillus stearothermophilus* o la Bsm polimerasa aislada de *Bacillus smithii*, que presentan actividad enzimática a 66 °C y 63 °C, respectivamente.

Una de las principales ventajas es que no requiere el uso de termocicladores, ya que los ensayos pueden realizarse en dispositivos de calefacción que mantengan una temperatura estable. La efectividad de la técnica LAMP radica en el diseño de los cebadores. El método requiere el uso de 6 cebadores diferentes: 2 cebadores externos (denominados F3 y B3), 2 cebadores internos que contienen secuencias sentido y antisentido para favorecer la formación de un bucle (denominados *forward internal primer* o FIP y *backward internal primer* o BIP) y 2 cebadores bucle que aceleran la reacción de amplificación (*forward loop primer* o FLP y *backward loop primer* o BLP) (**Figura 7**). Los cebadores FLP y BLP se emplean únicamente en la denominada LAMP en tiempo real (qLAMP).

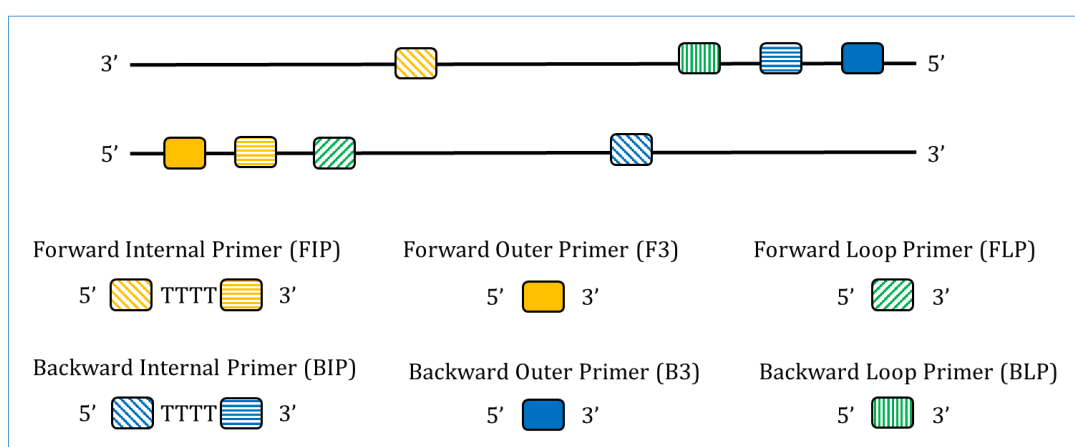


Figura 7. Representación esquemática de los cebadores empleados en la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle en tiempo real (qLAMP).

Aunque el diseño previo de los cebadores es más complejo que en el caso de la PCR convencional o en tiempo real, el manejo de la metodología es muy sencillo y permite la visualización directa (*naked-eye*) de los resultados debido a la liberación de pirofosfatos que originan turbidez en la mezcla de reacción. Además, también pueden emplearse agentes intercalantes para seguir la evolución en tiempo real de la reacción de polimerización (Parida *et al.*, 2008).

Las primeras aplicaciones de la técnica LAMP estuvieron encaminadas al diagnóstico de enfermedades infecciosas (Wong *et al.*, 2018) y tan solo recientemente ha empezado a aplicarse al análisis de alimentos en áreas como la detección de microorganismos patógenos o la detección de alérgenos alimentarios, entre otras (Focke *et al.*, 2013; Salihah *et al.*, 2016). La técnica es rápida y específica, no requiere instrumentación compleja y aporta niveles de

sensibilidad próximos a los de la PCR en tiempo real (D'Agostino *et al.*, 2016; Garrido-Maestu *et al.*, 2018).

II. 2. 2. Técnicas basadas en la detección de proteínas

II. 2. 2. 1. Inmunoensayos

Los inmunoensayos son metodologías analíticas basadas en el reconocimiento específico entre un anticuerpo y su correspondiente antígeno. Los anticuerpos más comúnmente empleados en este tipo de análisis son las inmunoglobulinas IgG producidas en animales o IgY si proceden de la yema de huevo de gallinas inmunizadas. Cuando los anticuerpos se obtienen a partir del suero de animales inmunizados, dado que un mismo antígeno puede contener diferentes epítopos, el inmunógeno inducirá la producción de anticuerpos con diferente capacidad de reconocimiento. En esta situación, las IgGs que se producen provienen de diferentes clones de linfocitos B, por lo que se denominan anticuerpos policlonales y pueden presentar especificidades diferentes. A partir de 1975, con la publicación del trabajo sobre la tecnología de hibridomas, se impulsó el desarrollo de técnicas de inmunodetección que emplean anticuerpos monoclonales (Köhler y Milstein, 1975). Los hibridomas son células híbridas obtenidas tras la fusión de linfocitos extraídos del bazo de un animal con células cancerosas inmortales de rápida reproducción (mieloma). Mediante esta técnica, es posible obtener anticuerpos procedentes de un único clon de células B, incrementando así la especificidad de los inmunoensayos. El descubrimiento de esta tecnología supuso el reconocimiento a sus creadores, Köhler y Milstein, con el Premio Nobel en Fisiología y Medicina de 1984.

Las inmunoglobulinas IgG son tetrámeros formados por cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas (440 aminoácidos) y dos cadenas ligeras (220 aminoácidos) unidas entre sí mediante puentes disulfuro. Ambos tipos de cadenas poseen una región constante (C) en el extremo carboxi-terminal y una región variable (V) en el extremo amino-terminal, que será la que determine la capacidad del anticuerpo para reconocer a un determinado antígeno. La variabilidad de estas regiones V no se distribuye uniformemente, sino que se concentra en las denominadas regiones hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDR, *complementary determining regions*) que son las que configuran el sitio de unión al antígeno (**Figura 8**) (Miersch y Sidhu, 2012; Zeng *et al.*, 2012).

La búsqueda de alternativas a los anticuerpos producidos mediante inmunización de animales de experimentación, consecuentes con la vigente normativa sobre bienestar animal, está motivando incesantes avances en el campo de la tecnología del ADN recombinante. Entre ellos, destaca un nuevo tipo de sondas de afinidad alternativas a las inmunoglobulinas convencionales: los fragmentos de anticuerpos recombinantes (de la Cruz *et al.*, 2013a, 2015; Hudson y Kortt, 1999; Jeong *et al.*, 2011; Ledsgaard *et al.*, 2018; Madrid *et al.*, 2018). Existen diferentes tipos de anticuerpos recombinantes, entre los que destacan los fragmentos de unión al antígeno o Fab (*fragment-antigen-binding*), los fragmentos variables de cadena sencilla o scFv (*single chain variable fragment*) y los anticuerpos de dominio único o dAb (*single domain-antibodies*) (**Figura 8**) (Ghassabeh *et al.*, 2013; Saerens *et al.*, 2008; Weisser y Hall, 2009). Además, los anticuerpos también pueden reemplazarse por aptámeros (ácidos nucleicos de cadena sencilla) y péptidos que reconocen una determinada diana proteica con gran afinidad (Chen *et al.*, 2011; Szeto *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2019).

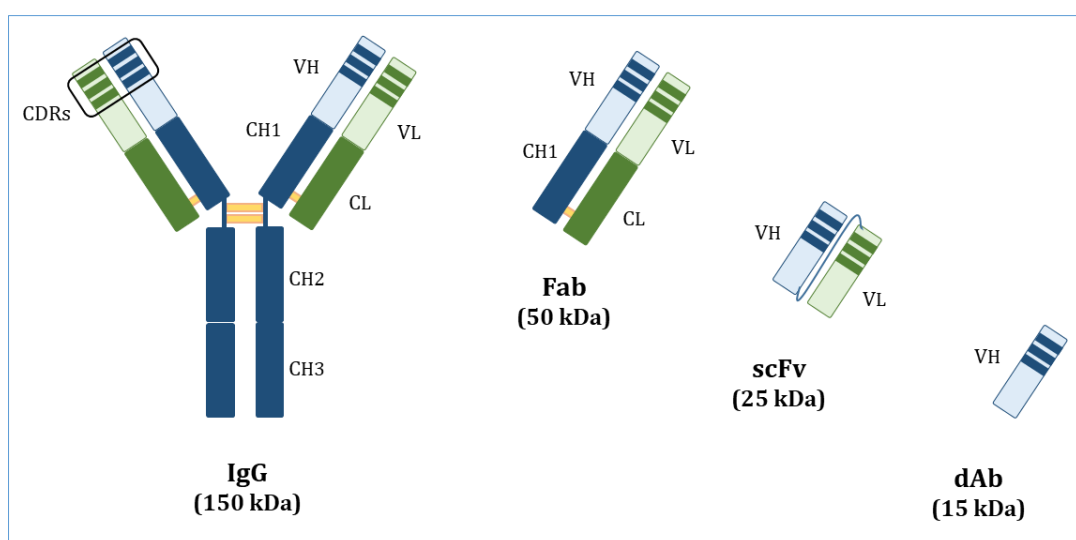


Figura 8. Representación esquemática de una inmunoglobulina IgG y de algunos de los principales fragmentos de anticuerpos empleados en técnicas inmunológicas: fragmento de unión al antígeno (Fab) fragmento variable de cadena pesada (scFv) y anticuerpo de dominio único (dAb). VH: región variable de la cadena pesada; CH(1-3): región constante de la cadena pesada; VL: región variable de la cadena ligera; CL: región constante de la cadena ligera; CDR: regiones hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad. Puentes disulfuro indicados en amarillo.

En la actualidad, la técnica de ELISA es la más reconocida y empleada en los análisis rutinarios de alimentos, tanto en las empresas alimentarias como en las agencias reguladoras, ya que posee una elevada sensibilidad y proporciona resultados rápidos y fiables. Además, es una metodología sencilla y de fácil manejo que puede automatizarse para el análisis de varias

muestras a la vez (Bruins-Slot *et al.*, 2016; Diaz-Amigo y Popping, 2013; Poms *et al.*, 2004a). Cuando se dispone de un estándar del analito, la técnica de ELISA permite la cuantificación del alérgeno por interpolación de los valores de absorbancia generados en la curva de calibración. Sin embargo, dado que la determinación puede verse afectada por el tipo de matriz alimentaria y los métodos de procesado aplicados, la curva estándar puede no ser completamente representativa de la muestra analizada (Besler *et al.*, 2001; Sathe *et al.*, 2005).

Existen diversas variantes de las técnicas inmunoenzimáticas según la fase sólida utilizada, el componente de la reacción que se fija en primer lugar o si se emplean concentraciones limitantes de antígeno o anticuerpo. Dentro de los formatos de ELISA más extendidos en la determinación de alérgenos alimentarios destaca el tipo sándwich, que requiere un primer anticuerpo (de captura) que inmoviliza los antígenos presentes en la muestra, y un segundo anticuerpo (de detección) que detecta el complejo antígeno-anticuerpo formado. El principio de la cuantificación se basa en el empleo de marcadores enzimáticos para detectar la interacción antígeno-anticuerpo. El anticuerpo de detección se encuentra conjugado a una enzima (generalmente la peroxidasa de rábano o HRP), por lo que la adición del sustrato cromogénico produce una reacción colorimétrica debido a la actividad enzimática. No obstante, cuando la muestra a analizar se encuentra altamente procesada se recomienda usar el formato de ELISA competitivo, como ocurre por ejemplo con la detección de gluten en productos hidrolizados (cervezas, siropes, malteados, etc.). En este caso, únicamente se requiere de un sitio de reconocimiento antígeno-anticuerpo, a diferencia del formato sándwich que necesita dos epítomos intactos para poder desarrollarse. En este diseño, el anticuerpo compite por su unión al antígeno inmovilizado en la fase sólida o al antígeno de la muestra presente en solución, por lo que la absorbancia generada será inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra (Mujico *et al.*, 2012; Sajic *et al.*, 2017; van Hengel, 2007). La sensibilidad alcanzada en los ensayos ELISA es generalmente muy buena, con límites de detección de hasta 0,07-1,5 mg/kg en función del ingrediente alérgico y de la matriz analizada (EFSA, 2014; Monaci y Visconti, 2010).

Además del ELISA, existen otros inmunoensayos que han ido ganando terreno gracias a su alta sensibilidad, como los ensayos de quimioluminiscencia (CLIA, *ChemiLuminescence ImmunoAssay*) y de inmunofluorescencia (FLISA, *Fluorescence-Linked Immunosorbent Assay*). En estas técnicas, el anticuerpo se encuentra marcado, respectivamente, con una enzima que cataliza una reacción quimioluminiscente o con un fluoróforo, por lo que en lugar de medir un cambio de color, lo que se genera es la emisión de luz (Oelschlaeger *et al.*, 2002; Qin y Jin-Ming, 2015; Yang *et al.*, 2014).

Una versión simplificada de los ensayos de ELISA son las tiras reactivas (o *dipsticks*) y los dispositivos de flujo lateral (DFL), para los que de igual modo se dispone de formatos sándwich y competitivo. Estos dispositivos presentan la ventaja de que son rápidos, baratos y fáciles de usar, ya que no requieren ningún tipo de instrumentación. Sin embargo, son métodos únicamente cualitativos o semi-cuantitativos, por lo que no permiten conocer la concentración exacta de alérgeno en la muestra. La **Figura 9** muestra un esquema de un DFL formado por una membrana de nitrocelulosa o polifluoruro de vinilideno (PVDF) a través de la cual la muestra asciende por capilaridad. En este tipo de dispositivos, la muestra se deposita en una superficie absorbente adyacente a la almohadilla conjugada en la cual están presentes los anticuerpos de detección marcados con partículas coloreadas, enzimas o moléculas fluorescentes. Si la muestra contiene el analito, se forma el complejo antígeno-anticuerpo que migra a través de la membrana hasta llegar a una región que contiene el anticuerpo de captura específico (línea de test), atrapando el complejo marcado. Por lo tanto, el nivel de coloración de la línea de test será proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra. Además, el dispositivo posee una segunda región donde se encuentran inmovilizados anticuerpos de captura frente al anticuerpo de detección (línea control), zona que tiene que desarrollar coloración para dar el resultado como válido (Rice y Lupo, 2014; Schubert-Ullrich *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2016).

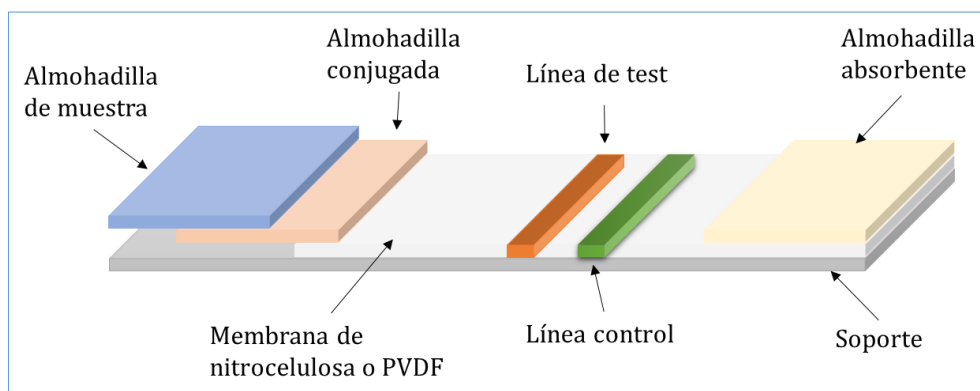


Figura 9. Esquema de un dispositivo de flujo lateral.

En el mercado hay disponibles kits comerciales para la detección de los principales alérgenos de declaración obligatoria, basados tanto en ensayos de ELISA como en DFL, dos de los inmunoensayos más versátiles y estandarizados. El trabajo publicado recientemente por Ross *et al.* (2018) incluye una interesante y actualizada revisión de los kits comerciales más empleados para la detección de alérgenos como el gluten, soja, leche, huevo, cacahuete, frutos de cáscara (almendra, nuez de Brasil, anacardo, avellana, macadamia, pistacho, piñón, pacana

y nuez), coco, sésamo, crustáceos, pescados, altramuces y mostaza. Entre las principales casas que los comercializan se encuentran: *R-Biopharm*, *Romer Labs*, *Neogen*, *Biomedal Diagnostics*, *Immunolab*, *Crystal Chem*, *BioFront Technologies* y *ELISA Systems*. Cabe mencionar que, debido a la posible reactividad cruzada de los anticuerpos de estos inmunoensayos y a la variabilidad observada entre los kits distribuidos por las diferentes casas comerciales, a menudo se recomienda realizar un análisis de confirmación de las muestras positivas mediante otras técnicas no inmunológicas como la espectrometría de masas o las técnicas genéticas (Croote y Quake, 2016; Holzhauser, 2018; Platteau *et al.*, 2011b; Tanner *et al.*, 2013b).

II. 2. 2. 2. Espectrometría de masas

El gran avance tecnológico de la espectrometría de masas (MS) ha permitido comprender mejor la compleja naturaleza de las proteínas, convirtiendo a esta técnica en una potente herramienta de base no inmunológica para la detección de alérgenos alimentarios. Esta técnica analítica se caracteriza por su rapidez, precisión, alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad y permite la identificación inequívoca de múltiples alérgenos y sus isoformas, incluso en productos procesados en los que las modificaciones físicas o químicas pueden afectar a la estabilidad de las proteínas. Aunque el tratamiento previo de la muestra es sencillo, el análisis por MS requiere el uso de una instrumentación compleja, cuyo precio y mantenimiento es considerablemente elevado. Este hecho, unido a la necesidad de personal cualificado para realizar los análisis, limita la utilidad de esta técnica para determinaciones rutinarias (Croote y Quake, 2016; Monaci y Visconti, 2009; Sancho y Mills, 2010).

Los análisis realizados mediante MS se apoyan en técnicas complementarias de prefraccionamiento que permitan purificar la proteína de interés, como pueden ser la electroforesis unidimensional o bidimensional y la cromatografía líquida. Un espectrómetro de masas cuenta con tres componentes fundamentales: una fuente de ionización, un analizador de masas y, finalmente, un detector. En el caso concreto del análisis de alérgenos alimentarios, las más empleadas son las fuentes de ionización suaves: desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) y la ionización por electroespray (ESI, *ElectroSpray Ionization*). Una vez formados los iones, el analizador de masas los separa en función de su relación masa/carga (m/z). Los analizadores de masas más utilizados son el cuadrupolo (Q, *Quadrupole*), la trampa de iones (IT, *Ion Trap*), el tiempo de vuelo (TOF, *Time of Flight*) y las combinaciones híbridas de los mismos (Bantscheff *et al.*, 2007; Domon y Aebersold, 2006).

La técnica de MS puede emplear dos estrategias diferentes denominadas *bottom-up* (de abajo a arriba) y *top-down* (de arriba abajo), en función de si se analizan las proteínas digeridas o intactas, respectivamente.

Para llevar a cabo la determinación de alérgenos alimentarios, generalmente se procede a la digestión previa de la muestra con una o varias enzimas proteolíticas (estrategia *bottom-up*). En esta estrategia, para identificar la proteína de la que proceden, los péptidos generados pueden analizarse mediante MS a través del estudio de la huella peptídica (PMF, *Peptide Mass Fingerprint*) o mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) estudiando el patrón de fraccionamiento de los péptidos (PFF, *Peptide Fragment Fragmentation*). Los espectros de MS/MS ofrecen una gran cantidad de información estructural, consiguiendo en muchos casos la secuenciación completa de los péptidos de interés, así como la identificación de los eventos postraduccionales que haya podido sufrir el alérgeno (Monaci y Visconti, 2009; Picariello *et al.*, 2011). Los ensayos *bottom-up* que emplean como método de separación la cromatografía líquida se engloban dentro de la denominada proteómica *shotgun*, y permiten la detección de compuestos poco abundantes aunque con peor resolución en comparación con la electroforesis bidimensional. Este tipo de análisis alcanza límites de detección del orden de 1-5 mg/kg del ingrediente alergénico, ya que los péptidos se separan más eficazmente que las proteínas (de la Cruz, 2017; EFSA, 2014).

Por otra parte, gracias al desarrollo de instrumentos de MS de alta resolución, hoy en día se puede realizar el análisis de proteínas intactas para estudiar los iones de fragmentación generados (estrategia *top-down*). Para ello, se requiere conocer perfectamente el alérgeno de interés y disponer de estándares del analito. El método más empleado se denomina monitorización de reacciones múltiples (MRM, *Multiple Reaction Monitoring*) y se engloba dentro de los análisis de proteómica cuantitativa selectiva. El espectrómetro de masas en el que se realizan estos análisis es el triple cuadrupolo (QQQ), donde el primer y último Q actúan como filtros de masa estáticos, y el segundo Q funciona como una célula de colisión para fragmentar el ión precursor en iones producto. De esta forma se consigue un método dirigido a la determinación de un péptido concreto presente en el alérgeno de interés, aumentando la sensibilidad del análisis (Mamone *et al.*, 2011; Planque *et al.*, 2017). Además, esta técnica permite monitorizar simultáneamente un gran número de péptidos aumentando aún más la selectividad y exactitud a la hora de cuantificar el alérgeno (Croote y Quake, 2016; Sancho y Mills, 2010).

El apoyo decisivo a los análisis de proteínas mediante MS lo proporcionan, sin duda, las herramientas bioinformáticas necesarias para la correcta interpretación de los espectros de masas generados. Las identificaciones suelen realizarse automáticamente a través de programas informáticos potentes y comercialmente accesibles, como *Mascot* y *SEQUEST*, en combinación con bases de datos públicas continuamente actualizadas (NCBI y *SwissProt*) (Picariello *et al.*, 2011).

II. 2. 2. 3. Biosensores

Desde hace unos años, los biosensores se están perfilando como una tecnología emergente para el análisis de alérgenos alimentarios. Un biosensor está compuesto por dos elementos funcionales integrados: un receptor biológico diseñado para reconocer específicamente una diana determinada y un transductor capaz de interpretar la reacción que se produce en el receptor y generar una señal cuantificable (**Figura 10**). De esta forma, el biosensor proporciona una información cuantitativa o semi-cuantitativa del proceso que podrá relacionarse con la concentración del analito en la muestra. Según la naturaleza del receptor y del transductor, se han desarrollado una gran variedad de dispositivos biosensores. Dentro de los receptores biológicos más empleados, se encuentran los anticuerpos, las enzimas, las secuencias de oligonucleótidos y los receptores proteicos. Por su lado, en función de la naturaleza del transductor los biosensores se clasifican en ópticos, electroquímicos, piezoeléctricos y termométricos (Alves *et al.*, 2016; Campuzano *et al.*, 2016; Prado *et al.*, 2016; Ross *et al.*, 2018; Yasmin *et al.*, 2016).

En comparación con los métodos analíticos convencionales que a menudo conllevan varias etapas y resultan laboriosos, el diseño de los biosensores proporciona un dispositivo portátil, de fácil manejo y que permite realizar análisis rápidos a un coste asequible (Gómez-Arribas *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2017). En este sentido, una interesante alternativa a los ensayos de ELISA aplicados al análisis de alérgenos alimentarios consiste en el empleo de biosensores basados en sistemas microfluídicos que permiten reducir considerablemente el tiempo de análisis y el volumen de reactivos necesario, abaratando el coste del método sin comprometer su sensibilidad (Chiriaco *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2010; Luka *et al.*, 2015; Weng *et al.*, 2016). La mayoría de los biosensores desarrollados para la determinación de ingredientes alergénicos se basan en la detección de las proteínas a través del uso de anticuerpos, los denominados inmunosensores. No obstante, también se han desarrollado biosensores dirigidos a la detección de ácidos nucleicos o genosensores, que permiten alcanzar límites de detección en

el intervalo de 1-10 mg/kg del ingrediente alergénico (López *et al.*, 2014; Martín-Fernández *et al.*, 2017; 2016; Neethirajan *et al.*, 2018).

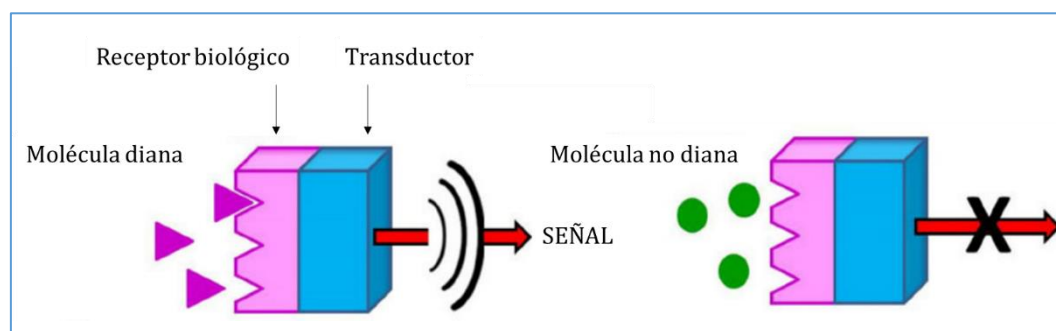


Figura 10. Representación esquemática de un biosensor (adaptada de Yasmin *et al.* 2016).

Los biosensores ópticos basados en la resonancia de plasmones superficiales (SPR, *Surface Plasmon Resonance*) destacan entre los más utilizados para el análisis de alimentos. La SPR es un fenómeno óptico que ocurre cuando la luz polarizada incide sobre una capa delgada metálica, generalmente de oro o plata, que se sitúa entre un prisma y la muestra. Como el prisma posee un mayor índice de refracción que la capa metálica, la luz incide con un determinado ángulo en la interfase que se crea entre ambos. Para un determinado ángulo de incidencia, denominado ángulo de resonancia, se produce la excitación de un plasmón superficial (oscilaciones colectivas de los electrones de conducción del metal). Este ángulo de resonancia varía en función del índice de refracción del medio situado al lado opuesto de la capa metálica. Cuando el analito interactúa con el elemento de reconocimiento (inmovilizado sobre la superficie de oro) provoca un cambio del índice de refracción en la superficie del metal que conlleva un desplazamiento en el ángulo de resonancia que es registrado por el detector. Este sistema de detección permite medir la muestra sin necesidad de complejos pasos previos de purificación y sin tener que emplear ningún marcaje para monitorizar la interacción. Los biosensores de SPR se han utilizado para la detección de los principales alérgenos alimentarios (cacahuete, frutos de cáscara, huevo, leche, marisco, pescados, altramuza, etc.) alcanzándose límites de detección inferiores a 5 mg/kg (Rebe Raz *et al.*, 2010; Wammes *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2019).

Otro tipo de biosensor que no requiere ningún tipo de marcaje para llevar a cabo la detección del alérgeno es la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM, *Quartz Crystal Microbalance*). Estos biosensores están basados en el efecto piezoeléctrico, fenómeno físico que presentan algunos cristales por el que adquieren una diferencia de potencial eléctrico

entre algunas de sus caras al ser sometidos a una deformación mecánica. Un sensor tipo QCM consiste en un disco delgado de cuarzo situado entre dos electrodos. Gracias a las propiedades piezoeléctricas del cristal, cuando se aplica un voltaje entre los electrodos se produce una deformación del mismo que induce la aparición de oscilaciones. La frecuencia de resonancia a la que vibra el cristal de cuarzo es característica del material y varía en función de la masa que se haya depositado sobre él. De esta forma, el cambio de frecuencia registrado en el detector será proporcional a la cantidad de analito reconocido por el receptor biológico del sensor situado sobre el cristal, comportándose como una balanza (Funari *et al.*, 2017; Thakur y Ragavan, 2013; Xiulan *et al.*, 2010).

II. 3. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN *in vitro* DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS

En la actualidad, los anticuerpos disponibles para la determinación de alérgenos en alimentos se han obtenido mediante la inmunización de animales con extractos proteicos de la especie de interés para la obtención de sueros inmunes convencionales (anticuerpos policlonales) o la extracción de linfocitos B del bazo para generar hibridomas (anticuerpos monoclonales). Sin embargo, desde la formulación del “principio de las tres erres” de Russel y Burch, la bioética trata de refinar y reducir el uso de animales de experimentación, instando a reemplazar su uso por otros procedimientos experimentales siempre que sea posible (Russel y Burch, 1959). Esta necesidad se ve reflejada en la Directiva Europea 2010/63/EU, transpuesta a la legislación española a través del Real Decreto 53/2013, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos.

En este sentido, las técnicas de ingeniería genética han evolucionado durante las últimas décadas para ofrecer estrategias innovadoras en la producción y selección de anticuerpos monoclonales que no requiera de la inmunización previa de animales. Además, el avance de la ingeniería de anticuerpos ha permitido el diseño de nuevos sitios funcionales de unión a antígenos conocidos como fragmentos de anticuerpos, que suponen una interesante alternativa a las inmunoglobulinas naturales en el desarrollo de metodologías analíticas. Entre las estrategias más comúnmente empleadas para la selección de fragmentos de anticuerpos, destaca la tecnología de presentación sobre fagos filamentosos o *phage display*, si bien existen otros formatos de presentación como los ribosomas y las superficies celulares (bacterias, levaduras y células mamíferas) (de Marco, 2011; Sergeeva *et al.*, 2006; Teixeira y Gonzalez-Pajuelo, 2018; Uchański *et al.*, 2019).

Los métodos de producción de anticuerpos recombinantes son menos laboriosos y costosos en comparación con la tecnología de hibridomas y, dado que no se generan en animales, pueden obtenerse anticuerpos frente a todo tipo de dianas, incluyendo compuestos con baja capacidad inmunogénica o que resultan tóxicos o inestables en animales, así como antígenos altamente conservados y auto-antígenos. Otra de las principales ventajas de las técnicas *in vitro* es que permiten un mayor control de la naturaleza de los anticuerpos producidos mediante la manipulación de las condiciones de selección, como por ejemplo a través de la incorporación de moléculas competidoras que modulen la afinidad hacia dianas o epítomos específicos y, puesto que pueden definirse las condiciones de producción, la variabilidad entre los diferentes lotes es despreciable. Además, tanto la secuencia nucleotídica como proteica del anticuerpo son conocidas, por lo que se puede garantizar su identidad en los diferentes lotes producidos y se facilita la transmisión de conocimientos científicos y tecnológicos (Birch y Racher, 2006; Hammers y Stanley, 2014; Hentrich *et al.*, 2018; Hwang y Foote, 2005). Por último, gracias a la tecnología del ADN recombinante, es posible incluir modificaciones funcionales en las moléculas seleccionadas para dotar a los anticuerpos con diversas propiedades, como el marcaje con dominios específicos que favorezcan su purificación, inmovilización o detección en diversas aplicaciones analíticas y terapéuticas (de la Cruz, 2017; Joosten *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2018; Panjideh *et al.*, 2008).

II. 3. 1. Tecnología de *phage display*

La tecnología de presentación sobre fagos filamentosos o *phage display* nació en 1985, cuando George P. Smith demostró que los fagos M13 tenían la capacidad de expresar en su superficie proteínas exógenas al fusionar los genes que codifican para las proteínas de la cápside con el gen codificante de la proteína expresada (Smith, 1985). Posteriormente, esta técnica surgió como una poderosa alternativa a la tecnología de hibridomas para la producción de anticuerpos monoclonales mediante el cribado de genotecas combinatorias basadas en la expresión de millones de fragmentos de anticuerpos diferentes sobre la superficie de fagos (Huse *et al.*, 1989; Parmley y Smith, 1988). Dada la gran relevancia que ha supuesto el desarrollo de esta tecnología, G. P. Smith y Gregory P. Winter (*Laboratory of Molecular Biology*) han sido recientemente galardonados con el Premio Nobel de Química de 2018.

De las diferentes clases de bacteriófagos que existen, los fagos filamentosos que tiene la capacidad de infectar bacterias gram negativas mediante ciclos de replicación no líticos, son los más empleados en *phage display*. Los fagos mejor caracterizados con este fin son el M13, Fl y Fd, que dada su alta homología genética (98 % del material genético compartido) son

denominados en conjunto fagos Ff. Estos fagos infectan de manera específica a células de *Escherichia coli* que portan el plásmido conjugativo denominado factor de fertilidad o factor F. Entre ellos, el fago filamentoso M13 es el vector de expresión más comúnmente empleado en la construcción de genotecas recombinantes. Estos fagos están compuestos por una única molécula de ADN monocatenario (ADNmc) circular (6-7 kilobases) y una cápside de estructura cilíndrica de aproximadamente 7 nm de ancho y 900 nm de longitud. Esta cubierta alargada consiste principalmente en miles de copias de la proteína mayor de recubrimiento pVIII, proteína estructural principal del fago que alberga el genoma vírico (**Figura 11**). El resto de proteínas de superficie se encuentran en los extremos del fago, compuestas por 5 copias de cada una de las siguientes proteínas minoritarias: uno de los extremos está formado por las proteínas pVII y pIX y el otro por las pIII y pVI (Bratkovič, 2010; Sidhu, 2001; Smith y Petrenko, 1997; Teixeira y Gonzalez-Pajuelo, 2018).

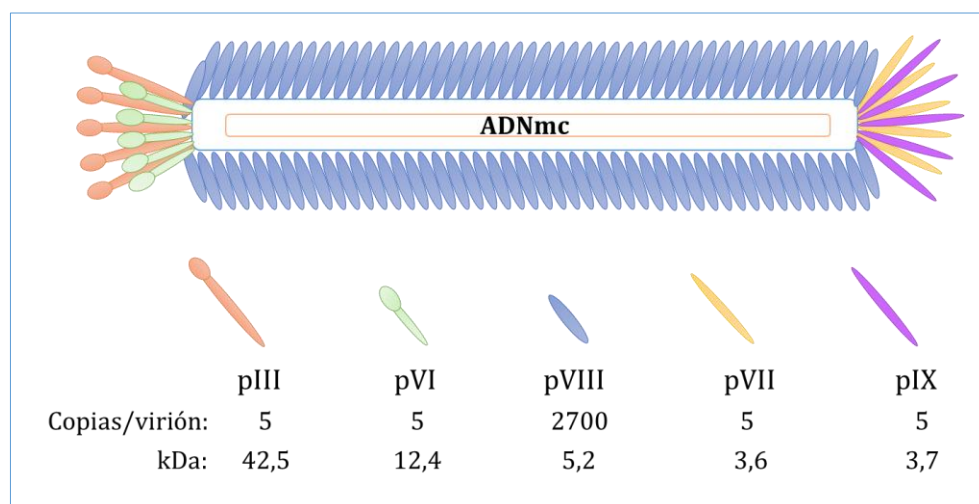


Figura 11. Representación esquemática de las cinco proteínas de recubrimiento del fago M13 (pIII, pVI, pVIII, pVII y pIX), número de copias de estas proteínas que contiene cada virión y su respectivo peso molecular. ADNmc: ADN monocatenario.

Para realizar la presentación de proteínas sobre la cubierta del fago, se han probado fusiones covalentes con los cinco tipos de proteínas de recubrimiento mencionadas. Sin embargo, las más empleadas para la fusión de proteínas heterólogas son la proteína minoritaria pIII (para la expresión de bajo número de copias) y la pVIII (para la expresión de alto número de copias). La proteína pIII, implicada en el proceso de infección de la bacteria, posee unos 406 aminoácidos y está constituida por tres dominios diferentes: dos dominios N-terminal (N1 y N2) y un dominio C-terminal anclado en la cubierta del fago. En el momento de la infección, el dominio N2 interactúa con el F-pilus, lo que provoca su retracción y permite

al dominio N1 unirse a la proteína de membrana interna TolA del hospedador bacteriano (Hentrich *et al.*, 2018). En ese momento, el ADN vírico penetra en el interior de la bacteria donde se convierte en una doble hebra circular conocida como forma replicativa. En los primeros momentos tras la infección, las hebras de ADNmc hijas se convierten a la forma replicativa sirviendo así de molde para la síntesis de hebras hijas adicionales. Este proceso de replicación se detiene al alcanzarse las 100-200 copias de ADN, momento en el cual el genoma viral se ensambla con la cápside proteica en la membrana bacteriana y se produce la liberación de nuevas partículas víricas. Aunque se ha observado una disminución en la velocidad de reproducción de las células infectadas, al no tratarse de fagos líticos, el crecimiento bacteriano continúa, por lo que llegan a encontrarse fácilmente títulos de 10^{12} partículas víricas por mililitro de cultivo (Ledsgaard *et al.*, 2018; Pande *et al.*, 2010; Sergeeva *et al.*, 2006).

A pesar de que es factible clonar la secuencia que codifica para la proteína exógena directamente en el genoma del fago, lo que originaría fagos con las cinco copias de pIII expresando la proteína, esta estrategia está frecuentemente limitada en función del tamaño de la proteína heteróloga. Dado que los fragmentos de anticuerpos poseen un tamaño que puede interferir en la capacidad infectiva del fago o el correcto empaquetado de los viriones, la alternativa más comúnmente empleada consiste en emplear plásmidos de menor tamaño denominados fagémidos. Estos plásmidos contienen exclusivamente el gen que codifica para la fusión de la proteína de recubrimiento pIII y la proteína exógena, además de un gen de resistencia a antibióticos, el origen de replicación del fago y de la ADN polimerasa y la señal de empaquetamiento del fagémido (Miersch y Sidhu, 2012). Por lo tanto, para que se produzca el correcto empaquetamiento del virión, es necesario que la bacteria portadora del fagémido contenga la información genética del resto de proteínas de recubrimiento. Esta información la proporciona el denominado fago auxiliar o fago *helper*, que posee una señal de empaquetamiento defectiva, por lo que se empaquetará preferentemente la información genética del fagémido. Dado que el fago auxiliar posee un gen de resistencia a antibióticos diferente al fagémido, esto permitirá la selección exclusiva de aquellas bacterias que hayan adquirido la información genética proporcionada por ambos. El fago resultante contendrá tanto proteínas pIII que provengan del fago auxiliar (*wild type*) como del fagémido (fusionadas a la proteína recombinante), dando lugar a un virión híbrido que contiene el genoma del fagémido y que exhibe pocas copias de la proteína de fusión (**Figura 12**).

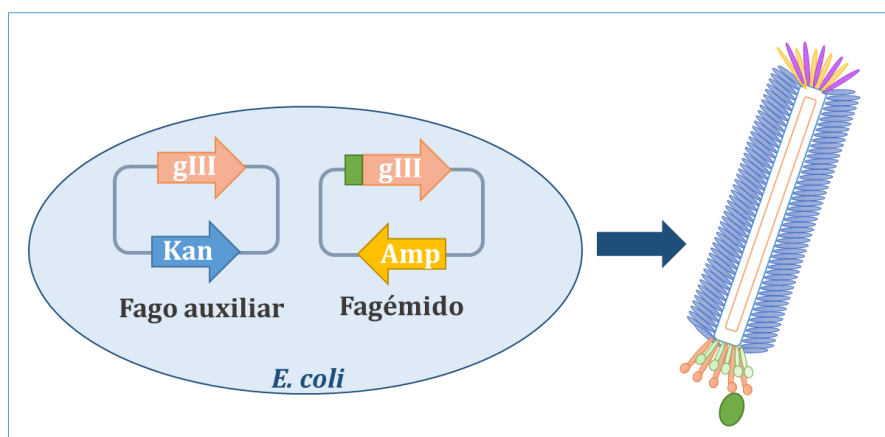


Figura 12. Representación esquemática de un sistema de phage display con dos fuentes de proteína pIII: fago auxiliar y fagémido. El virión resultante presenta un fenotipo heterogéneo combinación de ambos genotipos. *gIII*: gen que codifica para la proteína de recubrimiento pIII; *Kan* y *Amp*: genes de resistencia a la kanamicina y ampicilina, respectivamente.

II. 3. 2. Biopanning

La tecnología de *phage display* requiere, en primer lugar, de la existencia de una agrupación de fagos recombinantes o genoteca, que exprese en su superficie una gran diversidad de proteínas exógenas. De manera general, gracias a su accesibilidad al solvente, las proteínas recombinantes expresadas por los fagos se comportan de igual manera que lo harían si no estuvieran fusionadas al virión. Hoy en día, hay disponibles diferentes tipos de genotecas de fagos que expresan desde péptidos de secuencia aleatoria de una longitud definida, hasta fragmentos de anticuerpos de diversa naturaleza (Fab, scFv, dAb, etc.), tanto humanos como murinos (Hentrich *et al.*, 2018; Rami *et al.*, 2017).

El proceso de selección *in vitro* de fragmentos de anticuerpos llevado a cabo para obtener los ligandos que exhiben una mayor afinidad por la molécula diana, se conoce como *biopanning* (Figura 13). Esta estrategia comprende una serie de etapas que tratan de simular el proceso de hipermutación somática que tiene lugar *in vivo*, con el fin de seleccionar una subpoblación de fagos que presenten mayor afinidad por el ligando (Bradbury *et al.*, 2011). En primer lugar, la genoteca se incuba en presencia de la molécula diana, que se puede encontrar inmovilizada sobre una superficie soporte o en solución. Las partículas de fagos que no interaccionan específicamente con el ligando, son eliminadas mediante sucesivas etapas de lavado con el objetivo de recuperar exclusivamente los fagos unidos a la molécula diana (mediante el uso de enzimas proteolíticas o cambios bruscos en el pH o la fuerza iónica del medio). Esta subpoblación de fagos recuperada, representa una fracción de la genoteca inicial enriquecida

en viriones que poseen la capacidad de reconocer el antígeno de interés, y que puede a su vez amplificarse mediante la infección de nuevas células de *E. coli*. Una vez finalizado el proceso de selección a través de múltiples rondas sucesivas de *biopanning*, se lleva a cabo el aislamiento de clones individuales para comprobar la funcionalidad de los fagos seleccionados mediante técnicas inmunológicas (generalmente ELISA) e identificar la secuencia nucleotídica que codifica para los fragmentos de anticuerpos de interés (Adda *et al.*, 2002; Bakhshinejad *et al.*, 2016; Hoogenboom, 2005).

Esta técnica de obtención de anticuerpos monoclonales mediante el uso de cultivos de microorganismos, permite la producción ilimitada de sondas específicas con protocolos relativamente sencillos, por lo que el proceso es rápido, económico y automatizable. Además, dado que se dispone de la información genética del anticuerpo que reconoce a la molécula diana, se puede recurrir a técnicas de maduración *in vitro* de la afinidad para incrementar su sensibilidad, su transformación a diferentes formatos de anticuerpos o emplear diversos sistemas de expresión de proteínas recombinantes (bacterias, levaduras, hongos filamentosos, células, etc.) (de la Cruz, 2017; Rajput *et al.*, 2014; Wemmer, 2008).

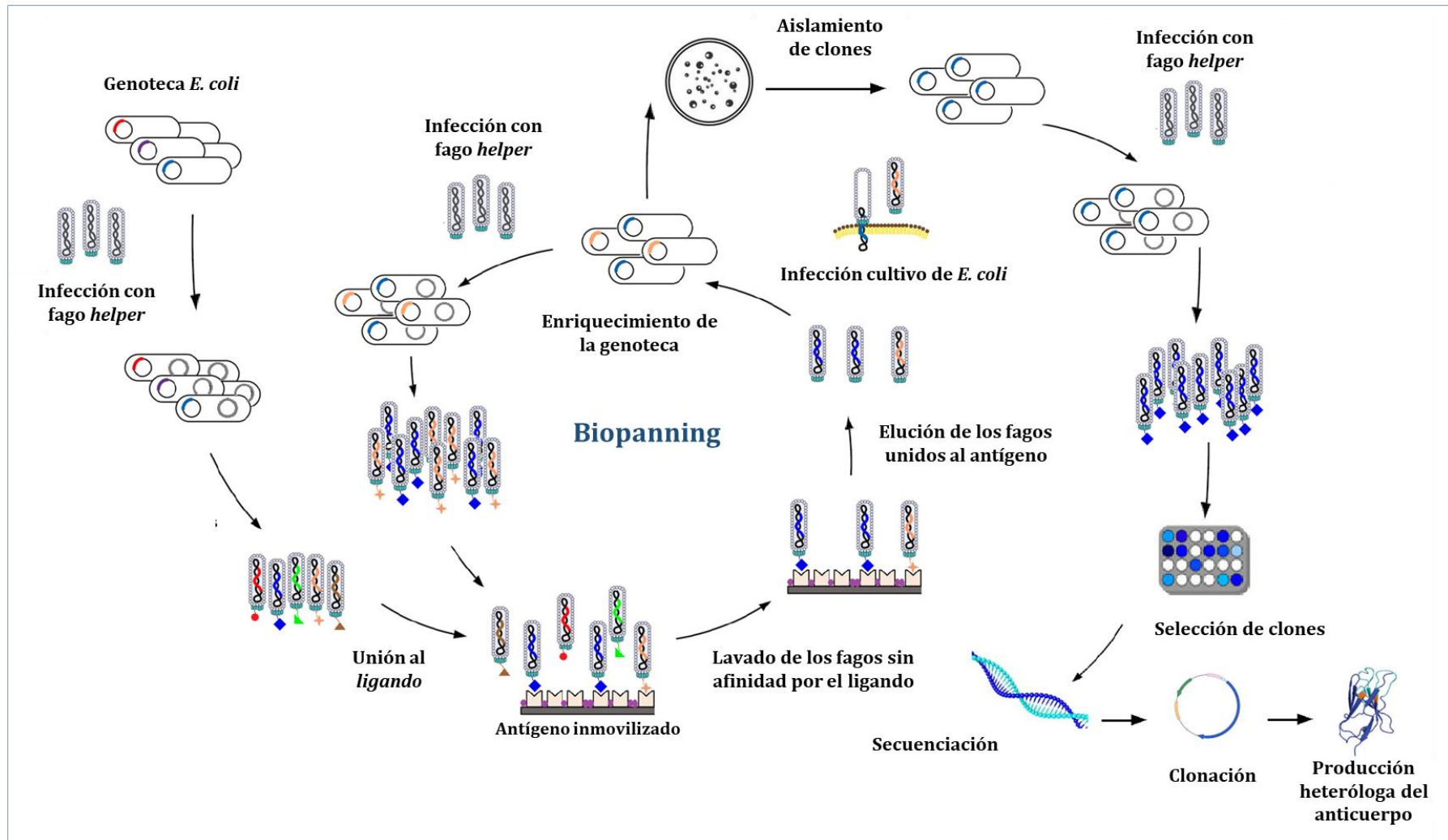


Figura 13. Representación esquemática del proceso de selección *in vitro* de anticuerpos recombinantes mediante el uso de fagémidos por phage display.



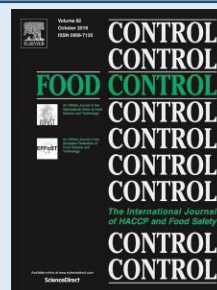
Capítulo III
RESULTS AND
DISCUSSION

III. 1. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for simultaneous detection of DNA from sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy allergenic ingredients in commercial food products

Published article

Food Control

Volume 71, pages 301-310 (2017)





Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for simultaneous detection of DNA from sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy allergenic ingredients in commercial food products



Inés María López-Calleja*, Aina García, Raquel Madrid, Teresa García, Rosario Martín, Isabel González

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 March 2016
Received in revised form
14 June 2016
Accepted 14 June 2016
Available online 20 June 2016

Keywords:

Multiplex ligation-dependent probe amplification system
Sunflower (*Helianthus annuus*)
Poppy (*Papaver rhoeas*)
Flaxseed (*Linum usitatissimum*)
Sesame (*Sesamum indicum*)
Soy (*Glycine max*)
Commercial food products
Food allergy

ABSTRACT

This work describes a multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) technique for the simultaneous detection of five food allergens: sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy. Species-specific MLPA half-probes were designed to detect the DNA from the targeted species. Ligated probes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and amplicons were detected using capillary electrophoresis. The specificity of the MLPA system was assessed against DNA from more than 50 plant and animal species. The limit of detection (LOD) of the assay was determined to be 10 mg kg⁻¹ in a model cookie experimentally spiked with different concentrations of the target species. The applicability of the MLPA was demonstrated through the analysis of 56 different commercial products (breads, pastries, cereals, chocolates, drinks, etc.), evidencing the presence of one or more undeclared allergenic ingredients in some of the tested samples. Real-time PCR assays were also performed to confirm and complement MLPA results. The MLPA technique has proved as a qualified screening tool for determining the presence of low amounts of sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy in processed foods.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Increased attention to food safety has stimulated the interest of consumers and authorities towards authenticity and traceability of food products and their ingredients. In recent years, food allergies have constituted a major health concern in industrialized countries, and it is estimated that may affect up to 3% of the adult population and 6–8% of the children in Europe (Rona et al., 2007). The prevalence of allergies to certain plant species such as sunflower (*Helianthus annuus*), poppy (*Papaver rhoeas*), flaxseed (*Linum usitatissimum*), sesame (*Sesamum indicum*) and soy (*Glycine max*) has shown a positive tendency, associated with an increasing consumption of the seeds and oil of these species in many foods (bakery products, fast foods, vegetarian and ethnic dishes, etc.). Sunflower seeds provide an excellent source of health benefiting nutrients, but anaphylactic reactions ranging from mild to severe

symptoms have been described after their ingestion by sensitized individuals (Axelsson, Ihre, & Zetterstrom, 1994; Hernández, Esteve, & Pla, 2005). Similarly, poppy and flaxseed are highly nutritious and relevant sources of minerals, vitamins and antioxidants. However, allergic type 1 sensitivity to these seeds has also been reported (Gall, 2000; Keskin & Sekerel, 2006; Leon, Rodriguez, & Cuevas, 2002; Panasoff, 2008). Sesame allergy is also a rising problem as new products and recipes are being introduced from around the world on a regular basis. In the UK, a questionnaire-based survey suggested that sesame was responsible for severe reactions (Derby, Gowland, & Hourihane, 2005). Although systemic reactions occur, a single case of death owing to an allergic reaction to sesame has been reported (Pumphrey & Gowland, 2007). A number of soybean products and ingredients is extensively used by a large population worldwide, not only due to its nutrition and health benefits, but also to the introduction of new food trends such as vegetarianism and organic consumption. Nevertheless, soy is considered a major food allergen and the number of patients with allergy to soybeans has greatly increased in the last years (Bauer,

Abbreviations: MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification; PAC, positive amplification control.

* Corresponding author.

E-mail address: ilopezcalleja@vet.ucm.es (I.M. López-Calleja).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.014>
0956-7135/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Kirschbaum, Panter, Kenk, & Bergemann, 2011; Tamarcaz, Hauser, & Eigenmann, 2001).

Since sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy are often contained in a wide variety of commercial food products, it is essential for those consumers which are at risk from suffering an allergic reaction to be able to obtain information about these allergens used as ingredients and/or as potential contaminants. In the absence of effective means for combating the allergic responses in sensitized consumers, avoiding the allergen containing food seems the only option. However, this may turn difficult in commercial processed products containing non declared allergens either added deliberately or unintentionally if foods are cross-contaminated during processing storage or shipping (Poms, Anklam, & Kuhn, 2004). In order to safeguard allergic consumers, the declaration of allergenic ingredients used in the preparation of a food results an imperative issue in many countries. According to European Union legislation, 14 allergenic foods and food ingredients, including sesame and soy (and other products thereof), have to be compulsorily given in the food ingredients label (Regulation 1169/2011/EC). Although sunflower, poppy and flaxseed have not been yet included in the list of allergenic ingredients that must be labeled, allergen policies are always in a dynamic state, meaning that new allergens appear and recognized allergens may gain or lose importance depending on consumer habits and new technologies. In this scenario, attention should be placed towards the future inclusion of these and other emerging plant species in the positive list of food ingredients or substances with known allergenic potential (EFSA, 2014). Considering these aspects, the development of suitable analytical methods able to monitor and identify the presence of allergens such as sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy in foods is of prime importance to prevent food-safety risks in sensitive individuals. The detection is, however, not an easy task since minute amounts of one or more allergens are usually present in complex and often highly processed food. Therefore, reliable methods with high specificity and sensitivity, and preferably with multiplexing capacity, are required (Baumgartner, Krska, & Welzig, 2007).

DNA-based methods have been increasingly used as valuable alternatives to immunoassays for allergen detection, taking advantage of the greater thermal stability of DNA molecules compared to proteins. In the last years, real-time PCR technology has proved to be a very effective tool for the detection of food allergens (De la Cruz et al., 2013; López-Calleja et al., 2013; Pafundo, Gulli, & Marmiroli, 2009). By combining several real time PCR amplifications in one assay (multiplex real-time PCR), simultaneous detection of two or more targets can be achieved (López-Calleja, De la Cruz, González, García, & Martín, 2015b, 2016, 2015a; Hashimoto, Makabe, Hasegawa, Sajiki, & Miyamoto, 2007; Hernández et al., 2005; Pafundo, Gulli, & Marmiroli, 2010). However, multiplex real time PCR may lead to different amplification efficiencies for each target and the assays are laborious to validate. Furthermore, the multiplex PCR format is not particularly flexible, as it is based on single primer sets which cannot be removed or added easily without influencing the whole assay. In this way, the assay known as Multiplex Ligation dependent Probe Amplification (MLPA), firstly described in 2002 by Schouten, McElgunn, Waaijer, Zwijnenburg, Diepvens and Pals to detect copy number variations in the human genome, is a high throughput and easy-to-learn technique for detection of multiple DNA sequences providing a flexible system that can be extended by adding further probes for a higher level of multiplexing. While MLPA technique has been mainly used for molecular diagnosis of human diseases (Gille et al., 2002), its application has been recently extended to the analysis of foods, including relative quantitation of GMO (Ehlert, Moreano, Busch, & Engel, 2008; Moreano, Ehlert, Busch, & Engel, 2006) or

simultaneous detection of DNA from allergenic food ingredients (Ehlert, Demmel, Hupfer, Busch, & Engel, 2009; Mustorp, Dromtorp, & Holck, 2011; Unterberger et al., 2014).

Considering all the previous aspects, this work describes the development and evaluation of a MLPA screening system for the simultaneous detection of DNA from sesame, flaxseed, poppy, sunflower and soy in a variety of marketed foods. These five plant species were chosen because they are known to elicit life threatening anaphylactic reactions and since an increasing number of retail foodstuffs may contain any of these seeds alone or in combination.

1. Materials and methods

1.1. Sample selection

Sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy, together with various commercial food products were purchased from different local stores and several delicatessen markets. Moreover, a wide range of plant (flesh and kernels) and animal (flesh) species was also included in the assays for specificity control purposes (Table 1).

1.2. Preparation of reference spiked cookies

In order to check the performance and sensitivity of the assay to detect the five targets simultaneously, and due to the lack of appropriate reference materials, model cookie samples were experimentally elaborated with different concentrations of the target species (0.1–10,000 mg kg⁻¹). First, a 100 g mixture containing 100,000 mg kg⁻¹ (10%) of each sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy (referred as “10% cookie sample”), was prepared as follows: 20 g of each target were ground with a Thermomixer (Vorwerk, Wuppertal, Germany). Additionally, a dough was prepared containing equal parts of wheat flour, sugar and butter. The whole target seed mixture (100 g) and 100 g of dough were mixed together using the Thermomix at maximum speed (9000 rpm) to favor a complete homogenization. This 10% cookie sample and sufficient amount of dough were then baked separately at 180 °C for 20 min and ground afterwards, before performing the rest of the model cookie spiking levels. For this purpose, 20 g of the corresponding cookie concentration was successively spiked in 180 g of dough and ground afterwards to ensure a thorough homogenization of each sample until the lowest spiking concentration of 0.1 mg kg⁻¹.

1.3. DNA extraction

Genomic DNA was digested and extracted using the Wizard DNA Clean-up System kit (Promega, Madison, WI, USA) as described by López-Calleja et al. (2007). The DNA was eluted in 50 µL of sterile deionized water. DNA concentration and quality was determined with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, DE) and stored at -20 °C. Three DNA replicates were extracted from each sample and a negative control sample, which strictly contained the reagents used for the DNA extraction procedure, was included in every DNA extraction.

1.4. Oligonucleotide half-probes and primers

Alignment and computer analysis of internal transcribed spacer (ITS) sequences available in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) allowed the design of 5 sets of MLPA probes specific for sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy, according to the general suggestions of MRC-Holland (Amsterdam, The Netherlands) ([70](http://www.</p></div><div data-bbox=)

Table 1
Specificity of the Allergen-MLPA system.

Species	Allergen-MLPA					
	Sesame	Soybean	Sunflower	Poppy	Flaxseed	PAC (18S)
Sesame (<i>Sesamum indicum</i>)	+	–	–	–	–	+
Soybean (<i>Glycine max</i>)	–	+	–	–	–	+
Sunflower (<i>Helianthus annuus</i>)	–	–	+	–	–	+
Poppy (<i>Papaver rhoeas</i>)	–	–	–	+	–	+
Flaxseed (<i>Linum usitatissimum</i>)	–	–	–	–	+	+
Walnut (<i>Juglans regia</i>)	–	–	–	–	–	+
Macadamia (<i>Macadamia intergrifolia</i>)	–	–	–	–	–	+
Cashew nut (<i>Anacardium occidentale</i>)	–	–	–	–	–	+
Almond (<i>Prunus dulcis</i>)	–	–	–	–	–	+
Hazelnut (<i>Corylus avellana</i>)	–	–	–	–	–	+
Peanut (<i>Arachis hypogaea</i>)	–	–	–	–	–	+
Pistachio (<i>Pistacia vera</i>)	–	–	–	–	–	+
Brazil nut (<i>Bertholletia excelsa</i>)	–	–	–	–	–	+
Pecan (<i>Carya illinoensis</i>)	–	–	–	–	–	+
Green bean (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	–	–	–	–	–	+
Green pea (<i>Pisum sativum</i>)	–	–	–	–	–	+
Chickpea (<i>Cicer arietinum</i>)	–	–	–	–	–	+
Lentil (<i>Lens culinaris</i>)	–	–	–	–	–	+
Tiger Nut (<i>Cyperus esculentum</i>)	–	–	–	–	–	+
Lupine (<i>Lupinus albus</i>)	–	–	–	–	–	+
Acorn (<i>Quercus ilex</i>)	–	–	–	–	–	+
Chestnut (<i>Aesculus hippocastanum</i>)	–	–	–	–	–	+
Pine nut (<i>Pinus pinea</i>)	–	–	–	–	–	+
Barley (<i>Hordeum vulgare</i>)	–	–	–	–	–	+
Oat (<i>Avena sativa</i>)	–	–	–	–	–	+
Rye (<i>Secale cereal</i>)	–	–	–	–	–	+
Rice (<i>Oryza sativa</i>)	–	–	–	–	–	+
Maize (<i>Zea mays</i>)	–	–	–	–	–	+
Wheat (<i>Triticum aestivum</i>)	–	–	–	–	–	+
Cocoa (<i>Theobroma cacao</i>)	–	–	–	–	–	+
Grape (<i>Vitis vinifera</i>)	–	–	–	–	–	+
Pear (<i>Pyrus rosaceae</i>)	–	–	–	–	–	+
Apple (<i>Malus domestica</i>)	–	–	–	–	–	+
Apricot (<i>Prunus armeniaca</i>)	–	–	–	–	–	+
Cherry (<i>Prunus avium</i>)	–	–	–	–	–	+
Sour cherry (<i>Prunus cerasus</i>)	–	–	–	–	–	+
Peach (<i>Prunus persica</i>)	–	–	–	–	–	+
Plum (<i>Prunus domestica</i>)	–	–	–	–	–	+
Banana (<i>Musa cavendishii</i>)	–	–	–	–	–	+
Kiwifruit (<i>Actinidia deliciosa</i>)	–	–	–	–	–	+
Watermelon (<i>Citrullus lanatus</i>)	–	–	–	–	–	+
Orange (<i>Citrus Sinensis</i>)	–	–	–	–	–	+
Potato (<i>Solanum tuberosum</i>)	–	–	–	–	–	+
Garlic (<i>Allium sativum</i>)	–	–	–	–	–	+
Onion (<i>Allium cepa</i>)	–	–	–	–	–	+
Eggplant (<i>Solanum melongena</i>)	–	–	–	–	–	+
Zucchini (<i>Cucurbita pepo</i>)	–	–	–	–	–	+
Tomatoes (<i>Solanum lycopersicum</i>)	–	–	–	–	–	+
Asparagus (<i>Asparagus officinalis</i>)	–	–	–	–	–	+
Carrot (<i>Daucus sativus</i>)	–	–	–	–	–	+
Olive (<i>Olea europaea</i>)	–	–	–	–	–	+
Cattle (<i>Bos taurus</i>)	–	–	–	–	–	+
Sheep (<i>Ovis aries</i>)	–	–	–	–	–	+
Goat (<i>Capra hircus</i>)	–	–	–	–	–	+
Swine (<i>Sus scrofa domestica</i>)	–	–	–	–	–	+

PAC: Positive amplification control for eukaryotics on the 18S rRNA gene.

mrc-holland.com/WebForms/WebFormMain.aspx). To avoid cross homologies, the specificities of the probe sequences were evaluated by BLAST search within NCBI GenBank by Beacon Designer software. An additional probe set was designed based on conserved nuclear 18S rRNA gene sequences from various plant and animal species and was used as a positive amplification control (PAC) of the MLPA reactions. The synthesis of the probes was performed by IDT (Integrated DNA Technologies, Iowa, USA) (<https://eu.idtdna.com/site>). Primers for the PCR were included in the MLPA reagents kit (MRC-Holland). Table 2 shows the sequences of the 6 MLPA probe sets and primers, together with the GenBank accession numbers of the selected targets and amplicons generated in the MLPA

reactions.

1.5. Multiplex ligation-dependent probe amplification

MLPA reactions were performed in a Progene Thermal Cycler (Techne Ltd., Cambridge, UK), using the SALSA MLPA EK1 reagent kit (MRC-Holland) according to the manufacturer's instructions. All components, except DNA mix, probe mix, water and TE buffer are included in the SALSA MLPA EK1 reagent kit.

Routinely, 5 µL of sample DNA (20–100 ng) was denatured at 95 °C for 5 min. A non-template control was used along the experiment to discard possible contaminations. After the samples

Table 2
Half-probes and primers used in the MLPA method.

Target/GenBank accession nr	Half-probe name	LPO (5' → 3')	RPO (5' → 3')	Target sequences	Amplicon size (bp) calculated/Observed
Sesame/JN115050	SesLPO/SesRPO	GGGTCCCTAAGGGTTGGATCAGACCAG TGGTGGTTGAACGCT	CAACTCGCGTCTGTCTGCTCTAGATGGATCTCTCTGGCAC	ITS	85 86
Flaxseed/FJ1169526	FlaxLPO/FlaxRPO	GGGTCCCTAAGGGTTGGAGGGGCTTTGG CTTAACTGTCAAGTCTC	TGCCAACAACCTAACCAACCCCGCATCTAGATGG ATCTCTGGGCAC	ITS	94 93
Poppy/X83836	PopLPO/PopRPO	GGGTCCCTAAGGGTTGGACACTCTGGCACCCC AGGTCAAGCGGACT	AGATTGGATCTCTGGGCAC GTGGCTCTTTGTAACCTTAAACCACTCTCGGTCTA	ITS	101 99
Sunflower/KF767534	SunLPO/SunRPO	GGGTCCCTAAGGGTTGGATCTTGGCCCCGG TTCGGGTGTGGCCGCTGTTTC	GATGGATCTCTGGGCAC ATTCATCTACCGTCGGAGGGGGATGACACGGCTC	ITS	108 107
Soy/FJ609734	SoyLPO/SoyRPO	GGGTCCCTAAGGGTTGGATTTGTCATGCTCACAATCAGA TTGACCCCGAAGCTGTTT	TAGATTGGATCTCTGGGCAC TAAGTTGTGGCTTAAACAGCTGATTGGGATGGTC	ITS	120 119
18S	18SLPO/18SRPO	GGGTCCCTAAGGGTTGGATCCATAGCGTATATT GCCGGGTAATTCACGCTCCATAGCGTATATT	TAGATTGGATCTCTGGGCAC	18S rRNA	128 127
Primer R - unlabeled	5' - GTCCACGACATCCATCTAGA - 3'				
Primer F - labeled	FAM - 5' - GCGTTCCTTAAGGCTTGG - 3'				

Common half-probe sequences (primer binding sites) are marked in bold capitals.

were cooled to 25 °C, 1.5 µL SALSA MLPA buffer and 1.5 µL probe mix were added and incubated at 60 °C for 16 h, to achieve hybridization. 5 fmol of each half-probe was used.

The ligation was performed by adding 3 µL ligase buffer A, 3 µL ligase buffer B, 25 H₂O and 1 µL Ligase-65 before incubating the mixture for 15 min at 54 °C and then for 5 min at 98 °C to inactivate the enzyme. The ligated probes are templates for the universal SALSA PCR primers mix. For subsequent PCR amplifications, 10 µL of polymerase mix (7.5 µL H₂O, 2 µL PCR Primer Mix and 0.5 µL SALSA polymerase) were added. The PCR amplification was performed under the following conditions: 35 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s and extension at 72 °C for 1 min, followed by 1 cycle of extension at 72 °C for 20 min. Finally, samples were cooled down to 4 °C and used for fragment separation by capillary electrophoresis. To assess MLPA reproducibility, two replicates of each DNA extract were analyzed in each experiment.

1.6. Capillary electrophoresis

For each sample, 1 µL of the PCR reaction, 9 µL of HiDi formamide and 0.5 µL of Genescan 500 LIZ size standard were mixed. The samples were denatured for 5 min at 95 °C and then cooled on ice. The plate was run on a 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems) and data were collected during fragment separation. The injection time was 5–22 s, and the electrophoretic conditions were as follows: run time 1800 s at 15,000 V; run current, 5 µA; and 60 °C run temperature. GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems) was used to extract data on the height, area, and size of fluorescent PCR fragments in the obtained electropherograms.

1.7. Real-time PCR confirmatory assays

Taqman real-time PCR assays previously developed by our group (Table 3) were performed to check the MLPA results. Duplex PCR reactions for sesame/flaxseed and sunflower/poppy, and simplex PCR reactions for soy were run under generic cycling conditions using a LightCycler 2.0 Instrument (Roche Applied Science, Penzberg, Germany).

2. Results and discussion

2.1. Choice of target sequences and design of the MLPA-based detection system

Sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy MLPA probes were designed upon published sequence data from the nuclear *ITS1* region of ribosomal DNA (rDNA). Plants possess three nuclear ribosomal genes (18S-5.8S-26S) which are repeated several hundred to a few thousand times in the genome, and are typically arranged within tandem arrays separated by different *internal transcribed spacer (ITS)* regions. It is known that DNA sequences of the rRNA coding genes are well-conserved between plants. However, the *ITS* sequences are species-specific, providing this region with a valuable potential for identification studies of closely related species (Hirao, Watanabe, Temmei, Hiramoto, & Kato, 2009; Pereira, Carneiro, & Amorim, 2008). Moreover, the use of a multi-copy gene favors the recovery of at least a few DNA copies when the targets are subjected to intense thermal treatments, such as those applied to commercially processed foods (López-Calleja, De la Cruz, González, García, & Martin, 2016). Considering these premises, specific ligation probes were designed by choosing specific *ITS1* regions on the vicinity or overlapping with previously described PCR primer or probe binding sites showing species-specific differences (López-Calleja

Table 3
Description of the primers and probes used in the Taqman real time PCR confirmatory assay.

Primers	Length (bp)	Sequence (5' → 3')	Description	Target gene/References	Fragment length (bp)
SunflowerITSdir	18	TGGCTTCTTTGTAACCTT	Sunflower-specific forward primer	ITS ^a	66
SunflowerITSinv	15	TTCTTCATCGATGCG	Sunflower-specific reverse primer		
PoppyITSdir	18	GGTCGGTCTAAACACAGG	Poppy-specific forward primer	ITS ^a	72
PoppyITSinv	20	TGAAGAGAGACAACGAGTGT	Poppy-specific reverse primer		
SesameITSdir	18	CCAGTGGTGGTTGAACCGC	Sesame-specific forward primer	ITS ^a	84
SesameITSinv	19	CCTTTGGGTCCAACGTGAT	Sesame-specific reverse primer		
FlaxseedITSdir	18	AACCTGCTCGGCAGAATG	Flaxseed-specific forward primer	ITS ^b	72
FlaxseedITSinv	20	CCTAGAAGCACACCCAGCTT	Flaxseed-specific reverse primer		
SoyITSdir	18	TCCC GGGGAGTCATCAC	Soy-specific forward primer	ITS ^c	89
SoyITSinv	22	CGCTACGTTCTTCATCGATGCG	Soy-specific reverse primer		
18Sdir	16	TGGTGCCAGACGCCGC	Positive control forward primer	18S rRNA ^{a, b}	77
18Sinv	25	TCCAACACTACGAGCTTTTAACTGCA	Positive control reverse primer		
Probes					
SunflowerITSP	24	FAM-AACGACTCTCGGCAACGGATATCT-BBQ	Sunflower probe	ITS ^a	
PoppyITSP	19	HEX-GTCACGATTCTGGTGGTTC-BBQ	Poppy probe	ITS ^a	
SesameITSP	18	FAM-TCAACTCGCGTGTGTCG-BBQ	Sesame probe	ITS ^b	
FlaxseedITSP	19	HEX-AACTGTCGTTAATCGCGG-BBQ	Flaxseed probe	ITS ^b	
SoyITSP	22	FAM-TGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCT-BBQ	Soy probe	ITS ^c	
18SP	22	FAM-CGCTATTGGAGCTGGAATTACC-BBQ	Universal probe	18S rRNA ^{a, b}	

References

^a López-Calleja et al., 2016.

^b López-Calleja et al., 2015b.

^c Unpublished results.

et al., 2015b, 2016). A total of five MLPA probe sets specific for each sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy targets were designed according to the general suggestions of MRC-Holland (Schouten et al., 2002). Since PCR inhibition can result in negative test results, the inclusion of an additional set of conserved 18S rRNA probes (positive amplification) is useful to evidence the presence of amplifiable DNA in the samples.

The detection of each target sequence by MLPA requires the design of two adjacent half-probes, a left probe oligonucleotide (LPO) and a right probe oligonucleotide (RPO), containing their respective target-specific hybridization sites together with identical universal primer binding sites (PBS) at their 5'- or 3'- ends. The allergen-MLPA probes are chosen with a suitable number of nucleotides to give amplicons that would be easily separated and differentiated from each other. One of the primers is labeled with a fluorescence dye which is included in the amplification products during the PCR. When the adjacent half-probes bind to the target and are ligated, ligation products of specific size for specific target DNA are generated and can be detected by means of capillary gel electrophoresis. Details of the selected target sequences and MLPA primers and probes are listed in Table 2.

2.2. MLPA functionality and specificity

To check for possible cross homologies, the specificities of sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy MLPA probe sequences were first evaluated *in silico* by BLAST search within NCBI GenBank by Beacon Designer software. Preliminary experiments using single templates from known allergens in combination with single probe sets gave single peaks with the expected sizes and showed that all probe pairs amplified their specific targets (results not shown). The functional performance of the MLPA system was then examined by testing DNA extracts (adjusted to 20 ng/μL) of the five targets simultaneously with the six probe sets. Species specific peaks close to their calculated sizes (sunflower 108 nt/poppy 101 nt/flaxseed 94 nt/sesame 85 nt/soybean 120 nt/PAC 128 nt) were reproducibly generated, and showed that the five selected allergens could be detected concomitantly when present in a sample (Fig. 1). Differences between expected and observed amplicon size (peaks) are commonly reported (Ehlert et al., 2008) and pose no problem as the

fragment lengths determined for each target are reproducible.

The varied number of plant and animal components that can be present in commercial food products indicates the need to test the cross reactivity of the MLPA system against a wide range of species. Specificity of each MLPA probe set was therefore assessed by analysis of DNA extracted from 46 plant species (target species not included) and 4 animal species which constitute possible food ingredients. No unspecific peaks were obtained with any of the probes, meeting the desired MLPA specificity requirements. The positive amplification control (PAC) evidenced the presence of amplifiable DNA in all the analyzed samples (Table 1).

2.3. MLPA sensitivity

Since suitable reference material containing representatives of the target allergens was not available, the sensitivity of the MLPA method was assessed using a model cookie that was self elaborated by spiking a cookie matrix (dough) with different concentrations of the target species (0.1–10,000 mg kg⁻¹). The spiked cookie was used as reference of the hypothetical presence of any of the target allergens at different concentrations in a food, either due to deliberate incorporation or to unintended contamination. Starting materials and ingredients of the cookie dough were preliminary checked for the absence of any target species. Three independent DNA extractions of each spiking level were analyzed in two replicates per extraction using the MLPA. The limit of detection (LOD), expressed as the lowest spiking concentration for which all the results were consistently positive, was determined to be 10 mg kg⁻¹ (Fig. 2A).

Although the peak intensities varied somewhat depending on the allergen, especially with soy which showed the lowest signal, the overall assay sensitivity remained essentially unchanged when varying the conditions of the MLPA reactions (e.g. probe concentrations). Despite the MLPA technique developed in this work does not allow a quantitative estimate of the allergen concentration in a sample, the results obtained suggest that the assay has the potential to screen for the presence of low amounts of sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy in a complex matrix that resembles a commercial food product.

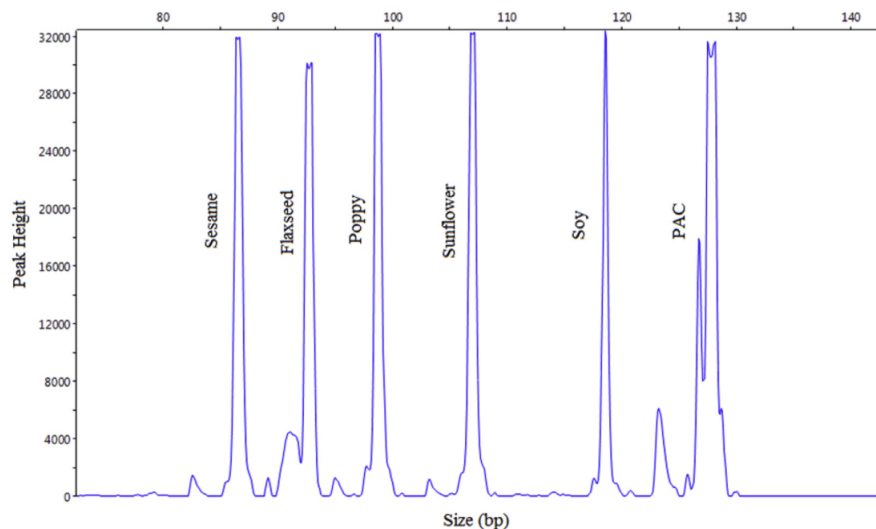


Fig. 1. Capillary electrophoresis of the MLPA system using a mixture of sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy DNAs (20 ng/ul) as template. All five targets plus the positive amplification control (PAC) are detected in one experiment.

2.4. Analysis of commercial food products

To evaluate the applicability of the system for routine testing, the MLPA technique was applied to the analysis of 56 commercial food products (breads, pastries, cereals, chocolates, drinks, etc.) of different brands, ascribed to three groups of label declarations: A) foods that declare to contain sunflower, poppy, flaxseed, sesame and/or soy; B) foods that declare “may contain” traces of sunflower, poppy, flaxseed, sesame and/or soy. These products may or may not state the presence of any of the targets in the labeling; C) foods that do not declare sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy, nor their traces in the labeling. Products are arranged by groups and label statements and results are shown in Table 4. As can be seen, the MLPA technique successfully detected the presence of the targeted species (one or more) in all the products that declared their presence in the labels. The electropherograms of two representatives of these samples are shown in Fig. 2 (products 4 and 9), to illustrate the ability of the assay to detect multiple targets in a complex commercial food matrix. However, 20 of the 56 (36%) food products analyzed (products 7, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 23, 26, 29, 30, 32, 34, 36, 39, 40, 42, 43, 45 and 46) showed distinct discordances between the MLPA results and the labeling statements respecting the declared targets, revealing the presence of undeclared sunflower, poppy, flaxseed, sesame, and/or soy in such samples (Table 4). The presence of non declared allergenic ingredients in these commercial foods may be due to cross-contamination, since they were produced by companies that process different seeds and products in their facilities. This may happen when a production line cannot be completely cleaned after producing an allergen containing product, or due to cross-contact at some point of the raw material or ingredient supply chains (Mustorp et al., 2011; Spanjersberg, Knulst, Kruizinga, Van Duijn, & Houben, 2012). Moreover, the omission of an allergen on a food label may result from their use as additives in packaged food, the use of recycled materials, or substitution of a more valued ingredient by other of lower price when it is not possible to recognize the characteristics of the ingredients in processed products. Whichever the case, the degree of undeclared contamination found in the analyzed products may

compromise the health of allergic individuals and, therefore, detection methods should provide both, a selective detection and a sensitive threshold level of the allergen/s in question. In this way, the MLPA technique developed herein proved to be a useful screening tool for the specific and simultaneous detection of low amounts (LOD of 10 mg kg^{-1}) of sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy in a variety of commercial food products.

Because even small amounts of food allergens may cause a serious disease in sensitized individuals, the precautionary warning “may contain” is adopted as a voluntary health-protecting labeling tool among factories with cross-contamination opportunities in their manufacturing processes (Spanjersberg et al., 2012; Van Hengel, 2007). However, in line with other studies (Pegels, González, García, & Martín, 2015), results obtained in the present work suggest that the use of precautionary statements does not always comply with the true allergic ingredients of a product, leading to unnecessary restriction of consumer’s choice (products 8, 9, 13, 14, 16, 20, 22, 23, 36 and 44).

To confirm and complement the results obtained by the MLPA technique, the commercial food products shown in Table 4 were further analyzed by two duplex (sesame/soy and sunflower/flaxseed) and a simplex (soy) Taqman real time PCR previously designed by us. The majority of the MLPA and real time PCR results were coincident, indicating an adequate correlation between both techniques. However, in some commercial food products, certain undeclared species did not yield a positive MPLA signal, but were positively detected by the real-time PCR technique (products 5, 6, 11, 17, 28 and 34). Discrepancies in these results may be justified by the lower sensitivity achieved in the MLPA technique developed (10 mg kg^{-1}), compared to that of 0.1 mg kg^{-1} reported for the real-time PCR assays (Table 3), suggesting the presence of minute amounts of the undeclared PCR-positive ingredients in these samples.

The detection of allergens in food can be challenging, as often various targets are present in trace amounts and are masked by the food matrix. Moreover, as the number of food components with allergenic potential increases, multiplex DNA-based methods are preferable for enforcing the legislation in relation to labeling.

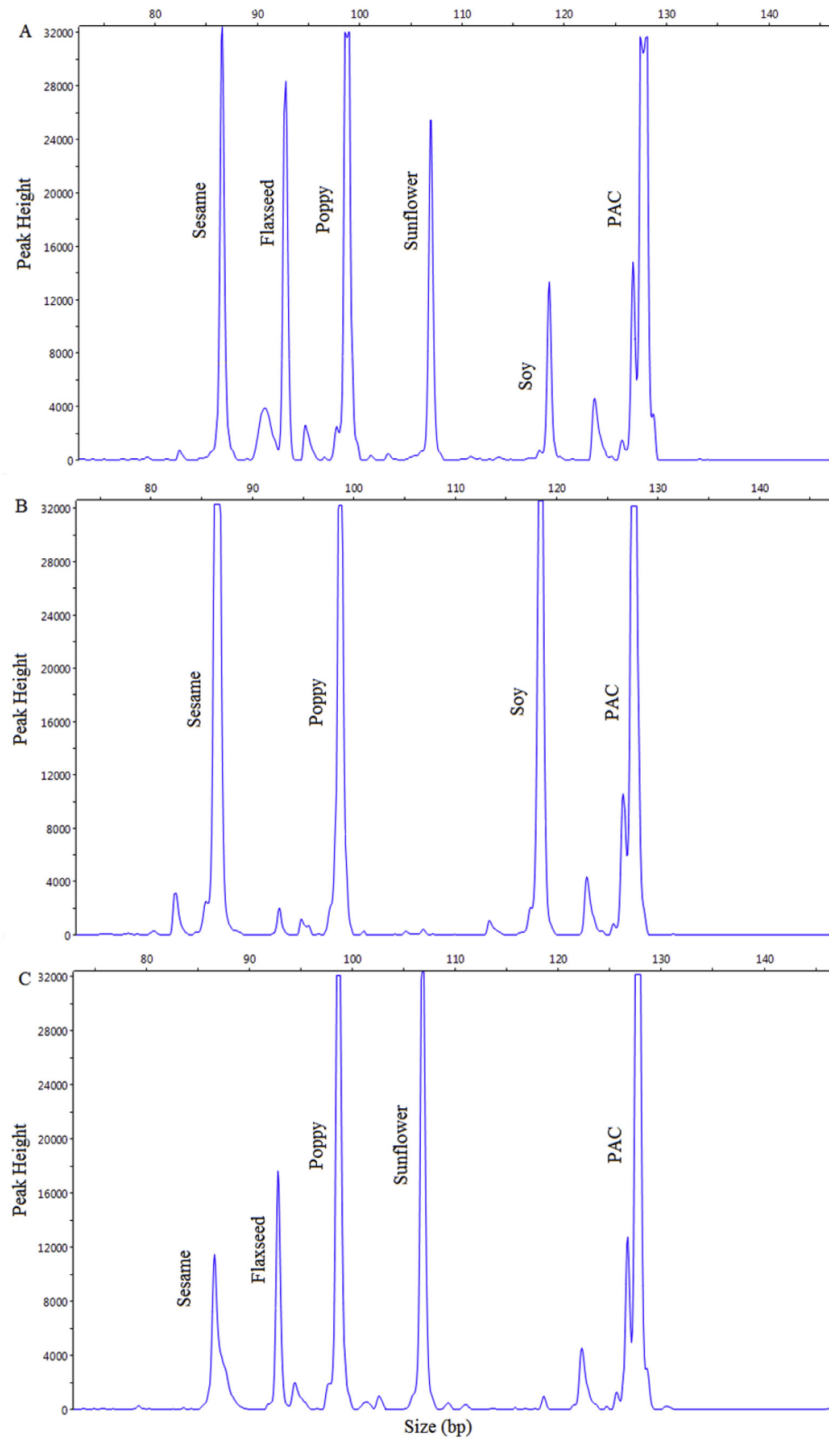


Fig. 2. (A): Capillary electrophoresis after allergen MLPA of a model cookie spiked with sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy at 10 mg kg^{-1} concentration. (B, C): MLPA analysis of commercial food products 4, 8 respectively (Table 3).

III. RESULTS AND DISCUSSION

308

I.M. López-Calleja et al. / Food Control 71 (2017) 301–310

Table 4
Results after MLPA and real time PCR analysis of 56 commercial food products.

No/product	Target ingredients declared on the label	Precautionary labelling	Detection (MLPA)	Detection (real time PCR)
Bread				
1 Bread multicereal	Sunflower, flaxseed, sesame, soy	–	Sunflower, flaxseed, sesame, soy	Sunflower, flaxseed, sesame, soy
2 Bread roll	Sunflower, flaxseed, sesame	–	Sunflower, flaxseed, sesame	Sunflower, flaxseed, sesame
3 German bread	Sunflower, flaxseed, soy	–	Sunflower, flaxseed, soy	Sunflower flaxseed, soy
4 Rye sticks	Poppy, sesame, soy	–	Poppy, sesame, soy	Poppy, sesame, soy
5 NY style bagel	Sunflower, poppy	–	Sunflower, poppy	Sunflower, poppy, sesame, soy
6 Poppy bagel	Poppy	–	Poppy	Poppy, sesame, soy
7 Bread sticks	Sunflower	–	Sunflower, flaxseed, sesame, soy	Sunflower, flaxseed, sesame, soy
8 Swedish flat bread	Sunflower	May contain traces of sesame and soy	Sunflower	Sunflower
9 Bread 5 seeds and cereal	Sunflower, poppy, flaxseed, sesame	May contain traces of soy	Sunflower, poppy, flaxseed, sesame	Sunflower, poppy, flaxseed, sesame
10 Muesli bread	Soy	May contain traces of sesame	Soy, sunflower, sesame	Soy, sunflower, sesame
11 Pretzels	–	–	Sunflower	Sunflower, soy
Cereals				
12 Cereals with flaxseed	Flaxseed	–	Flaxseed, sunflower, soy	Flaxseed, sunflower, soy
13 Granola Apple and cinnamon	Sunflower, flaxseed	May contain traces of sesame	Sunflower, flaxseed	Sunflower, flaxseed
14 Treacle and pecan	Sunflower	May contain traces of sesame	Sunflower	Sunflower
15 Cruesli	Sunflower	May contain traces of nuts	Sunflower, sesame, soy	Sunflower, sesame, soy
16 Muesli 4 nuts	–	May contain traces of sesame and soy	Soy	Soy
17 Muesli chocolate amaranth	–	–	Sesame	Sesame, soy
Nut bars				
18 Muesli nut bar	Sesame, soy	–	Sesame soy	Sesame, soy
19 Soy nut bar	Soy	–	Soy	Soy
20 Himalayan goji	Sunflower	May contain traces of sesame and soy	Sunflower	Sunflower
21 Chocolate nut bar	Sunflower, soy	May contain traces of nuts and seeds	Sunflower, soy	Sunflower, soy
22 Brazilian nut	Sunflower	May contain traces of sesame and soy	Sunflower	Sunflower
23 Almond nut bar	Sunflower sesame	May contain traces of tree nuts and soy	Sunflower, sesame, flaxseed	Sunflower, sesame, flaxseed
24 Organic food bar Acai	–	–	–	–
Biscuits and cakes				
25 Chocolate and oat biscuit	Soy	–	Soy	Soy
26 Chocolate noisettes biscuit	Sunflower	–	Sunflower, soy	Sunflower, soy
27 Whole wheat biscuit	–	May contain traces of sesame	Sesame	Sesame
28 Spelt and ginger	–	May contain traces of sesame	Sesame	Sunflower, sesame
29 Rice cake	–	–	Sesame	Sesame
30 Chocolate macadamia	–	–	Sesame	Sesame
Chocolates and nougat				
31 Gourmet chocolate	Sunflower, soy	–	Sunflower, soy	Sunflower, soy
32 Peanut butter chocolate	Soy	–	Soy, sesame	Soy, sesame
33 Dark chocolate	Sunflower	May contain traces of other nuts	Sunflower	Sunflower
34 Almond bonbon	Soy	May contain traces of peanuts and nuts/cereals	Soy, sunflower, poppy	Soy, sunflower, poppy, sesame
35 70% cocoa	–	May contain traces of sesame	–	–
36 Peanut bonbon	–	May contain traces of other nuts	Sunflower	Sunflower
37 Walnut and cream nougat	–	–	–	–
38 Diet chocolate	–	–	–	–
39 Orange with dark chocolate	–	–	Sunflower, sesame	Sunflower, sesame
40 Nut chocolate	–	–	Sunflower, sesame	Sunflower, sesame
Beverages and yogurt				
41 Tiger milk	Sunflower	–	Sunflower	Sunflower
42 Vanilla soy	soy	–	soy, sesame	soy, sesame
43 Kamut and goyi milk	Sunflower	–	Sunflower, sesame, soy	Sunflower, sesame, soy
44 Yogurt with walnuts	–	–	–	–

Table 4 (continued)

No/product	Target ingredients declared on the label	Precautionary labelling	Detection (MLPA)	Detection (real time PCR)
45 Macadamia milk	–	May contain traces of soy	Sunflower, soy	Sunflower, soy
46 Muesli yogurt	–	May contain traces of soy May contain traces of sesame	Sesame, soy	Sesame, soy
47 Rice milk	–	–	–	–
48 Spread creams and sauce	–	–	–	–
49 Chocolate cream	Soy	–	Soy	Soy
50 Cashew cream	–	May contain traces of sesame	Sesame	Sesame
51 Peanut cream	–	–	–	–
52 Pecan butter syrup	–	–	–	–
53 Tomato sauce	–	–	–	–
Ice creams	–	–	–	–
54 Praline ice cream	–	–	–	–
55 Chocolate fondant	–	–	–	–
56 Chocolate chip	–	–	–	–
57 Caramel and nuts	–	–	–	–

Recently, MLPA has proved to be a reliable approach for screening multiple food allergens, although these works are still scarce. Among them, Ehlert et al. (2009), and Mustorp et al. (2011) developed multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assays for the simultaneous detection of different allergenic plant ingredients in foods. The reported LOD varied from 5 to 1000 mg kg⁻¹ (Ehlert et al., 2009) and from 5 to 400 gene copies (Mustorp et al., 2011), depending on the targeted allergen. Also, Unterberger et al. (2014) described a LPA-based multiplex screening system for the detection of DNA from fish, shellfish and cephalopod species in food with LOD between 20 and 100 mg kg⁻¹.

Compared to other multiplex probe-based approaches such as Taqman real-time PCR, the MLPA technique has a number of advantages: a) the probes are less expensive as merely the 5'-end of the right probe needs a modification (phosphate); b) only minute amounts of probes are used when setting up a probe mix and therefore can be used for large sample number screenings; c) due to small interaction between the ligation MLPA probes, the method shows high reproducibility; d) possibilities for higher levels of multiplexing exist since it is a flexible system that can be complemented with further hybridization probes to broaden the range of targets or, by the contrary, by removing probe pairs when needed.

3. Conclusions

The MLPA system developed in this work has shown to be a specific and sensitive method suitable for the simultaneous detection of low levels of sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy in processed food products. The assay proved to be reliable, fast and easy to perform, and could be used as a complementary screening tool in routine programs to monitor the compliance with labelling rules regarding food allergens.

Acknowledgements

We thank Maribel García Saéz from the Centro de Genómica y de la Facultad de Biológicas (UCM) for her helpful comments and suggestions. This work was supported by the Programa de Vigilancia Sanitaria S2013/ABI-2747 of the Comunidad de Madrid (Spain) and by a project (AGL2013-48018-R) from the Ministerio de Economía y Competitividad (Spain).

References

- Axelsson, I. G., Ihre, E., & Zetterstrom, O. (1994). Anaphylactic reactions to sunflower seed. *Allergy*, 49, 517–520.
- Bauer, T., Kirschbaum, K., Panter, S., Kenk, M., & Bergemann, J. (2011). Sensitive detection of soy (*Glycine max*) by real-time polymerase chain reaction targeting the mitochondrial atpA gene. *Journal of AOAC International*, 94, 1863–1873.
- Baumgartner, S., Krska, R., & Welzig, E. (2007). Detecting allergens in foods. *Managing Allergens in Food*, 228–250.
- De la Cruz, S., Lopez-Calleja, I., Alcocer, M., Gonzalez, I., Martin, R., & Garcia, T. (2013). Taqman real-time PCR assay for detection of traces of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) in food products. *Food Control*, 33, 105–113.
- Derby, C. J., Gowland, M. H., & Hourihane, J. O. (2005). Sesame allergy in Britain: A questionnaire survey of members of the anaphylaxis campaign. *Pediatric Allergy and Immunology*, 16, 171–175.
- EFSA. (2014). Scientific opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labeling purposes. *EFSA Journal*, 12, 3894.
- Ehlert, A., Demmel, A., Hupfer, C., Busch, U., & Engel, K. H. (2009). Simultaneous detection of DNA from 10 food allergens by ligation-dependent probe amplification. *Food Additives and Contaminants A*, 26, 409–418.
- Ehlert, A., Moreano, F., Busch, U., & Engel, K.-H. (2008). Development of a modular system for detection of genetically modified organisms in food based on ligation-dependent probe amplification. *European Food Research and Technology*, 227, 805–812.
- Gall, H. (2000). Food-dependent exercise-induced anaphylaxis to flaxseed. *Allergy International*, 49, 219–221.
- Gille, J. J. P., Hogervorst, F. B. L., Pals, G., Wijnen, J. T., van Schooten, R. J., Dommering, C. J., et al. (2002). Genomic deletions of MSH2 and MLH1 in colorectal cancer families detected by a novel mutation detection approach. *British Journal of Cancer*, 87, 892–897.
- Hashimoto, H., Makabe, Y., Hasegawa, Y., Sajiki, J., & Miyamoto, F. (2007). Detection of allergenic substances in foods by a multiplex PCR method. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 48, 132–138.
- Hernández, M. I., Esteve, T., & Pla, M. (2005). Real-time polymerase chain reaction based assays for quantitative detection of barley, rice, sunflower and wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7003–7009.
- Hirao, T., Watanabe, S., Temmei, Y., Hiramoto, M., & Kato, H. (2009). Qualitative polymerase chain reaction methods for detecting major food allergens (peanut, soybean, and wheat) by using internal transcribed spacer region. *Journal of AOAC International*, 92, 1464–1471.
- Keskin, O., & Sekerel, B. E. (2006). Poppy seed allergy: A case report and review of the literature. *Allergy and Asthma Proceedings*, 27, 396–398.
- Leon, F., Rodriguez, M., & Cuevas, M. (2002). The major allergen of linseed. *Allergy*, 57, 968.
- López-Calleja, I., De la Cruz, S., González, I., García, T., & Martin, R. (2015a). Market analysis of food products for detection of allergenic walnut (*Juglans regia*) and pecan (*Carya illinoensis*) by real-time PCR. *Food Chemistry*, 177, 111–119.
- López-Calleja, I., De la Cruz, S., González, I., García, T., & Martin, R. (2015b). Duplex real-time PCR method for the detection of sesame (*Sesamum indicum*) and flaxseed (*Linum usitatissimum*) DNA in processed food products. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32, 1772–1785.
- López-Calleja, I., De la Cruz, S., González, I., García, T., & Martin, R. (2016). Duplex real-time PCR using TaqMan® for the detection of sunflower (*Helianthus annuus*) and poppy (*Papaver rhoeas*) in commercial food products. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 999–1007.

- López-Calleja, I., De la Cruz, S., Pegels, N., González, I., García, T., & Martín, R. (2013). High resolution TaqMan real-time PCR approach to detect hazelnut DNA encoding for ITS rDNA in foods. *Food Chemistry*, *141*, 1872–1880.
- López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., et al. (2007). Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by real-time PCR. *Food Control*, *18*, 1466–1473.
- Moreano, F., Ehlert, A., Busch, U., & Engel, K.-H. (2006). Ligation-dependent probe amplification for the simultaneous event-specific detection and relative quantification of DNA from two genetically modified organisms. *European Food Research and Technology*, *222*, 479–485.
- Mustorp, S. L., Dromtorp, S. M., & Holck, A. L. (2011). Multiplex, quantitative, ligation-dependent probe amplification for determination of allergens in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 5231–5239.
- Pafundo, S., Gulli, M., & Marmiroli, N. (2009). SYBR[®] GreenER Real-time PCR to detect almond in traces in processed food. *Food Chemistry*, *116*, 811–815.
- Pafundo, S., Gulli, M., & Marmiroli, N. (2010). Multiplex real-time PCR using SYBR[®] GreenER for the detection of DNA allergens in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *396*, 1831–1839.
- Panasoff, J. (2008). Poppy seed anaphylaxis. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, *18*, 224–225.
- Pegels, N., González, I., García, T., & Martín, R. (2015). Authenticity testing of wheat, barley, rye and oats in food and feed market samples by real-time PCR assays. *LWT – Food Science and Technology*, *60*, 867–875.
- Pereira, F., Carneiro, J., & Amorim, A. (2008). Identification of species with DNA-based technology: Current progress and challenges. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, *2*, 187–200.
- Poms, R. L., Anklam, E., & Kuhn, M. (2004). Polymerase chain reaction techniques for food allergen detection. *Journal of AOAC International*, *87*, 1391–1397.
- Pumphrey, R. S. H., & Gowland, M. H. (2007). Further fatal allergic reactions to food in the United Kingdom, 1999–2006. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *119*, 1018–1019.
- Regulation (EU) 1169/2011/EC of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004, L304, 18–43.
- Rona, R. J., Keil, T., Summers, C., Gislason, D., Zuidmeer, L., Sodergren, E., et al. (2007). The prevalence of food allergy: A meta-analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *120*, 638–646.
- Schouten, J. P., McElgunn, C. J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., & Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, *30*, e57.
- Spanjersberg, M. Q. I., Knulst, A. C., Kruizinga, A. G., Van Duijn, G., & Houben, G. F. (2012). Concentrations of undeclared allergens in food products can reach levels that are relevant for public health. *Food Additives & Contaminants: Part A*, *27*, 169–174.
- Taramarcaz, P., Hauser, C., & Eigenmann, P. A. (2001). Soy anaphylaxis. *Allergy*, *56*(8), 792.
- Unterberger, C., Lubber, F., Demmel, A., Grünwald, K., Huber, I., Engel, K.-H., et al. (2014). Simultaneous detection of allergenic fish, cephalopods and shellfish in food by multiplex ligation-dependent probe amplification. *European Food Research and Technology*, *239*, 559–566.
- Van Hengel, A. J. (2007). Declaration of allergens on the label of food products purchased on the European market. *Trends in Food Science & Technology*, *18*, 96–100.

III.2. Use of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for screening of wheat, barley, rye and oats in foods

Published article

Food Control

Volume 84, pages 268-277 (2018)





Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont

Use of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for screening of wheat, barley, rye and oats in foods



Aina García-García*, Raquel Madrid, Teresa García, Rosario Martín, Isabel González**

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 May 2017
Received in revised form
26 July 2017
Accepted 27 July 2017
Available online 27 July 2017

Keywords:

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)
Wheat (*Triticum aestivum* and *Triticum turgidum*)
Barley (*Hordeum vulgare*)
Rye (*Secale cereale*)
Oats (*Avena sativa*)
Food allergies
Authenticity
Commercial food products

ABSTRACT

A multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) approach is described for the simultaneous detection of DNA from four common cereal ingredients in foods: wheat, barley, rye and oats. The method uses species-specific MLPA half-probes targeting DNA fragments from the ribosomal internal space transcriber (ITS) region for the detection of barley and oats, and from the genes encoding the low molecular weight (LMW) glutenin and the ω -secalin for wheat and rye, respectively. After hybridization, the probes are ligated and amplified by polymerase chain reaction (PCR) into specific and size-differential amplicons that are simultaneously detected by capillary electrophoresis. The cereal MLPA technique showed an optimal specificity against a representative number of plant and animal species. A sensitive detection of the targets (LOD of 50 mg kg⁻¹) was achieved in a reference model cake experimentally spiked with different levels of each wheat, barley, rye and oats seeds. MLPA applicability was assessed through the analysis of 40 commercial food products with different labeling declarations regarding the targets (contain, may contain and do not declare/gluten free), indicating the presence of non-declared cereal ingredients in some of the tested samples. MLPA results were further confirmed by simplex Taqman real-time PCR assays. The described MLPA technique is a reliable and sensitive tool for screening the presence of low amounts of wheat, barley, rye and oats in processed foodstuffs, contributing to compliance with authenticity legal requirements and protecting consumers from fraudulent commercial practices or adventitious contamination which may lead to allergic reactions associated to cereal proteins ingestion.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Correct and clear labeling of foods has become an essential issue reclaimed both by consumers and food authorities and is a requirement of current European legislation. Specifically, compliance with Regulation (EU) No 1169/2011 relating to the provision of food information to consumers is necessary to guarantee the authenticity of food ingredients, prevent possible fraud substitutions and, especially in the case of allergic consumers, protect them from potentially hazardous exposures (Luber et al., 2014; OJEU, 2011; Poms, Klein, & Anklam, 2004).

Cereals are staple foods that constitute an important source of

energy and nutrients, contributing to the diet with carbohydrate, protein and fiber, as well as micronutrients such as B and E vitamins, magnesium and zinc (McKeivith, 2004). These beneficial qualities make cereals very commonly used ingredients in a large variety of items including bakery, desserts, dairy products, vegetarian dishes, etc. However, cereal mislabeling in foods may have negative economic and health implications for consumers (Charlebois, Schwab, Henn, & Huck, 2016). On the one hand, due to their low cost, cereal kernels might substitute other plant species in processed products in which it is impossible to recognize the components. Moreover, certain cereals may cause adverse reactions in some people because of their sensitivity to grain proteins (Sicherer & Sampson, 2014). In this context, the European Union (EU) legislation includes "cereals containing gluten, namely wheat (such as spelt and khorasan wheat), rye, barley, oats or their hybridized strains", among the 14 substances or products that must be mandatorily labeled to prevent food allergies and intolerances (OJEU, 2014).

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: ainagarcia@ucm.es (A. García-García), gonzalzi@ucm.es (I. González).

Wheat, one of the major cereals in the world, is associated with diverse food pathologies such as: i) wheat allergy, affecting approximately to 0.4% of world population with symptoms dominated by atopic dermatitis or digestive disorders and ii) celiac disease, a chronic enteropathy produced by the exposure to gluten proteins like glutenins and prolamins present mainly in wheat, barley and rye (Kucek, Veenstra, Amnuaycheewa, & Sorrells, 2015; Theethira & Dennis, 2015). Besides, cereal-dependent exercise-induced anaphylaxis (CDEIA) is a rare condition that has been associated with the ingestion of wheat, barley and rye when combined with other predisposing cofactors such as physical exercise, consumption of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and/or alcohol and certain infectious conditions (García-Menaya, Chiarella, Cordobés-Durán, Mahecha, & Bobadilla-González, 2016; Scherf, Brockow, Biedermann, Koehler, & Wieser, 2016). Also, a type I hypersensitivity to barley proteins has been described (Curioni et al., 1999). The inclusion of oats in the list of legislated allergens remains controversial worldwide due to its lower prolamins content compared with wheat, barley and rye, and the higher tolerance of celiac patients to this protein (García-Manzanares & Lucendo, 2011). However, the frequent contamination of oats with other cereals, together with the reported anaphylactic potential of certain oats proteins justifies the mandatory declaration of this cereal by EU food labelling rules (Hernando, Mujico, Mena, Lombardía, & Méndez, 2008; Prados-Castaño et al., 2016). Therefore, performing sensitive and specific methodologies which allow authentication of cereals like wheat, barley, rye and oats in foods would ensure clear and accurate information to consumers, contributing to avoid fraudulent misdescriptions and exposure to allergenic ingredients that may be dangerous and even fatal for sensitized individuals (Charlebois et al., 2016; Prado et al., 2015).

Food species authentication and allergen analysis is traditionally focused on detecting protein molecules, mainly by different enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) platforms and, more recently, through other proteomic approaches (Besler, 2001; Cucu et al., 2012). Although nucleic acid strategies, especially those based on the polymerase chain reaction (PCR), do not replace the protein-based techniques, they are considered as advantageous and highly powerful alternative tools in food testing procedures (Luber et al., 2014; López-Calleja, de la Cruz, Martín, González, & García, 2015; Terzi et al., 2005). Particularly, thermal processes have demonstrated a more drastic impact on the structure of protein molecules compared to DNA, resulting in severe aggregation and/or partial peptide hydrolysis that compromise detectability (Sathe, Teuber, & Roux, 2005).

Along with the need for low sensitivities, a major analytical challenge in current food authentication and traceability methods relies in the fact that various food species are usually present simultaneously in the same product, leading to an increased demand for techniques with multi-detection capabilities (Garber et al., 2016). During the last years, a number of multiplex real time PCR assays have been reported for this purpose (Köppel, van Velsen-Zimmerli, & Bucher, 2012; López-Calleja et al., 2015). However, multiplexing PCR is fraught with problems such as frequent side reactions and preferential amplification of some DNA templates in the sample mixture (Mustorp, Drømtorp, & Holck, 2011). In this context, the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) is a newly developed technique that offers high skill potential for the simultaneous amplification of several target sequences (Ehlert, Demmel, Hupfer, Busch, & Engel, 2009; Guertler, Goerlich, & Busch, 2014; López-Calleja et al., 2017; Mustorp et al., 2011; Schouten et al., 2002; Unterberger et al., 2014). Nevertheless, the number of works in the field of food control is still very scarce.

Considering all the above aspects, the aim of this work was to

develop a MLPA system for the screening and simultaneous detection of DNA from wheat, barley, rye and oats in a variety of retail food products. Authenticity testing of cereals in foods is necessary to comply with labelling rules and protect consumers from deceiving commercial practices and potentially adverse reactions.

2. Materials and methods

2.1. Sample selection

Reference samples of target seed cereals analyzed in this study were provided by the Spanish National Center for Plant Genetic Resources (CRF-INIA, Madrid, Spain). These included ten different cultivars of each of the following cereal species: common wheat (*Triticum aestivum vulgare*), spelt wheat (*Triticum aestivum spelta*), durum wheat (*Triticum turgidum durum*), khorasan wheat (*Triticum turgidum turgidum*), barley (*Hordeum vulgare*), rye (*Secale cereale*) and oats (*Avena sativa*). Two cultivars of *Triticale*, a hybrid of wheat and rye recently developed into a commercially viable crop, were also provided. Besides, a wide range of non-target plant and animal species were obtained from local retail stores to be analyzed in the specificity assays (Table 1).

Forty commercial food products were selected from different markets and organic food stores to include a wide representation of samples showing different industrial processing treatments and label declaration schemes regarding the target species.

2.2. Preparation of a reference model cake spiked with the target cereals

A self-prepared model cake containing identical quantities of the four cereals (common wheat, barley, rye and oats) was used to determine the functionality and sensitivity of the MLPA assay. A dough matrix was prepared by mixing proportionally maize flour, sugar and butter. Maize flour was selected among different non-target starting materials based in the absence of any MLPA background signal interference. Afterwards, to obtain an initial cake sample containing 10% of every target cereal, 25 g of each common wheat, barley, rye and oats seeds were grounded before mixing them with 150 g of the dough matrix in a food processor (type Thermomix, Vorwerk, Wuppertal, Germany) at maximum speed for 15 min to achieve a complete homogenization. This initial 10% spiked mixture and sufficient amount of maize dough were baked separately at 180 °C for 25 min and thoroughly grounded afterwards. To obtain the rest of the model samples, the 10% cake level was serially spiked in the maize dough at a final weight of 200 g to achieve the desired concentration levels of each target cereal (100 000, 10 000, 1 000, 500, 100, 50, 10, 5, 1, 0.5 and 0.1 mg kg⁻¹). Due to the high fat content of the dough, and to ensure a complete homogeneity, samples were frozen and grounded again with an IKA A11 analytical mill (IKA®, Staufen, Germany) before being used for the DNA extraction.

2.3. DNA extraction

Genomic DNA was obtained and purified from 200 mg of sample employing the Wizard DNA Clean-up System kit (Promega, Madison, WI, USA) as described by Pegels et al. (2011). The DNA was eluted in 50 µL of TE_{0.1} (10 mM TrisHCl, pH 8.2, and 0.1 mM EDTA) at 65 °C to provide samples of sufficient buffering capacity to prevent depurination of DNA sample during the MLPA amplification step. DNA concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, DE), normalized to 20 ng µL⁻¹ for the MLPA reaction and stored

Table 1
Specificity of the cereal-MLPA system.

Species	Allergen-MLPA specific probes and target lengths (pb)				
	Wheat (135)	Barley (102)	Rye (97)	Oats (111)	PAC18S (128)
Common wheat (<i>Triticum aestivum vulgare</i>)	+	–	–	–	+
Spelt wheat (<i>Triticum aestivum spelta</i>)	+	–	–	–	+
Khorasan wheat (<i>Triticum turgidum turgidum</i>)	+	–	–	–	+
Durum wheat (<i>Triticum turgidum durum</i>)	+	–	–	–	+
Barley (<i>Hordeum vulgare</i>)	–	+	–	–	+
Rye (<i>Secale cereale</i>)	–	–	+	–	+
Oats (<i>Avena sativa</i>)	–	–	–	+	+
Triticale (<i>Triticosecale</i>)	+	–	+	–	+
Rice (<i>Oryza sativa</i>)	–	–	–	–	+
Maize (<i>Zea mays</i>)	–	–	–	–	+
Millet (<i>Panicum miliaceum</i>)	–	–	–	–	+
Buckwheat (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	–	–	–	–	+
Amaranth (<i>Amaranthus</i>)	–	–	–	–	+
Chia (<i>Salvia hispanica</i>)	–	–	–	–	+
Quinoa (<i>Chenopodium quinoa</i>)	–	–	–	–	+
Sesame (<i>Sesamum indicum</i>)	–	–	–	–	+
Soybean (<i>Glycine max</i>)	–	–	–	–	+
Sunflower (<i>Helianthus annuus</i>)	–	–	–	–	+
Poppy (<i>Papaver rhoeas</i>)	–	–	–	–	+
Flaxseed (<i>Linum usitatissimum</i>)	–	–	–	–	+
Green pea (<i>Pisum sativum</i>)	–	–	–	–	+
Chickpea (<i>Cicer arietinum</i>)	–	–	–	–	+
Lentil (<i>Lens culinaris</i>)	–	–	–	–	+
Bean (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	–	–	–	–	+
Walnut (<i>Juglans regia</i>)	–	–	–	–	+
Macadamia (<i>Macadamia intergrifolia</i>)	–	–	–	–	+
Cashew nut (<i>Anacardium occidentale</i>)	–	–	–	–	+
Almond (<i>Prunus dulcis</i>)	–	–	–	–	+
Hazelnut (<i>Corylus avellana</i>)	–	–	–	–	+
Peanut (<i>Arachis hypogaea</i>)	–	–	–	–	+
Pistachio (<i>Pistacia vera</i>)	–	–	–	–	+
Brazil nut (<i>Bertholletia excelsa</i>)	–	–	–	–	+
Pecan (<i>Carya illinoensis</i>)	–	–	–	–	+
Tiger Nut (<i>Cyperus esculentum</i>)	–	–	–	–	+
Lupine (<i>Lupinus albus</i>)	–	–	–	–	+
Acorn (<i>Quercus ilex</i>)	–	–	–	–	+
Chestnut (<i>Aesculus hippocastanum</i>)	–	–	–	–	+
Pine nut (<i>Pinus pinea</i>)	–	–	–	–	+
Melon (<i>Cucumis melo</i>)	–	–	–	–	+
Kiwifruit (<i>Actinidia deliciosa</i>)	–	–	–	–	+
Coconut (<i>Cocos nucifera</i>)	–	–	–	–	+
Mango (<i>Mangifera indica</i>)	–	–	–	–	+
Tangerine (<i>Citrus reticulada</i>)	–	–	–	–	+
Orange (<i>Citrus sinensis</i>)	–	–	–	–	+
Potato (<i>Solanum tuberosum</i>)	–	–	–	–	+
Garlic (<i>Allium sativum</i>)	–	–	–	–	+
Onion (<i>Allium cepa</i>)	–	–	–	–	+
Eggplant (<i>Solanum melongena</i>)	–	–	–	–	+
Zucchini (<i>Cucurbita pepo</i>)	–	–	–	–	+
Tomatoe (<i>Solanum lycopersicum</i>)	–	–	–	–	+
Asparagus (<i>Asparagus officinalis</i>)	–	–	–	–	+
Green bean (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	–	–	–	–	+
Green pepper (<i>Capsicum annuum</i>)	–	–	–	–	+
Pumpkin (<i>Cucurbita maxima</i>)	–	–	–	–	+
Carrot (<i>Daucus sativus</i>)	–	–	–	–	+
Olive (<i>Olea europaea</i>)	–	–	–	–	+
Cattle (<i>Bos taurus</i>)	–	–	–	–	+
Sheep (<i>Ovis aries</i>)	–	–	–	–	+
Goat (<i>Capra hircus</i>)	–	–	–	–	+
Swine (<i>Sus scrofa domestica</i>)	–	–	–	–	+

PAC18S: positive amplification control for eukaryotes on the 18S rRNA gene.

at –20 °C until analysis. Unless otherwise stated, samples were extracted by duplicate and a negative control sample was included in every DNA extraction to verify the adequacy of the procedure.

2.4. Design of MLPA oligonucleotide probes

Wheat-, barley-, rye-, and oats-specific MLPA probes were designed based on sequence data from the ribosomal DNA internal

transcribed spacer (ITS) region and the protein-coding genes for the ω-secalin and low-molecular-weight (LMW) glutenin. DNA sequences from the target cereals and other related plants available on the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) were aligned and analyzed to find suitable regions for the design of each probe set. Specificity of the selected probes was evaluated *in silico* by BLAST search within NCBI GenBank, to avoid interfering cross-reactivities.

As far as possible, the oligonucleotide probe attributes were in accordance with the general suggestions of MRC-Holland (Amsterdam, The Netherlands) (<http://www.mrc-holland.com/WebForms/WebFormMain.aspx>). An additional MLPA probe set designed in the conserved 18S rRNA gene was included in all the experiments as positive amplification control (PAC18S).

Table 2 shows the information about the MLPA probes and primers sequences, selected target genes with their GenBank accession numbers, and sizes of the amplicons obtained after the MLPA reactions. Probes were purchased from IDT (Integrated DNA Technologies, Iowa, USA) (<https://eu.idtdna.com/site>). Primers for the simultaneous amplification of all MLPA probe sets are included in the MLPA reagents kit (MRC-Holland).

2.5. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay

All steps of the MLPA assay were performed in a single tube for each sample using a 96-LifeEco Thermal Cycler (Bioer Technology, Hangzhou, China), employing the SALSA MLPA EK1 reagent kit (MRC-Holland) according to the manufacturer's instructions. Reaction components are included in the SALSA MLPA EK1 reagent kit, excluding DNA sample, probe mix, water, TE and TE_{0.1} buffers.

Five microliter of sample DNA (20–100 ng) in TE_{0.1} was denaturated at 95 °C for 5 min using 0.2 mL tubes. In all reactions, a non-template control with 5 µL of TE_{0.1} was included to reveal possible reagent contaminations. Samples were cooled down to 25 °C and removed from the thermocycler to add the hybridization mix consisting on 1.5 µL of SALSA MLPA buffer and 1.5 µL of synthesized probe mixture in TE. The optimized amount of each MLPA half-probe in the mixture was: 0.05 fmol of oats-specific probes, 0.1 fmol of barley-specific probes, 2.5 fmol of each wheat- and rye-specific probes and 0.005 fmol of PAC18S probes. Samples were heated at 95 °C for 1 min and incubated at 60 °C for 16 h to achieve hybridization. For the ligation reaction of the hybridized probes, 32 µL of the Ligase master mix (3 µL ligase buffer A, 3 µL ligase buffer B, 25 µL H₂O and 1 µL Ligase-65) were added and incubated for 15 min at 54 °C. To inactivate the enzyme, the samples were heated at 98 °C for 5 min. Simultaneous amplification of the ligation products was carried out with the universal SALSA PCR primers by adding 10 µL of polymerase master mix (7.5 µL H₂O, 2 µL PCR Primer Mix and 0.5 µL SALSA polymerase) and running the following program: 35 cycles of amplification (30 s at 95 °C for denaturation, 30 s at 60 °C for annealing and 1 min at 72 °C for extension) followed by a final extension at 72 °C for 20 min and a cool down step to 4 °C. PCR products were stored in the dark until further analysis. In each experiment, DNA extracts were analyzed in duplicate to evaluate the reproducibility of the developed assay.

2.6. Capillary electrophoresis (CE)

One microliter of the amplified PCR product was used for fragment separation by adding to the sample 9 µL of HiDi formamide and 0.5 µL of Genescan 500 LIZ size standard. Prior to the analysis, DNA sample was denaturated at 95 °C for 5 min and cooled on ice. The CE plate was run on a 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems) under the following electrophoresis settings: run temperature, 60 °C; injection time, 5–22 s; run time, 1800 s; run voltage s, 15.0 kV and run current, 5 µA. Fluorescence data were collected during fragment separation and Gene Mapper 4.0 (Applied Biosystems) and Peak scanner v1.0 software were used to extract peak patterns and evaluate the height and size of fluorescent PCR fragments in the electropherograms.

Table 2
Probes and primers of the MLPA systems.

Target/Gen Bank accession number	Probe name	Right Probe Oligonucleotide (RPO) (5' → 3')		Target gene or region	Amplicon size (bp)	
		Left Probe Oligonucleotide (LPO) (5' → 3')	Right Probe Oligonucleotide (RPO) (5' → 3')		Calculated	Observed
Wheat U86029.1	wheatLPO	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAccattatGCCACAAGTGC	CCTGTGTTGGAGACCATGGCCAGCAACCATT	LMW glutenin	135	133
Barley FJ593180.1	barLPO	AAITGCCAGATGGAGACTAGATGGCAT	ACGtagatGCTCTAGATTGGATCTCTGGCCAC	ITS-1	102	101
Rye AF000227.1	ryeLPO	GGGTTCCTTAAGGTTGGACTAGCTTGGTGGTC	TATTTAATCCACAGCACTCTGGCAACGCTCTAGATTGG	ω-secalin	97	95
Oats AY520821.1	oatsLPO	ACCTGTGTTGCAATA	ATCTTCTGGCAC	ITS-2	111	109
PAC18S	PAC18SLPO	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAcCATCGGAGGCC	TATAGTACTAGACCGGTGGAgcctctctgTCTAGATTGGATCTT	18S rRNA	128	127
	PAC18SRPO	AAITCAACAAGAGA	GCTGGCAC			
Primer Rev (unlabeled)		GGGTTCCTTAAGGTTGGACTAGCCCGCTGTAT	TAACGGTCCGCATGACCTCCGACCCGCCAGCCAGGTTCTAGATTGG			
Primer Fw (labeled)		GGCTAGAAATGACCCCTTG	ATCTTCTGGCAC			
		GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGGTCGCCAGCCCGGT	TAAGTTGTGACAGTTAAAAGCTCTATTGGACTTTGGGATGCTCTAG			
		AAITCCAGCTCAATAGCGTATAT	ATTTGATCTTCTGGCAC			
		5'-GTCCAGCAAGATCAATCTAGA-3'				
		6FAW-5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGCA-3'				

Target-specific hybridizing sequences are written in upper case, extension sequences (to achieve appropriate amplicon size and increase amplification efficiency) are in lower case and primer binding sites are in bold capitals. All RPOs are 5'-phosphorylated.

2.7. Real-time PCR confirmatory assays

To validate and confirm the MLPA results, a simplex real-time PCR methodology based on hydrolysis Taqman probes previously developed by our group (Pegels, González, García, & Martín, 2015) was performed. PCR reactions specific for wheat, barley, rye and oats were run under therein described cycling conditions using a LightCycler 2.0 Instrument (Roche Applied Science, Penzberg, Germany).

3. Results and discussion

3.1. Selection of genetic markers and design of MLPA probes

In the work described herein, four MLPA probe sets were designed upon different gene sequences for the specific and simultaneous detection of wheat, barley, rye and oats species. Several published PCR-based methods were consulted to help in the selection of the most appropriate genetic markers for designing the cereal MLPA half-probes (Dahinden, von Büren, & Lüthy, 2001; López-Calleja et al., 2015; Pegels et al., 2015; Sandberg, Lundberg, Ferm, & Malmheden-Yman, 2003; von Büren, Stadler, & Lüthy, 2001; Zeltner, Glomb, & Maede, 2009). Among them, specific ribosomal DNA (rDNA) sequences present in plants have proved suitable to discriminate between species, and have been successfully used for the differential detection of certain allergenic ingredients in foods (Hirao, Watanabe, Temmei, & Hiramoto, 2009; López-Calleja et al., 2015; Pegels et al., 2015). In particular, the ITS region of the 18S–5.8S–26S nuclear rDNA has become one of the most popular tools for phylogenetic inference in plants, posing a high potential for identification studies of closely related species (Álvarez & Wendel, 2003). Moreover, the multi-copy feature of ITS sequences favors DNA amplification even from complex processed food samples where DNA is degraded due to intense thermal treatments, increasing assay sensitivity (Hirao et al., 2009). Accordingly, in this work two MLPA probe sets specific for barley and oats were designed upon sequence data available in GenBank from the rDNA ITS regions (1 and 2), yielding expected amplicon lengths of 102 and 111 bp, respectively. However, it should be noted that the ITS marker did not show the optimal sequence arrangement features required for the design of half-probe sets adaptable to the differential detection of wheat and rye in the MLPA.

In the search for alternative markers to rDNA, the genes encoding for cereal seed storage proteins (SSPs) are also reported as candidate targets for diagnostic development and species identification assays in plants (Martín-Fernández, de-los-Santos-Álvarez, Lobo-Castañón, & López-Ruiz, 2015; Mayer et al., 2012). Proteins conforming the prolamins fraction are one of the best known SSPs of cereal seeds and have shown to possess a related structure and function in the *Triticeae* (wheat, barley, rye) taxonomic group, suggesting a common evolutionary origin of these plants (Sandberg et al., 2003; Shewry & Halford, 2002). Despite this conservative attribute, specific primer sequences designed upon genes encoding for cereal SSPs have demonstrated a good capability to discriminate among various seed species with allergenic potential (Debnath, Martin, & Gowda, 2009; Hernández, Esteve, & Pla, 2005; Sandberg et al., 2003). In this study, computer analysis of genes coding for the different cereal prolamins (gliadin in wheat, secalin in rye, hordein in barley and avenin in oats) allowed designing a rye specific MLPA probe set in the ω -secalin sequence, with a length of 97 bp. Besides, a wheat-specific oligonucleotide probe set was designed upon the genes coding for another SSP, the low-molecular-weight glutenin fraction, yielding an amplicon size of 135 bp in the four selected wheat species (common, spelt, durum and khorasan wheat). Other studies have reported the glutenin

gene as an adequate marker for the identification of plants belonging to the *Triticum* genus (Carloni et al., 2017; Terzi, Malnati, Barbanera, Stanca, & Faccioli, 2003).

DNA deterioration caused by food processing and/or presence of enzymatic inhibitors in the samples may be sources of false negative assay results. Therefore, correct interpretation of MLPA tests implies to include an amplification control in the reactions. An additional probe set previously designed by our group on a conserved eukaryotic 18S rRNA gene sequence (López-Calleja et al., 2017) was employed as a positive amplification control (PAC) of the MLPA reactions. Details of the five sets of MLPA probes used in this study are shown in Table 2.

3.2. Evaluation of MLPA specificity

Possible cross homologies between DNA from wheats, barley, rye, oats and other non-target plant and animal species were first checked *in silico* by aligning the complete hybridizing sequence of each probe (LHS and RHS) against sequences available at BLAST search within the NCBI GenBank. Single DNA templates (20 ng) extracted from the target cereals were preliminarily analyzed in independent reactions with each corresponding cereal MLPA probe set in combination with the PAC18S system. As summarized in Table 1, the four cereals were successfully detected, together with the PAC18S, giving reproducible signals of the expected sizes (wheats 135 nt, barley 102 nt, rye 97 nt, oats 111 nt, PAC18S 128 nt). A slight shift (1–2 nt) of the theoretical length was commonly obtained (Table 2) and was attributed to the different mobility of DNA and/or the distinct labeling of the standard and the amplified fragments, as reported by other authors (Ehlert et al., 2009; Unterberger et al., 2014). Ten cultivars from each cereal species were included in the assays and showed the corresponding reproducible positive signals (results not shown). DNA extracts from two *Triticale* cultivars also yielded the expected amplification lengths with both wheat (135 pb) and rye (97 pb) probe MLPA systems.

The great variety of ingredients found in complex foods highlights the need to perform cross-reactivity experiments against a wide number of edible plant and animal species. Hence, each MLPA probe set was checked against DNA extracts from various plant and animal species that may be used as food ingredients. Results proved that none of the cereal MLPA probes gave equivocal peaks when the non-target species were tested, warranting an appropriate specificity of the MLPA technique for subsequent analysis of commercial products. Positive signal of PAC18S evidenced the presence of amplifiable DNA in all the tested extracts (Table 1).

3.3. Evaluation of MLPA multiplexing performance and sensitivity

Preliminary initial MLPA analysis (results not shown) using wheat, barley, rye and oats DNA serial dilutions from 20 ng μL^{-1} and equal concentrations of the five probe sets (from 5 to 1 fmol) in the same reaction, gave rise to five specific electrophoretic peaks in the range of the expected molecular weights for each DNA target (90–140 pb). However, remarkably stronger fluorescence signals were obtained for oats and barley MLPA systems compared with those for wheat and rye. The higher peak signals generated in oats and barley may be attributed to the multi-copy nature of the ITS region used as genetic marker in the probe design of these two cereals, which helps to enhance assay sensitivity with respect to wheat and rye SSP-based systems. So, to achieve consistent detection of the four targets in a single reaction with more homogeneous signal intensities, concentrations of every oligonucleotide probe had to be optimized in the final hybridization reaction mix (2.5–0.005 fmol), as described in materials and methods

section. Five specific peaks of adequate intensities and near to the theoretical sizes were generated when the optimized probe mixture was employed, confirming the multiplexing feature of the MLPA technique for the detection of wheat, barley, rye and oats DNAs (Fig. 1A).

The field sensitivity of the MLPA technique was evaluated in a reference self-prepared cake due to the lack of appropriate reference materials containing representative amounts of all the tested species. A maize-based model cake spiked with different concentrations of the target cereals ($100\ 000\text{--}0.1\ \text{mg kg}^{-1}$) was tested under the MLPA described conditions. The limit of detection (LOD), expressed as the least concentration for which all probe sets give consistently positive results, was determined from two independent DNA extractions of each spiking level analyzed in duplicate. In all cases, unspiked cake was included in the analysis. Fig. 1B (1–4) shows the MLPA electropherograms obtained from the analysis of spiked levels of $500\ \text{mg kg}^{-1}$, $50\ \text{mg kg}^{-1}$ and $10\ \text{mg kg}^{-1}$, together with the unspiked control dough. Peak signals under 2000 RFUs were considered as negative and non-assigned signals correspond to unspecific peaks due to overloaded system when the tested cereals are present at the highest concentrations. Low peaks near to

the main specific signals ($n-1$) are attributed to the injection rate of the sequencer and/or possible oligonucleotide impurities. In agreement with our previous results, the signal decline observed in the MLPA electropherograms when the spiked concentrations decreased was more pronounced for wheat and rye than for barley and oats. As consequence, the overall LOD of the MLPA technique was set in $50\ \text{mg kg}^{-1}$ ($0.005\%\ \text{w/w}$ of each cereal, Fig. 1B 2), while barley and oats species could be individually detected up to $10\ \text{mg kg}^{-1}$ (Fig. 1B 3).

3.4. Market analysis of foods for detection of wheat, barley, rye and oats

The applicability of the MLPA technique developed in this work was evaluated against DNA extracts obtained from 40 different commercial food products including pastries, snacks, drinks, chocolates, dairy products, baby foods, etc. All the samples analyzed by MLPA were checked in parallel by four cereal-specific real-time PCR systems previously developed by our group (Pegels et al., 2015), in consonance with some studies that suggest that confirming MLPA results by other techniques may be useful to

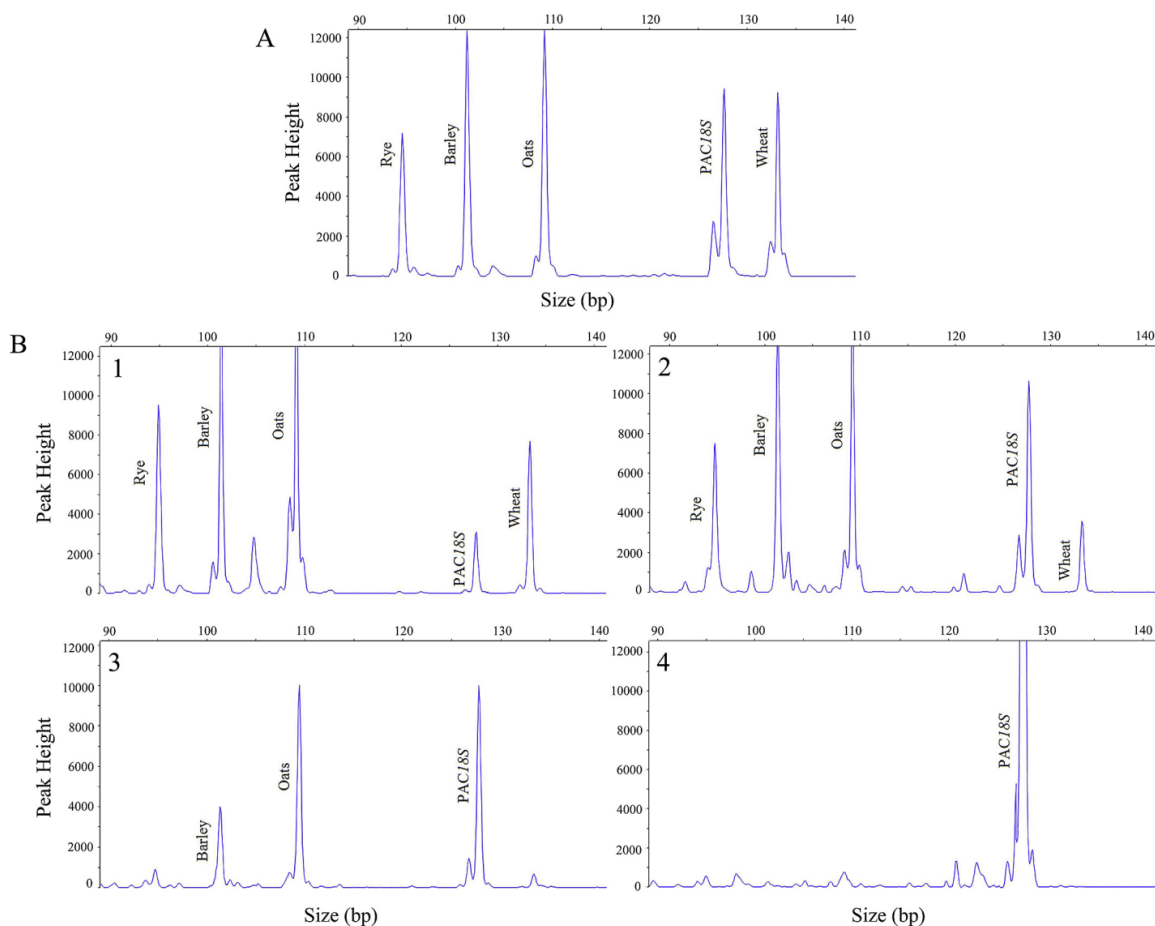


Fig. 1. Electropherograms obtained from the MLPA analysis of (A) a mixture of wheat, barley, rye and oats DNAs ($20\ \text{ng }\mu\text{L}^{-1}$) and (B) a self-prepared model cake with decreasing spiked levels of the target cereals: (1) $500\ \text{mg kg}^{-1}$, (2) $50\ \text{mg kg}^{-1}$ and (3) $10\ \text{mg kg}^{-1}$ (4) Un-spiked maize dough.

avoid potential artifacts and/or misinterpretations (Kim et al., 2016; López-Calleja et al., 2017).

The results obtained in this work are summarized in Table 3, where samples were classified into three different groups according to their label declaration regarding wheat, barley rye and oats: A) products that declare to contain one or more of the target cereals (samples 1–15); B) foods that declare “may contain wheat, barley, oats, rye and/or gluten” (samples 16–25); C) products certified as gluten free (samples 26–30) or without any declaration regarding wheat, barley, rye, oats nor gluten (samples 31–40). It should be noted that samples 14 and 15 placed in group A share the “may contain” declaration of group B products.

As shown in the table, in all the products where one or more target cereals appeared on the label (group A), the developed MLPA technique satisfactorily revealed their presence. The electropherograms of four representative samples of this category containing different kinds and number of cereal ingredients are shown in Fig. 2 (A–D) (products 3, 15, 8 and 12, respectively), illustrating the multiplexing capability of the assay to detect DNA from several targets in complex foods. Real-time PCR amplifications demonstrated correlation with the MLPA detected cereals in the samples, evidencing an absence of false positive results. Besides, as exemplified in Fig. 2 (C–E), a number of analyzed products falling in this first category (e.g. products 8 and 12) as well as some samples from group C (e.g. product 31) did not declare the presence of cereals that were, in contrast, detected in the MLPA assay and confirmed by the real-time PCR. All analyzed samples showed positive signals for the PAC18S probe system, suggesting the correct performance of DNA extraction and MLPA steps (annealing, ligation and amplification) with no false-negative results. This is particularly relevant to check the presence of amplifiable DNA in those products declared free from the target cereals, where PAC18S signal should be detected (e.g. sample 36, Fig. 2F). In addition, appropriate interpretation of the results requires to be informed about the ingredients and processing characteristics of the samples, since DNA degradation or the presence of inhibitors may cause a decrease in the amplification efficiency (Schrader, Schielke, Ellerbroek, & Johnne, 2012).

The high and wide peaks observed in Fig. 2 electropherograms could be attributable to the presumable higher level of declared cereals in a real commercial product (e.g. Fig. 2A and B) in comparison to the reference model cake samples spiked with low amounts of target (0.05%–0.001%) (Fig. 1B). Besides, the inherent high sensitivity of barley and oat MLPA half-probes, together with a possible relatively high level of barley and oat contamination could explain the intense peaks achieved for these two cereals in products that do not declare their presence (e.g. products of Fig. 2C–E).

Consumers have the right to assure themselves that the food they purchase is labeled authentically and demand more and more transparency throughout the supply chain. Moreover, adverse reactions may arise in the allergic population which are only prevented by strictly following an allergen-free diet, a lifelong condition that cannot be fulfilled without assessing the traceability of foods and their ingredients. However, this is not an easy task due to the possible accidental exposure of consumers to undeclared allergens (Buchanan et al., 2008). In the present work, excluding category B products, a 33% (10 of 30) of the samples analyzed by MLPA (4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 31, 33 and 38) contained undeclared wheat, barley, rye and/or oats ingredients. However, this percentage increases up to 60% (additional nine products: 11, 13, 14, 26, 27, 30, 34, 35 and 40) if real-time PCR results are considered. This divergence is owed to the lower sensitivity achieved in the simultaneous detection of the target cereals by the MLPA technique compared to the simplex species-specific real-time PCR assay developed by Pegels et al. (2015), suggesting the presence of

minute amounts of undeclared cereals (below 50 mg kg⁻¹) in these additional PCR-positive samples. In agreement with other author's observations (Cho, Nowatzke, Oliver, & Garber, 2015; Garber et al., 2016), the high proportion of commercial products evidencing cereal ingredients not listed in the labels may be owed to fraudulent practices, their use as additives, mislabeling of raw materials or, more presumably, the chances of cross-contaminations to which cereal kernels are susceptible during growing, harvesting and/or production in facilities where both, allergenic and non-allergenic ingredients coexist (Prado et al., 2015).

Because the absence of potentially harmful cross-contaminants is not always guaranteed, even when industries adhere to good cleaning procedures, a precautionary warning (“may contain”) may be voluntarily adopted to avoid liability issues for allergic reactions. However, the lack of legal requirements describing an appropriate and proportioned use of this tool has negatively impacted on consumers causing a considerable restriction of available safe products or, on the contrary, a depreciation of the message resulting in increased risk-taking (Barlow et al., 2015; Ward et al., 2010). In the present study, only a 25% (3 of 12) of samples analyzed in the “may contain” food label category (group B) gave MLPA positive signals for any of the targets (samples 21, 22 and 24). The real-time PCR assay again confirmed these results, allowing the detection of trace amounts of undeclared target cereals in three additional samples (14, 17 and 19) and rising up the percentage of positive samples to 50% (6 of 12). These results are in line with other works supporting the belief that the non-regulated precautionary labeling frequently leads to uncontrolled overuse even when the chance of contamination does not exist (Ward et al., 2010; Woolfe & Primrose, 2004). However, a broader sample spectrum of retail foods should be analyzed to provide more representative conclusions in this regard.

As deduced from Table 3, an important percentage of discrepancies between real-time PCR and MLPA results are related with PCR detection of wheat species in commercial products where MLPA did not reveal wheat's presence (samples 11, 13, 14, 17, 19, 21, 27, 30, 31, 35 and 38). This result is in consonance with the lower sensitivity achieved with the wheat-specific MLPA probe system designed upon the LMW glutenin, and also supports the enhanced detectability reported by Pegels et al. (2011) in the wheat real-time PCR assay based on the multi-copy rDNA ITS region.

Whether their presence is deliberate or unintended, ingredient omissions in the labels not only constitute unfair marketing practices, but can also be life-threatening to unsuspecting allergic consumers. Despite the great progress achieved during the last years in the framework of food authentication procedures, reliable and sensitive tools are still needed to enable accurate detection of food components (Buchanan et al., 2008; Garber et al., 2016).

According to published works, ideal detection assay limits for food allergens should be between 1 and 100 mg kg⁻¹ for the allergenic food or 1–10 mg kg⁻¹ for the protein fraction to protect most sensitized consumers from severe allergic reactions (Alves, Barroso, González-García, Oliveira, & Delerue-Matos, 2016). The overall LOD of the developed MLPA assay was set in 50 mg kg⁻¹ for the four allergenic cereal species, and is in agreement with the sensitivity thresholds reported by the few MLPA studies published in this context until the date. For example, Ehlert et al. (2009), Mustorp et al. (2011) and López-Calleja et al. (2017) developed ligation-dependent probe amplification approaches for the multiplex detection of several plant allergens in foods, and Unterberger et al. (2014) focused on the simultaneous MLPA detection of allergenic fish, shellfish and cephalopod species, with LODs ranging from 5 to 100 mg kg⁻¹.

The proposed MLPA method does not improve the existing sensitivity levels of most commercially available ELISAs and real-

Table 3
Results of the MLPA and real-time PCR analysis of 40 commercial food products.

Label declaration regarding target cereals	Type of product	Target ingredients declared	Detected species by MLPA	Detected species by real time PCR
A) Contain wheat, rye, barley and/or oats	1 Snack	barley	barley	barley
	2 Whole grain biscuit	wheat, rye, barley, oats	wheat, rye, barley, oats	wheat, rye, barley, oats
	3 Baby food 1	wheat, rye, barley, oats	wheat, rye, barley, oats	wheat, rye, barley, oats
	4 Chia biscuit	wheat, oats	wheat, barley, oats	wheat, barley, oats
	5 Cereals yoghurt	wheat, barley, oats	wheat, barley, oats	wheat, barley, oats
	6 Jelly balls	wheat	wheat, barley	wheat, barley
	7 Pañé	wheat	wheat, barley	wheat, barley
	8 Chocolate 1	wheat	wheat, rye, barley	wheat, rye, barley, oats
	9 Toti	wheat, oats	wheat, barley, oats	wheat, barley, oats
	10 Cereal burger	wheat, oats	wheat, barley, oats	wheat, barley, oats
	11 Rye snack	rye	rye	wheat, rye, barley, oats
	12 limitation elver	wheat	wheat, barley	wheat, barley, oats
	13 Oats crackers	barley, oats	barley, oats	wheat, barley, oats
	14 Muesli nuts	barley, oats may contain wheat and rye	barley, oats	wheat, barley, oats
	15 Muesli yoghurt	wheat, barley, oats may contain rye	barley, oats-	barley, oats wheat
B) May contain traces of wheat, barley, rye, oats and/or gluten	16 Rice cake	gluten	wheat, barley, oats-	wheat, barley, oats-
	17 Precooked rice	gluten	-	-
	18 Chocolate 2	wheat	-	wheat
	19 Chocolate 3	wheat	-	wheat, oats
	20 Maize snack	cereals with gluten	-	wheat, oats
	21 Maize flakes	gluten	barley, oats	wheat, barley, oats
	22 Cereal bar	gluten	barley	barley
	23 Dried fruits mix	wheat	-	-
	24 Hummus chips	wheat	wheat	wheat, barley, oats
	25 Coconut bar	wheat, barley, oats	-	-
	26 Plum cake	gluten free	-	barley
	27 Chocolate biscuit	gluten free	-	wheat
	28 Maize tortilla	gluten free	-	-
	29 Baby food 2	gluten free	-	-
	30 Baby food 3	gluten free	-	wheat
	31 Milled flaxseed	gluten free	oats	wheat, oats
	32 Sauce	-	-	-
	33 Cream soup	-	barley	barley
	34 Milkshake	-	oats	oats
	35 Dried fruits	-	wheat, barley	wheat, barley
	36 Ice cream 1	-	-	-
	37 Ice cream 2	-	-	-
	38 Protein bar	-	-	-
	39 Cheese snack	-	oats	wheat, barley, oats
	40 Ratatouille	-	-	oats
C) Do not declare wheat, rye, barley and oats/Gluten free				

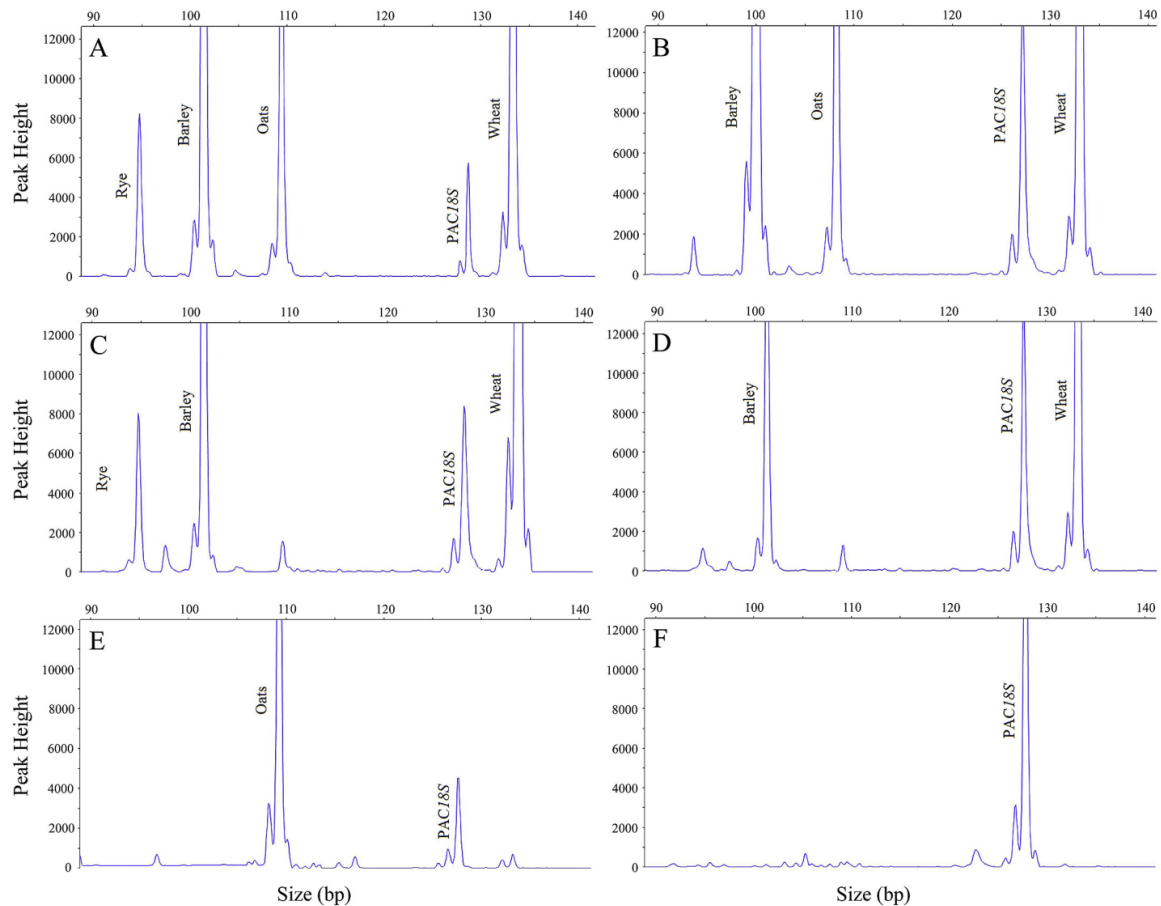


Fig. 2. Electropherograms obtained from the MLPA analysis of different commercial food products. A, B, C, D: products 3, 15, 8 and 12, respectively (Table 3), containing several target cereals. E, F: products 31 and 36, respectively (Table 3), not containing wheat, barley, rye nor oats.

time PCR kits, which are mainly aimed at detection of either the proteins from the gluten fraction or the DNA from the gluten-containing cereals, essentially wheat, barley and rye. However, compared with other molecular techniques, the proposed MLPA technique allows sensitive screening of wheat, barley, rye and oats with a multiplexing capacity that satisfies the challenge of analyzing samples where various targets are usually present. Moreover, the flexibility of the system facilitates to modify the range of such targets, since hybridization probes can be individually added or removed from the MLPA reaction according to the needs.

To the best of our knowledge, this is the first reported application of the MLPA method to the simultaneous detection of cereal species (wheat, barley, rye and oats) in complex foods. The good specificity and sensitivity levels achieved in the MLPA technique suggest its potential suitability as a complementary screening tool to assess compliance with food authenticity and labeling requirements.

Acknowledgments

This work was supported by the Programa de Vigilancia Sanitaria S2013/ABI-2747 of the Comunidad de Madrid (Spain) and by

the project AGL2013-48018-R from the Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO, Spain). Aina García García is recipient of a fellowship from Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain) and Raquel Madrid García from MINECO (Spain). We thank CRF-INIA (Spain) for kindly supplying the cereal reference samples used in this work. We are also grateful to Maribel García Sáez from the Centro de Genómica (Facultad Biología, UCM) for her helpful advice and suggestions.

References

- Álvarez, I., & Wendel, J. F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29, 417–434.
- Alves, R. C., Barroso, M. F., González-García, M. B., Oliveira, M. B. P. P., & Delerue-Matos, C. (2016). New trends in food allergens detection: Toward biosensing strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 2304–2319.
- Barlow, S. M., Boobis, A. R., Bridges, J., Cockburn, A., Dekant, W., Hepburn, P., et al. (2015). The role of hazard- and risk-based approaches in ensuring food safety. *Trends in Food Science and Technology*, 46, 176–188.
- Besler, M. (2001). Determination of allergens in foods. *Trends in Analytical Chemistry*, 20, 662–672.
- Buchanan, R., Dennis, S., Gendel, S., Acheson, D., Assimon, S. A., Beru, N., et al. (2008). Approaches to establish thresholds for major food allergens and for gluten in food. *Journal of Food Protection*, 71, 1043–1088.
- von Büren, M., Stadler, M., & Lüthy, J. (2001). Detection of wheat adulteration of spelt flour and products by PCR. *European Food Research and Technology*, 212,

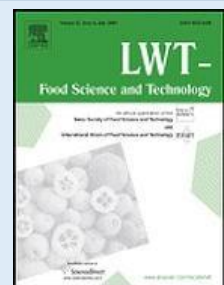
- 234–239.
- Carloni, E., Amagliani, G., Omiccioli, E., Ceppetelli, V., Del Mastro, M., Rotundo, L., et al. (2017). Validation and application of a quantitative real-time PCR assay to detect common wheat adulteration of durum wheat for pasta production. *Food Chemistry*, 224, 86–91.
- Charlebois, S., Schwab, A., Henn, R., & Huck, C. W. (2016). Food fraud: an exploratory study for measuring consumer perception towards mislabeled food products and influence on self-authentication intentions. *Trends in Food Science and Technology*, 50, 211–218.
- Cho, C. Y., Nowatzke, W., Oliver, K., & Garber, E. A. E. (2015). Multiplex detection of food allergens and gluten. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 4195–4206.
- Cucu, T., Devreese, B., Trashin, S., Kerkaert, B., Rogge, M., & De Meulenaer, B. (2012). Detection of hazelnut in foods using ELISA: Challenges related to the detectability in processed foodstuffs. *Journal of AOAC International*, 95, 149–156.
- Curioni, A., Santucci, B., Cristaudo, A., Canistraci, C., Pietravalle, M., Simonato, B., et al. (1999). Urticaria from beer: An immediate hypersensitivity reaction due to a 10-kDa protein derived from barley. *Clinical and Experimental Allergy*, 29, 407–413.
- Dahinden, I., von Büren, M., & Lüthy, J. (2001). A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for celiac patients. *European Food Research and Technology*, 212, 228–233.
- Debnath, J., Martin, A., & Gowda, L. R. (2009). A polymerase chain reaction directed to detect wheat glutenin: Implications for gluten-free labelling. *Food Research International*, 42, 782–787.
- Ehrt, A., Demmel, A., Hupfer, C., Busch, U., & Engel, K. H. (2009). Simultaneous detection of DNA from 10 food allergens by ligation-dependent probe amplification. *Food Additives and Contaminants. Part A*, 26, 409–418.
- Garber, E. A. E., Parker, C. H., Handy, S. M., Cho, C. Y., Panda, R., Samadpour, M., et al. (2016). Presence of undeclared food allergens in cumin: the need for multiplex methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 1202–1211.
- García-Manzanares, A., & Lucendo, A. J. (2011). Review: Nutritional and dietary aspects of celiac disease. *Nutrition in Clinical Practice*, 26, 163–173.
- García-Menaya, J. M., Chiarella, G. M., Cordobés-Durán, C., Mahecha, A. C., & Bobadilla-González, P. (2016). Rye-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 117, 566–568.
- Guertler, P., Goerlich, O., & Busch, U. (2014). Development of a multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) module for simultaneous detection of five genetically modified rapeseed events. *Agricultural Sciences*, 5, 530–539.
- Hernández, M., Esteve, T., & Pla, M. (2005). Real-time polymerase chain reaction based assays for quantitative detection of barley, rice, sunflower, and wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7003–7009.
- Hernando, A., Mujico, J. R., Mena, M. C., Lombardía, M., & Méndez, E. (2008). Measurement of wheat gluten and barley hordeins in contaminated oats from Europe, the United States and Canada by Sandwich R5 ELISA. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 20, 545–554.
- Hirao, T., Watanabe, S., Temmei, Y., & Hiramoto, M. (2009). Qualitative polymerase chain reaction methods for detecting major food allergens (peanut, soybean, and wheat) by using internal transcribed spacer region. *Journal of AOAC International*, 92, 1464–1471.
- Kim, M. J., Cho, S. I., Chae, J. H., Lim, B. C., Lee, J. S., Lee, S. J., et al. (2016). Pitfalls of multiple ligation-dependent probe amplifications in detecting DMD exon deletions or duplications. *Journal of Molecular Diagnostics*, 18, 253–259.
- Köppel, R., van Velsen-Zimmerli, F., & Bucher, T. (2012). Two quantitative hexaplex real-time PCR systems for the detection and quantification of DNA from twelve allergens in food. *European Food Research and Technology*, 235, 843–852.
- Kucek, L. K., Veenstra, L. D., Amnuaycheewa, P., & Sorrells, M. E. (2015). A grounded guide to gluten: How modern genotypes and processing impact wheat sensitivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14, 285–302.
- López-Calleja, I. M., de la Cruz, S., Martín, R., González, I., & García, T. (2015). Duplex real-time PCR method for the detection of sesame (*Sesamum indicum*) and flaxseed (*Linum usitatissimum*) DNA in processed food products. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 32, 1772–1785.
- López-Calleja, I. M., García, A., Madrid, R., García, T., Martín, R., & González, I. (2017). Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for simultaneous detection of DNA from sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy allergenic ingredients in commercial food products. *Food Control*, 71, 301–310.
- Luber, F., Demmel, A., Herbert, D., Hosken, A., Hupfer, C., Huber, I., et al. (2014). Comparative assessment of DNA-based approaches for the quantification of food allergens. *Food Chemistry*, 160, 104–111.
- Martín-Fernández, B., de-los-Santos-Alvarez, N., Lobo-Castañón, M. J., & López-Ruiz, B. (2015). Hairpin-based DNA electrochemical sensor for selective detection of a repetitive and structured target codifying a gliadin fragment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 3481–3488.
- Mayer, F., Haase, I., Graubner, A., Heising, F., Paschke-Kratzin, A., & Fischer, M. (2012). Use of polymorphisms in the γ -gliadin gene of spelt and wheat as a tool for authenticity control. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 1350–1357.
- McKevith, B. (2004). Nutritional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin*, 29, 111–142.
- Mustorp, S. L., Drømtorp, S. M., & Holck, A. L. (2011). Multiplex, quantitative, ligation-dependent probe amplification for determination of allergens in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5231–5239.
- Official Journal of the European Union (OJEU). (2011). Commission regulation 1169/2011/EC of the European parliament and of the council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European parliament and of the council, and repealing commission directive 87/250/EEC, council directive 90/496/EEC, commission directive 1999/10/EC, directive 2000/13/EC of the European parliament and of the council, commission directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and commission regulation (EC) No 608/2004. *The Official Journal of the European Union*, L304, 18–63. URL <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R1169&from=EN>. (Accessed 3 May 2017).
- Official Journal of the European Union (OJEU). (2014). Commission regulation 78/2014/EC of 22 November 2013 amending annexes II and III to regulation (EU) No 1169/2011 of the European parliament and of the council on the provision of food information to consumers, as regards certain cereals causing allergies or intolerances and foods with added phytosterols, phytosterol esters, phytostanols or phytostanol esters. *The Official Journal of the European Union*, L27, 7–8. URL <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0078&from=EN>. (Accessed 3 May 2017).
- Pegels, N., González, I., García, T., & Martín, R. (2015). Authenticity testing of wheat, barley, rye and oats in food and feed market samples by real-time PCR assays. *LWT - Food Science and Technology*, 60, 867–875.
- Pegels, N., González, I., Martín, I., Rojas, M., García, T., & Martín, R. (2011). Applicability assessment of a real-time PCR assay for the specific detection of bovine, ovine and caprine material in feedstuffs. *Food Control*, 22, 1189–1196.
- Poms, R. E., Klein, C. L., & Anklam, E. (2004). Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants*, 21, 1–31.
- Prado, M., Ortea, I., Vial, S., Rivas, J., Calo-Mata, P., & Barros-Velázquez, J. (2015). Advanced DNA- and protein-based methods for the detection and investigation of food allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 2511–2542.
- Prados-Castaño, M., Piñero-Saavedra, M., Leguizamón-Milla, S., Pastor, C., Cuesta, J., & Bartolomé, B. (2016). Anaphylaxis due to oat ingestion. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 26, 68–69.
- Sandberg, M., Lundberg, L., Ferm, M., & Malmheden-Yman, I. (2003). Real time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods. *European Food Research and Technology*, 217, 344–349.
- Sathe, S. K., Teuber, S. S., & Roux, K. H. (2005). Effects of food processing on the stability of food allergens. *Biotechnology Advances*, 23, 423–429.
- Scherf, K. A., Brockow, K., Biedermann, T., Koehler, P., & Wieser, H. (2016). Wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Clinical and Experimental Allergy*, 46, 10–20.
- Schouten, J. P., Mcelgunn, C. J., Waaijer, R., Zwiijnenburg, D., Diepvens, F., & Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, 30, e57.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & John, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 1014–1026.
- Shewry, P. R., & Halford, N. G. (2002). Cereal seed storage proteins: Structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, 53, 947–958.
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2014). Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133, 291–307.
- Terzi, V., Malnati, M., Barbanera, M., Stanca, A. M., & Faccioli, P. (2003). Development of analytical systems based on real-time PCR for *Triticum* species-specific detection and quantification of bread wheat contamination in semolina and pasta. *Journal of Cereal Science*, 38, 87–94.
- Terzi, V., Morcia, C., Gorrini, A., Stanca, A. M., Shewry, P. R., & Faccioli, P. (2005). DNA-based methods for identification and quantification of small grain cereal mixtures and fingerprinting of varieties. *Journal of Cereal Science*, 41, 213–220.
- Theethira, T. G., & Dennis, M. (2015). Celiac disease and the gluten-free diet: consequences and recommendations for improvement. *Digestive Diseases*, 33, 175–182.
- Unterberger, C., Luber, F., Demmel, A., Grünwald, K., Huber, I., Engel, K. H., et al. (2014). Simultaneous detection of allergenic fish, cephalopods and shellfish in food by multiplex ligation-dependent probe amplification. *European Food Research and Technology*, 239, 559–566.
- Ward, R., Crevel, R., Bell, I., Khandke, N., Ramsay, C., & Paine, S. (2010). A vision for allergen management best practice in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 619–625.
- Woolfe, M., & Primrose, S. (2004). Food forensics: Using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology*, 22, 222–226.
- Zeltner, D., Glomb, M. A., & Maede, D. (2009). Real-time PCR systems for the detection of the gluten-containing cereals wheat, spelt, kamut, rye, barley and oat. *European Food Research and Technology*, 228, 321–330.

III. 3. A sensitive and specific real-time PCR targeting DNA from wheat, barley and rye to track gluten contamination in marketed foods

Published article

LWT - Food Science and Technology

Volume 114, art. number 108378 (2019)





Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

A sensitive and specific real-time PCR targeting DNA from wheat, barley and rye to track gluten contamination in marketed foods



Aina García-García, Raquel Madrid, Hamidreza Sohrabi, Silvia de la Cruz, Teresa García, Rosario Martín, Isabel González*

Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Taqman real-time PCR
Gluten-containing cereals
Gluten-related disorders
Commercial food products

ABSTRACT

This work reports a real-time PCR assay to specifically detect the presence of DNA from the main gluten-containing cereals wheat, barley and rye (WBR) in foodstuffs. The WBR real-time PCR uses two specific primers and a Taqman probe for amplification of a 118 bp DNA fragment common to the three target cereals on the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. In-house validation of the method was performed employing three binary arrays containing different concentrations (100 000–10 mg/kg) of a wheat/barley/rye mixture in maize flour: untreated, soft heat-treated at 160 °C/13 min and intense heat-treated at 200 °C/20 min. Results showed optimal PCR amplification efficiency, reproducibility and sensitivity with an overall limit of detection of 10–50 mg/kg of the target cereals, theoretically equating to approximately 1–5 mg/kg of gluten. Applicability of the assay was further assessed through a market analysis of 220 food products by the real-time PCR assay and the official R5-based ELISA. Comparative results highlighted the ability of the proposed methodology as a highly sensitive and robust procedure to detect the presence of potentially harmful concentrations of undeclared gluten-containing cereals in some of the tested samples, supporting results of the immunological assays currently used for gluten determination in foods.

1. Introduction

Despite the worldwide valued beneficial properties of cereals, some of their proteins have been linked to different human pathologies such as celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity (Elli et al., 2015). Celiac disease is the most classic immune-mediated disorder related with gluten ingestion, approximately affecting 1% of the general population (Valenti, Corica, Ricciardi, & Romano, 2017). Mainly prolamins from wheat (gliadin), barley (hordein) and rye (secalin) have been proven to trigger the toxic reaction, whereas inclusion of oats within the gluten-containing cereals group is still a controversial matter (Fric, Gabrovska, & Nevoral, 2011). Even though oats prolamins (avenins) have been thought to be toxic, an increasing number of studies claim that pure oats, not contaminated with other cereals, can be safely consumed by the majority of celiac population (Comino, Moreno, & Sousa, 2015).

Wheat allergy is known as an adverse immunological reaction to gluten and other proteins found in wheat causing typical IgE-mediated reactions such as swelling and itching of the lips and mouth, hives, angioedema, bronchial obstruction, nausea or abdominal pain. On the

other hand, non-celiac gluten sensitivity has been an intriguing and poorly defined entity for decades with symptoms similar to those of celiac disease. It is reported that the population impacted by this pathology may be equal to or even exceeding the number of celiac individuals (Clímaco-Henggeler, Veríssimo, & Ramos, 2017).

To date the only treatment that resolves the symptoms of consumers affected by these disorders is to follow a strict gluten-free diet. In this context, both Codex Alimentarius and European Union Regulation (EU) No. 828/2014, define “gluten-free” foods as those having 20 mg/kg or less of gluten (OJEU, 2014) based on previous studies concluding that celiac patients might tolerate levels under 50 mg per day of gluten (Catassi et al., 2007). Nowadays, the official methods validated for gluten detection in foods are based on enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) and lateral flow devices (Melini & Melini, 2018). The ELISA method using the R5 monoclonal antibody raised against wheat, barley and rye prolamins has been adopted as Type I method by the Codex Alimentarius (Valdés, García, Llorente, & Méndez, 2003). Immunological assays are well-accepted methods to track gluten contamination owing to their easy handling and their availability as high throughput commercial kits at a relatively low price. However,

* Corresponding author.

E-mail address: gonzalzi@ucm.es (I. González).

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108378>

Received 8 February 2019; Received in revised form 8 July 2019; Accepted 11 July 2019

Available online 11 July 2019

0023-6438/ © 2019 Published by Elsevier Ltd.

prolamin content estimation by means of these kits is influenced by several factors (e.g. type of antibody, gluten extraction procedure, lack of reference materials, etc.) which may lead to reproducibility discrepancies when different ELISA kits are compared, as reported by several authors (Bruins-Slot, Bremer, van der Fels-Klerx, & Hamer, 2015; Rzychon et al., 2017). Therefore, although detection of the offending protein is desirable, alternative DNA-based approaches are being increasingly adopted as complementary tools to support the results of the immunological tests (Luber et al., 2014).

To date, a number of PCR-based techniques have been used for the detection of individual allergenic cereals in foods (mainly wheat) based on species-specific nucleotide marker sequences (Mujico, Lombardía, Mena, Méndez, & Albar, 2011; Pegels, González, García, & Martín, 2015; Yamakawa et al., 2007; Zeltner, Glomb, & Maede, 2009). However, real-time PCR methodologies for the detection of the cereal species group triggering gluten-related disorders (wheat, barley and rye) have been less frequently reported (Garrido-Maestu, Azinheiro, Fuciños, Carvalho, & Prado, 2018; Martín-Fernández, Costa, Oliveira, López-Ruiz, & Mafra, 2015; Píknová, Brežná, & Kuchta, 2008), probably due to the high level of polymorphism among the different cereal species.

In the present study a Taqman real-time PCR methodology was developed for the concurrent and specific amplification of DNA from wheat, barley and rye, targeting DNA fragments from the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. The assay was applied for screening of gluten-containing cereals in a wide representation of commercial foods and results were compared to those obtained by the official R5-based ELISA.

2. Materials and methods

2.1. Sample selection

Whole grain kernels from different cereal species were provided by the Spanish National Centre for Plant Genetic Resources (CRF-INIA, Madrid, Spain). These grains were used as reference samples in the

detection of the gluten-containing cereals and included seeds from ten different cultivars of each of the cereal varieties, as well as two cultivars of the hybrid Triticale (Table 1). Ten different cultivars of the three most important gluten-free cereals (oats, maize and rice) were also supplied by CRF-INIA to be included in the specificity assays. Additionally, a wide range of other non-target plant and animal species of commercial importance were purchased in local markets to be studied for specificity purposes (Table 2).

A total of 220 commercial food products were acquired to include a wide representation of products with different characteristics regarding the target cereals. Table 6 includes a brief description of the retail foods, which were classified by product type into separate labelling categories.

2.2. Reference sample preparation

All cereal kernels were firstly individually and finely grounded with an IKA A11 analytical mill (IKA®, Staufen, Germany). Cultivars belonging to the same cereal type were proportionally homogenized to obtain six reference mixtures of grains from common, spelt, rivet and durum wheats, barley and rye. Subsequently, these reference samples were further combined to get a wheat-barley-rye mixture (WBRm) which contains one third of each target cereal. An amount of the obtained WBRm was subjected to two different heat treatments at 160 °C for 13 min and 200 °C for 20 min in a conventional laboratory oven (Heraeus, Thermo Scientific) on disposable baking trays.

Laboratory-scale binary mixtures containing different amounts (100 000, 10 000, 1000, 500, 200, 100, 50 and 10 mg/kg) of the raw and both heat-treated WBR mixtures in a maize flour were prepared to a final weight of 50 g. Maize flour was chosen as the non-target plant-matrix based on the absence of any background signal interference when tested with the WBR real-time PCR system. Experimental mixtures were prepared by thoroughly mixing 5 g of the initial WBRm with 45 g of maize flour for 5 min. This first spiked level was then serial-diluted with the calculated amount of the matrix to obtain the desired subsequent concentration levels.

Table 1 Specificity of the WBR real-time PCR system for the analysis of DNA extracts from the cereal seeds provided by the Spanish National Centre for Plant Genetic Resources (CRF-INIA).

Scientific name (common name)	CRF-INIA codes	ITS WBR.S.S.	18S rRNA P.A.C.
<i>Triticum aestivum vulgare</i> (common wheat)	BGE000050 BGE041862 BGE041874 BGE041879 BGE041885 BGE041889 BGE041899 BGE041906 BGE041919 BGE041992	16.06 ± 0.3 ^a	13.84 ± 0.2
<i>Triticum aestivum spelta</i> (spelt wheat)	BGE001984 BGE002014 BGE012900 BGE012901 BGE012910 BGE012921 BGE012924 BGE039057 BGE043370 BGE043412	15.41 ± 0.2	13.87 ± 0.4
<i>Triticum turgidum turgidum</i> (rivet wheat)	BGE000125 BGE000168 BGE015009 BGE019248 BGE015014 BGE002892 BGE018675 BGE018677 BGE013087 BGE018647	16.04 ± 0.3	14.5 ± 0.4
<i>Triticum turgidum durum</i> (durum wheat)	BGE000082 BGE019249 BGE015015 BGE009989 BGE009990 BGE009991 BGE000098 BGE018601 BGE015385 BGE012331	15.78 ± 0.2	14.30 ± 0.5
<i>Hordeum vulgare</i> (barley)	BGE043058 BGE043072 BGE043075 BGE043076 BGE043093 BGE043127 BGE043162 BGE043167 BGE043215 BGE043232	16.27 ± 0.5	14.01 ± 0.3
<i>Secale cereale</i> (rye)	BGE004778 BGE002511 BGE002514 BGE003155 BGE018416 BGE013872 BGE026938 BGE029095 BGE035474 BGE040250	15.53 ± 0.3	14.44 ± 0.4
<i>x Triticosecale</i> (triticale) ^b	BGE041948 BGE041949	15.81 ± 0.08	14.02 ± 0.02
<i>Avena sativa</i> (oats)	BGE005391 BGE009630 BGE009725 BGE009728 BGE009754 BGE010445 BGE024680 BGE038608 BGE041952 BGE041967	–	13.65 ± 0.3
<i>Oryza sativa</i> (rice)	BGE043929 BGE043930 BGE043931 BGE043932 BGE043938 BGE043940 BGE043944 BGE043945 BGE043949 BGE043957	–	13.55 ± 0.6
<i>Zea mays</i> (maize)	BGE018357 BGE040894 BGE043716 BGE044214 BGE044422 BGE005837 BGE006868 BGE006965 BGE006457 BGE006894	–	13.69 ± 0.6

ITS WBR.S.S.: wheat/barley/rye-specific real-time PCR system on the Internal Transcribed Spacer region.

18S rRNA P.A.C.: positive amplification control real-time PCR system for eukaryotes on the 18S rRNA gene.

Minus sign (–) indicates no positive signal after 35 PCR cycles.

^a Average Cp value ± SD shown for duplicate PCR reactions from each DNA extraction of the different cultivars provided by the CRF-INIA (n = 10, except for triticale samples where n = 2).

^b Hybrid of wheat and rye.

Table 2

List of heterologous plant and animal species which did not yield amplification signal when tested in the WBR real-time PCR specificity assays.

Species		
Cereals and pseudocereals		
Millet (<i>Panicum miliaceum</i>)	Buckwheat (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	Amaranth (<i>Amaranthus</i>)
Chia (<i>Salvia hispanica</i>)	Quinoa (<i>Chenopodium quinoa</i>)	Teff (<i>Eragrostis tef</i>)
Nuts		
Walnut (<i>Juglans regia</i>)	Macadamia (<i>Macadamia intergrifolia</i>)	Cashew nut (<i>Anacardium occidentale</i>)
Almond (<i>Prunus dulcis</i>)	Hazelnut (<i>Corylus avellana</i>)	Peanut (<i>Arachis hypogaea</i>)
Pistachio (<i>Pistacia vera</i>)	Brazil nut (<i>Bertholletia excelsa</i>)	Pecan (<i>Carya illinoensis</i>)
Acorn (<i>Quercus ilex</i>)	Chestnut (<i>Aesculus hippocastanum</i>)	Pine nut (<i>Pinus pinea</i>)
Other plant species		
Sesame (<i>Sesamum indicum</i>)	Flaxseed (<i>Linum usitatissimum</i>)	Soybean (<i>Glycine max</i>)
Poppy seeds (<i>Papaver rhoeas</i>)	Sunflower seeds (<i>Helianthus annuus</i>)	Tiger Nut (<i>Cyperus esculentum</i>)
Green pea (<i>Pisum sativum</i>)	Chickpea (<i>Cicer arietinum</i>)	Lentil (<i>Lens culinaris</i>)
Bean (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Green bean (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Mung bean (<i>Vigna radiata</i>)
Melon (<i>Cucumis melo</i>)	Kiwifruit (<i>Actinidia deliciosa</i>)	Coconut (<i>Cocos nucifera</i>)
Mango (<i>Mangifera indica</i>)	Tangerine (<i>Citrus reticulada</i>)	Orange (<i>Citrus sinensis</i>)
Peach (<i>Prunus persica</i>)	Sour cherry (<i>Prunus cerasus</i>)	Banana (<i>Musa acuminata</i>)
Potato (<i>Solanum tuberosum</i>)	Onion (<i>Allium cepa</i>)	Garlic (<i>Allium sativum</i>)
Eggplant (<i>Solanum melongena</i>)	Asparagus (<i>Asparagus officinalis</i>)	Zucchini (<i>Cucurbita pepo</i>)
Pumpkin (<i>Cucurbita maxima</i>)	Tomato (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Carrot (<i>Daucus sativus</i>)
Olive (<i>Olea europaea</i>)	Green pepper (<i>Capsicum annuum</i>)	Lupine (<i>Lupinus albus</i>)
Cocoa (<i>Theobroma cacao</i>)	Coffee (<i>Coffea arabica</i>)	
Animal species		
Cattle (<i>Bos taurus</i>)	Sheep (<i>Ovis aries</i>)	Goat (<i>Capra hircus</i>)
Swine (<i>Sus scrofa domestica</i>)	Poultry (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	Turkey (<i>Melagris gallopavo</i>)

Table 3

DNA sequences and description of the primers and probes used in this study.

	Length (bp)	Sequence (5' → 3')	Description	Target gene	Amplicon length (bp)
Primers					
WBR-ITSfw	18	ATGCGGCATCTGGTCCCT	wheat/barley/rye-specific forward primer	ITS2	118
WBR-ITSrev	20	CGGATGCACGTGRTTGATAA	wheat/barley/rye-specific reverse primer		
18Sfw	16	TGGTGCAGCAGCCGC	positive control forward primer	18S rRNA	77
18Srev	25	TCCAACACTACGAGCTTTTAACTGCA	positive control reverse primer		
Probes					
WBR-ITSp	19	6FAM-CCGAAGATTGGGCTGCCGG-BBQ	wheat/barley/rye probe	ITS2	
18Sp	22	6FAM-CGCTATTGGAGCTGGAATTACC-BBQ	positive control probe	18S rRNA	

Degenerate nucleotide R = A + G.

2.3. DNA extraction

Genomic DNA was obtained from the samples using the Wizard DNA Clean-up System kit (Promega, Madison, WI, USA) as described by Pegels et al. (2011). Unless otherwise stated, every sample was extracted by duplicate, including a negative control sample in every DNA extraction.

2.4. Oligonucleotide primers and probes

The oligonucleotides used in the real-time PCR assay (Table 3) were designed upon the Internal Transcribed Spacer-2 (ITS2) region sequences from various plant species available in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database. Sequence alignment analysis of the ITS region from common wheat, durum wheat, rye, barley, oats, rice, soy and maize allowed the design of two WBR-specific primers (WBR-ITSfw and WBR-ITSrev) for the amplification of a 118 bp DNA fragment common to wheat, barley and rye. A dual-labelled TaqMan probe (WBR-ITSp) with a reporter fluorophore at the 5'end (6-carboxyfluorescein, FAM) and a quencher fluorophore at the 3'end (Blackberry, BBQ), was designed to anneal within the ITS2 nucleotide fragment generated by amplification of the targets (Fig. 1).

As positive amplification control of the real-time PCR experiments, a pair of universal primers (18Sfw/18Srev) and a TaqMan probe (18Sp) were used, targeting a 77 bp fragment on an eukaryotic conserved

sequence of 18S rRNA gene (Pegels et al., 2011). TaqMan probes were designed and synthesized by TibMolBiol (Berlin, Germany).

2.5. Real-time PCR setup

Real-time PCR was run under generic cycling conditions on the LightCycler 2.0 Instrument (Roche Applied Science, Painsberg, Germany) in a total reaction volume of 10 µL. The optimal concentrations of primers and probe were experimentally determined to obtain the lowest crossing point values (Cp) with the highest fluorescence: 500 nmol/L for both forward and reverse WBR-specific primers and 2.5 pmol of the WBR-TaqMan probe. PCR reactions were carried out using the LightCycler® TaqMan® Master mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and 50 ng of genomic DNA from the purified extracts. The following amplification program was run: initial denaturation of 10 min at 95 °C followed by 40 cycles at 95 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 1 s. Samples were finally cooled down to 40 °C for 30 s. This temperature program was used to amplify, in the same run, the WBR real-time PCR system along with the 18S rRNA system with the following conditions: 300 and 900 nmol/L for 18Sfw and 18Srev, respectively, and 2 pmol of the 18S Taqman probe. Unless otherwise indicated, all real-time PCR reactions were carried out in triplicate for each DNA extraction. Negative and positive PCR controls containing water and WBRm DNA extract respectively, were included in every PCR run.

Table 4
Analysis of DNA dilutions of the individual mixtures of wheat, barley and rye cultivars by WBR real-time PCR system.

pg DNA/reaction	Common wheat (n = 10)	Spelt wheat (n = 10)	Rivet wheat (n = 10)	Durum wheat (n = 10)	Barley (n = 10)	Rye (n = 10)
50 000	15.82 ± 0.07	15.53 ± 0.01	15.74 ± 0.03	15.35 ± 0.03	16.57 ± 0.10	15.41 ± 0.09
5000	19.46 ± 0.09	19.09 ± 0.06	19.29 ± 0.04	19.06 ± 0.03	20.21 ± 0.03	19.17 ± 0.09
500	23.42 ± 0.04	23.18 ± 0.01	23.37 ± 0.06	23.29 ± 0.09	24.05 ± 0.01	23.10 ± 0.07
50	27.66 ± 0.02	28.72 ± 0.03	28.72 ± 0.03	27.59 ± 0.10	28.82 ± 0.01	28.12 ± 0.06
25	29.33 ± 0.01	30.29 ± 0.10	29.98 ± 0.06	29.91 ± 0.05	30.34 ± 0.03	30.43 ± 0.08
10	31.10 ± 0.07	32.31 ± 0.03	32.21 ± 0.08	31.68 ± 0.06	32.37 ± 0.10	32.60 ± 0.10
5	33.17 ± 0.05	34.13 ± 0.18	34.08 ± 0.15	32.22 ± 0.10	33.80 ± 0.10	33.66 ± 0.07
2.5	-	-	-	-	-	-

Minus sign (-) indicates no positive signal after 35 PCR cycles.

Table 5
Trueness and repeatability of the WBR real-time PCR system.

Actual (%) ^a	Untreated mixture			Soft heat-treated mixture			Intense heat-treated mixture		
	Mean predicted (%) ^b	Bias (%)	RSDr (%)	Mean predicted (%) ^b	Bias (%)	RSDr (%)	Mean predicted (%) ^b	Bias (%)	RSDr (%)
0.001	0.0011	9.5	9.1	0.00088	-12.8	1.7	0.0013	26.1	38.8
0.005	0.0054	7.7	4.4	0.0056	11.3	20.7	0.0036	-32.6	6.2
0.01	0.0093	-7.3	5.8	0.0108	7.7	3.0	0.013	26.1	14.0
0.02	0.018	-10.5	6.1	0.019	-5.1	9.1	0.018	-10.5	3.1
0.05	0.044	-12.8	10.9	0.055	9.5	15.1	0.057	13.1	11.4
0.1	0.11	9.5	4.4	0.099	-1.0	10.3	0.11	9.5	7.7
1	1.07	6.8	10.3	0.93	-7.3	8.3	0.97	-3.0	10.6

RSDr: relative repeatability standard deviation.

^a Actual target material content (%) in the reference binary mixture of wheat, barley and rye (WBRm) in maize flour.

^b Estimated content (%) calculated from the average Cp value from triplicate PCR reaction of the DNA extractions.

2.6. Construction of standard curves and statistical data analysis

Preliminary experiments were carried out by analysing serial dilutions of DNA extracts (2.5–50 000 pg of DNA) from each individual cultivar mixture of the target cereal species: wheats (common, spelt, rivet and durum), barley and rye (Table 4).

Subsequently, three standard curves were constructed after analysis of the three arrays of reference binary mixtures containing increasing amounts of WBRm (10–100 000 mg/kg): one untreated and two heat-treated (160 °C/13 min and 200 °C/20 min). There is a well-known semi-logarithmic correlation between the Cp value and the theoretical concentration of the target species in the sample ([]) as described in the equation:

$$Cp = b \cdot \log[] + a$$

where *b* is the slope and *a* is the intercept of the linear curve fitting. Amplification efficiency (*E*) of the reaction was calculated by the following formula (ENGL, 2008):

$$E(\%) = (10^{(-1/b)} - 1) \cdot 100$$

Statistical parameters such as linearity test, accuracy, precision and sensitivity, were evaluated according to previously described methods (Camacho, Torres, Gil, Obregón, & Ruz, 1993). For validation purposes, three separate DNA extractions of each maize-based mixtures were assayed in different days, using three replicates of each sample. The practical limit of detection (LOD) was determined as the lowest WBRm spiked level that could be reliably distinguished from the blank matrix in at least 95% of the replicates. Trueness was estimated by calculating the mean deviation to the true values in term of bias (%). Repeatability was expressed as the relative standard deviation (RSDr) of the results obtained in triplicate assays from three independent experiments to assess the influence of random events (day of analysis, analyst, equipment, etc.) in the data obtained.

2.7. Comparative ELISA analysis

Commercial food products tested by the WBR real-time PCR were also analysed by the official R5 antibody-based ELISA to estimate the amount of gluten in the samples. RIDASCREEN® Gliadin kit (Art. No. R7001) was obtained from R-Biopharm (Darmstadt, Germany) and ELISA assays were performed following the enclosed user manual. The limit of quantification as indicated by the manufacturer was 5 mg/kg of gluten. Cubic spline function was used as calibration curve and gluten results were interpreted using the R-Biopharm software RIDA SOFT Win (Art. No. Z9996).

3. Results and discussion

3.1. Set up of a WBR real-time PCR on the ITS2 region

The primer/probe PCR system developed in the present work was based on the *Internal Transcribed Spacer-2* region and was designed upon published sequences from different plant species. Along the plant genome, this region appears repeated from several hundreds to thousands of times in the intermediate sequences of the three nuclear ribosomal genes (*18S-5.8S-26S*), favouring good DNA recoveries and enhancing PCR sensitivity (López-Calleja, de la Cruz, González, García, & Martín, 2015; Pegels et al., 2015). Considering these premises, a set of primers and a Taqman probe were successfully designed in a conserved region among wheat, barley and rye ITS sequences (Fig. 1).

After *in silico* analysis of the targeted sequences with the BLAST software tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), and due to the close phylogenetic relationship among cereals, possible cross-reactivity of the designed PCR system was experimentally checked against a wide collection of plant and animal species employed for human consumption.

As summarized in Table 1, the WBR real-time PCR system developed positively amplified the expected DNA fragment in the target cereals (common, spelt, durum and rivet wheats, barley and rye, as well as

Table 6
Results of the WBR real-time PCR analysis of 220 commercial products.

	Number of samples analysed	ITS WBR.S.S.	18S rRNA P.A.C.
A) Commercial food products that declared wheat, barley, rye and/or gluten in the labelling			
Nut bar	1	+ (1)	+ (1)
Chocolate	2	+ (2)	+ (2)
Breakfast cereal	4	+ (4)	+ (4)
Bulgur	1	+ (1)	+ (1)
Couscous	1	+ (1)	+ (1)
Soup	1	+ (1)	+ (1)
Meat product	1	+ (1)	+ (1)
Total	11	+ (11)	+ (11)
B) Commercial food products that declared may contain traces of wheat, barley, rye and/or gluten			
Rice cake	6	-(6)	+ (6)
Maize cake	7	-(7)	+ (7)
Pre-cooked meal	6	+ (1)/-(5)	+ (6)
Breakfast cereal	5	+ (2)/-(3)	+ (5)
Snack	4	+ (1)/-(3)	+ (4)
Chocolate	2	-(2)	+ (2)
Spice	2	+ (1)/-(1)	+ (2)
Yogurt	1	-(1)	+ (1)
Seeds	3	+ (1)/-(2)	+ (3)
Meat product	1	-(1)	+ (1)
Tapioca	1	-(1)	+ (1)
Total	38	+ (6)/-(32)	+ (38)
C) Commercial food products that did not declare wheat, barley, rye nor gluten			
Rice cake	1	-(1)	+ (1)
Maize cake	1	-(1)	+ (1)
Pre-cooked meal	8	-(8)	+ (8)
Breakfast cereal	17	+ (14)/-(3)	+ (17)
Nut bar	5	+ (1)/-(4)	+ (5)
Snack	4	-(4)	+ (4)
Chocolate	8	-(8)	+ (8)
Nougat	3	-(3)	+ (3)
Sauce	4	+ (1)/-(3)	+ (4)
Beverage	10	+ (5)/-(5)	+ (10)
Spice	2	+ (2)	+ (2)
Flour	2	-(2)	+ (2)
Seed	3	-(2)	+ (3)
Meat product	1	-(2)	+ (1)
Total	69	+ (23)/-(46)	+ (69)
D) Commercial food products labelled/certified as gluten free			
Rice cake	3	-(3)	+ (3)
Maize cake	3	-(3)	+ (3)
Pre-cooked meal	2	-(2)	+ (2)
Breakfast cereal	9	-(9)	+ (9)
Nut bar	4	+ (4)	+ (4)
Bread	5	-(5)	+ (5)
Biscuit	7	+ (1)/-(6)	+ (7)
Chocolate	1	-(1)	+ (1)
Sauce	4	+ (2)/-(2)	+ (4)
Beverage	8	-(8)	+ (8)
Spice	1	-(1)	+ (1)
Flour	5	+ (2)/-(3)	+ (5)
Pasta	4	+ (2)/-(2)	+ (4)
Meat product	41	-(41)	+ (41)
Soluble coffee	1	-(1)	+ (1)
Baby food	2	-(2)	+ (2)
Quince jelly	2	-(2)	+ (2)
Total	102	+ (11)/-(91)	+ (102)

ITS WBR.S.S.: wheat/barley/rye-specific real-time PCR system on the *Internal Transcribed Spacer* region.

18S rRNA P.A.C.: positive amplification control real-time PCR system for eukaryotes on the *18S rRNA* gene.

Plus sign (+) indicates positive amplification signal before 33 PCR cycles.

Minus sign (-) indicates no positive amplification signal after 33 PCR cycles.

triticale), with no amplification signal when testing the most consumed gluten-free cereals (oats, rice and maize). The *18S rRNA* control system gave a forceful and consistent positive amplification signal in every analysed sample (Table 1). Similar amplification results (data not shown) were obtained for the rest of heterologous species summarized in Table 2, confirming compliance with specificity requirements.

3.2. Analysis of experimental reference binary mixtures: linearity test, amplification efficiency and sensitivity

For a first evaluation of the performance and sensitivity of the WBR real-time PCR, preliminary assays were carried out with serial dilutions (2.5–50 000 pg) of the DNA extracts from each individual cultivar mixture (Table 4). As can be seen in the table, despite the reported copy number variation in the wheat genomic sequences owing to the ploidy level of this plant (Shewry, Halford, & Lafiandra, 2003), a highly homogenous amplification of DNA from all the gluten-containing cereals was obtained. These results highlight the adequacy of the real-time PCR system designed upon the *ITS2* ribosomal region to simultaneously detect the three target cereals with a comparable efficiency and a good sensitivity level (5 pg of DNA per reaction).

Wheat, barley and rye kernels have been reported to yield protein contents ranging from 8 to 15%, of which 80–90% represent gluten proteins (Biesiekierski, 2017). In this study, concentrations of the WBRm in the binary mixtures were selected to include representative low spiked target levels, assuming the content of gluten proteins as an overall of 10% of the cereal weight. Thereby the experimental binary mixtures used for in-house experimental validation could be equated to samples containing theoretical gluten contents of approximately 10 000, 1000, 100, 50, 20, 10, 5 and 1 mg/kg.

Fig. 2 shows the results after fitting a linear model to describe the relationship between the Cp values and the logarithm of WBRm concentration in the three binary mixtures. Linear dynamic range covered the three orders of magnitude of interest with good linear correlations. The Cochran test demonstrated that Cp variances obtained for each WBRm spiked level were homogeneous for a 0.05 significance level. Regression analysis at 99% confidence level showed a statistically significant relationship between both variables (*P-values* < 0.01) and the lack-of-fit tests confirmed linear correlation as the most appropriate model at a confidence level of 95%. The slopes of the linear equation were -3.57 for the untreated mixture, -3.59 for the soft heat-treated mixture and -3.51 for the intense heat-treated mixture, which correspond to amplification efficiencies of 90.6, 90 and 92.6%, respectively. Hence, the real-time PCR assay developed in this work met the minimum acceptance criteria of PCR efficiencies established between 90 and 110% with a linear correlation of $r^2 > 0.98$ for validation purposes in real-time PCR tests (ENGL, 2008).

It is known that cereal seed production (flaking, extrusion, drying, roasting, etc.) involve heat processing treatments which degrade the DNA to a greater or lesser extent, leading to possible temperature-dependent PCR amplification variabilities. As can be observed in Fig. 2, results obtained for samples subjected to the soft heat-treatment (160 °C/13 min) did not differ significantly from those of the untreated mixture. However, a more aggressive heating (200 °C/20 min) do seem to comparably affect PCR detectability of the 118 bp DNA fragment showing a difference of about four Cp values for the same target concentration.

The practical LODs were estimated from the in-house validation results as the minimum level concentration of the reference mixtures that could be reliably distinguished from the non-target flour (Bustin et al., 2009). The assay was able to detect up to 10 mg/kg (0.001%) of the target cereals in the three batches of reference mixtures, yielding Cp values of 31.98 ± 0.11 , 31.52 ± 0.13 and 35.09 ± 0.32 for the untreated, soft and intense heat-treated mixtures, respectively. However, whereas reproducible amplifications were generated for this spiked level in the untreated and soft heat-treated mixtures, the difficulty of the PCR system to consistently amplify such low amount of degraded DNA in the intense heat-treated mixture, led to establish an overall LOD of 10–50 mg/kg of WBR cereals depending on the applied processing treatment. These results suggested that, in the experimental model assayed, the developed real-time PCR method would have the potential to detect the presence of gluten-containing cereals up to a theoretical gluten level of approximately 1–5 mg/kg, broadly satisfying the

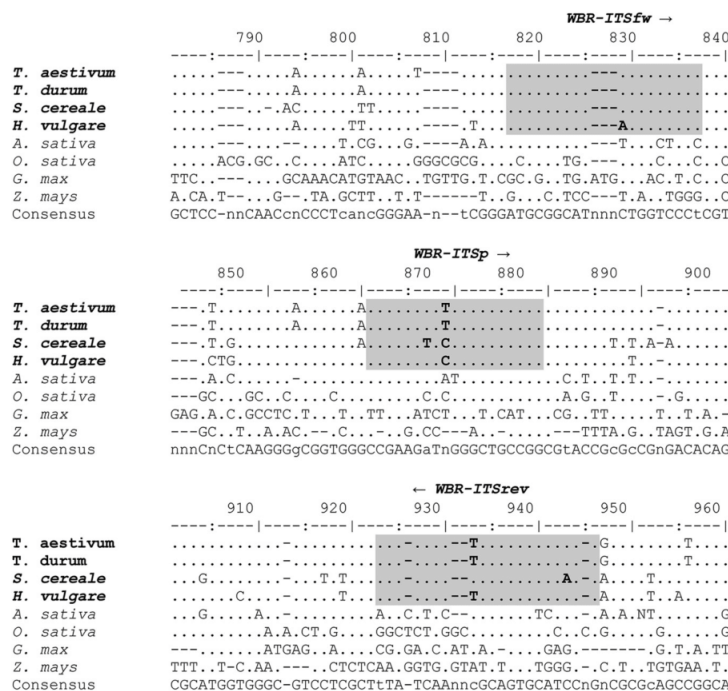


Fig. 1. Deoxyribonucleic acid sequence alignment of the ITS region PCR products from common wheat (*Triticum aestivum vulgare* DQ981410.1), durum wheat (*Triticum turgidum durum* HQ285920.1), rye (*Secale cereale* AF303400.1), barley (*Hordeum vulgare* AJ608147.1), oats (*Avena sativa* AY520821.1), rice (*Oryza sativa* JN402192.1), soy (*Glycine max* FJ609734.1) and maize (*Zea mays* DQ683016.1). Primers WBR-ITSfw and WBR-ITSrev, and probe WBR-ITSsp are highlighted.

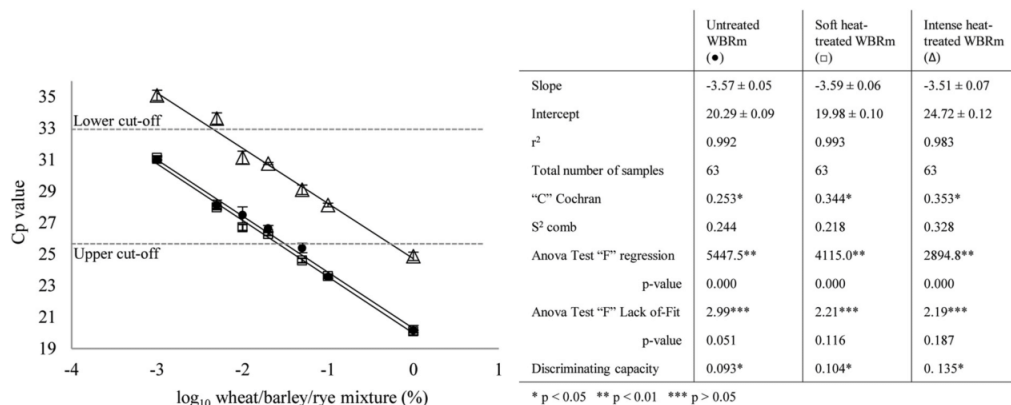


Fig. 2. Crossing point values (Cp) obtained from the analysis of reference wheat/barley/rye binary mixtures (WBRm) plotted versus the logarithm of the target concentrations (0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.02%, 0.05%, 0.1% and 1%) which could be theoretically equated to 1, 5, 10, 20, 50, 100 y 1000 mg/kg of gluten. Error bars indicate the standard deviation and mean value derived from three independent DNA extractions of the untreated (●), soft heat-treated (□) and intense heat-treated binary mixtures (Δ) in maize flour. Right chart summarizes the calculated in-house-validation parameters of the WBR real-time PCR system (linearity test, regression line, and sensitivity).

maximum legislated threshold for dietary residual gluten.

The achieved sensitivity is comparable or superior to that of other real-time PCR methods published for tracing gluten-containing cereals in foods. Garrido-Maestu et al. (2018) and Martín-Fernández et al. (2015) reported detection thresholds of 50 mg/kg of wheat/barley/rye in reference binary mixtures (corn and soy-based), targeting the α2-gliadin sequence. Other works accomplishing simultaneous detection of species, such as the Taqman real-time PCR based on the puroindoline b gene sequences developed by Píknová et al. (2008) reported higher detection limits of 200 mg/kg of the cereal species.

3.3. Trueness and repeatability

Each target percentage was analysed in triplicate and the mean Cp value obtained was interpolated in the previously obtained standard curves to estimate the target content (Table 5). According to the ENGL document, trueness should range from -25% to 25% and RSDr values should be ≤ 25%, criteria which is fulfilled in all the tested mixtures except for the 10 mg/kg level of the reference mixture exposed to 200 °C/20 min.

Results obtained suggested that the proposed real-time PCR method could be used to detect and estimate low amounts of gluten-containing

cereals in a binary model subjected to a well-known specific treatment. However, when applied to real commercial foods, the assay should be accurately optimized for each particular product, which means taking into account all the factors that might affect DNA target amplification including matrix composition, presence of PCR inhibitors and processing treatments applied, among others. This observation is in agreement with previous works addressing the unfeasibility of PCR-based methodologies for quantitative DNA measurements in real food products (López-Calleja et al., 2015; Pegels et al., 2015).

3.4. Retail sample analysis by the WBR real-time PCR

Based on the linear operating range of the assay (Fig. 2), an empirical assay threshold value was firstly established for a qualitative sorting of the retail foods in terms of positive or negative detection of the targets (Caraguel, Stryhn, Gagné, Dohoo, & Hammell, 2011). For this purpose, a lower cut-off (Cp of 33) was set based upon the Cp values obtained from the lowest WBR concentration (0.005%) that was reliably detected in the binary mixture subjected to the most intense heat-treatment, content which could be theoretically equated to 5 mg/kg of gluten. As shown in the figure, despite Cp values were still registered for samples with lower target DNA concentrations (e.g. intense heat-treated 0.001% spiked level), amplification Cps above the established lower threshold were not considered reproducible and were thus assigned to samples yielding a PCR-negative result.

Among commercial food samples producing a positive detection signal (Cp \leq 33), those presumably exceeding 20 mg/kg should be considered as potentially harmful to sensitive consumers. In this context, an upper threshold was set for classifying such "non-compliant" samples, in this case based on the standard curves showing the higher real-time PCR detectability (untreated and soft-heat treated). This upper cut-off was set as Cp 26 (Fig. 2) so, products yielding Cp values below this limit might be surpassing the established safety limit of 20 mg/kg of gluten (0.02% of the target cereals). Finally, food samples yielding amplification Cp values between both set thresholds (33 and 26) would be considered as positively detected by the real-time PCR, although their estimated wheat/barley/rye concentration would depend upon the nature, characteristics and processing of each particular sample.

As shown in Table 6, the WBR real-time PCR system successfully detected the presence of the offending target cereals in the 11 analysed retail foods from category A (declaring to contain the target cereals), highlighting the ability of the method to detect the presence of the gluten-containing cereals even in particularly complex food matrices such as chocolates.

Whenever food industries cannot guarantee the absence of a harmful ingredient belonging to the list of notifiable allergens, a precautionary labelling might be voluntarily adopted to warn sensitive consumers. Of the 38 analysed samples fitting in this category (Table 6B), only six (15.8%) showed Cp values below the established threshold (Cp 33) to consider a sample as positively detected. In agreement with other studies (García-García, Madrid, García, Martín, & González, 2018; Pegels et al., 2015), these results revealed that only a low percentage of the analysed samples bearing precautionary labelling contain in fact the harmful ingredient, causing unnecessary restrictions on food choice of sensitive individuals.

The analysis of products which did not declare wheat, barley, rye nor gluten (Table 6C) suggested that 67% (46 of 69) of the samples were correctly labelled since no PCR amplification was detected in any of them. However, still a high proportion (33% of samples) produced a positive signal in the WBR real-time PCR assay. It bears mentioning that 24 of the 69 selected products from this category declared oats in their composition without showing explicit label indications about the presence or absence of gluten. In this regard, 19 of these oats-containing samples (79%) generated positive amplifications in the WBR real-time PCR assay, reflecting a high proportion of oats-based products showing

wheat, barley and/or rye contamination. This circumstance may be attributed to cross-contact events during growing, harvesting and processing of cereal kernels and has prompted the inclusion of oats within the mandatory allergens in European Regulations. However, the reported high tolerance of celiac patients to oats prolamins (nearly 80% of the celiac population) (Comino et al., 2015; Fric et al., 2011), together with the fact that official immunological methods for the quantification of gluten are based on the detection of prolamins from wheat, barley and rye species (excluding oats), justifies the need for sensitive methodologies, like the real-time PCR described in this work, that selectively detect these three main gluten-containing cereals.

As can be seen in Table 6D, of the 102 samples from the gluten-free category, 10.8% generated positive PCR amplifications. The remaining 91 samples (including two belonging to a particular gluten-free certification for oats-based products), did not produce any amplification signal, thus suggesting their suitability for consumption by sensitive individuals.

For every analysed product, the 18S rRNA system revealed the presence of amplifiable DNA corroborating the effectiveness of the DNA extraction procedure and the absence of false-negative results derived from PCR-inhibition. Besides, negative controls run in every assay excluded the possibility of sample contamination during experimental manipulation. It should be stressed that the broad field work performed with 220 retail foodstuffs to evaluate the applicability of the WBR real-time PCR assay, adds a significant value when compared to other studies using only laboratory-scale samples and/or a low representation of commercial foods (Garrido-Maestu et al., 2018; Martín-Fernández et al., 2015).

3.5. Comparative analysis of retail samples by PCR and ELISA

Since PCR instrumentation has recently become affordable for routine laboratories, PCR-based techniques are increasingly being adopted by governments and food industries as official methodologies applied to verify food labelling and traceability requirements (e.g. detection of processed animal proteins in feeds, detection of genetically modified organisms or horse meat and fish species authentication). However, despite the proven advantages of PCR-based methods, some limitations exist when intended for the indirect detection of gluten. This may be the case of challenging samples such as wheat starch-based foods where gluten proteins may be absent, or highly hydrolysed products (beer, syrups and malt extracts) where degraded DNA may be undetectable (Mujico et al., 2011). In these circumstances, immunological or mass-spectrometry-based analysis should be complementarily performed to avoid possible misinterpretation of the PCR results. Considering this, commercial food products were analysed with the official R5-based immunoassay to support and validate real-time PCR results.

Table 7 illustrates the Cp values of the PCR-positive foods (categories A, B, C, D) together with the gluten levels estimated by the R5-based ELISA. As can be seen, immunological results clearly corroborated the presence of gluten in all the tested samples from category A, with levels surpassing the highest calibration point of the standard curve (80 mg/kg). In the case of PCR-positive products from categories B, C and D, most of them were successfully detected by the ELISA assay. However, as can be deduced from the table, a direct relationship or equivalence between the Cp values and the gluten content could not be established. This result is in agreement with other works reporting the impossibility to set up a correlation between the amount of DNA and protein content in foods tested respectively by real-time PCR and ELISA, attributable to the different features and processing conditions of each particular sample (Köppel et al., 2010; Mujico et al., 2011).

As can be seen in Table 7, eleven of the samples from groups B, C and D were positively detected by the real-time PCR (Cp values ranging from 27.8 to 32.2), but generated absorbance values below the LOQ of the ELISA immunoassay. This mismatched result could be explained by

Table 7
Comparative analysis of food retail samples by the WBR-specific PCR system and the R5-based ELISA.

Commercial food product	Cp value ITS WBR.S.S.	Gluten content (mg/kg)
<i>A) Commercial food products that declared wheat, barley, rye and/or gluten in the labelling</i>		
Pre-cooked meal-1	25.10 ± 0.09	> 80
Pre-cooked meal-2	15.25 ± 0.07	> 80
Pre-cooked meal-3	19.62 ± 0.04	> 80
Breakfast cereal-1	21.88 ± 0.01	> 80
Breakfast cereal-2	25.67 ± 0.06	> 80
Breakfast cereal-3	25.51 ± 0.01	> 80
Breakfast cereal-4	19.67 ± 0.07	> 80
Breakfast cereal-5	17.3 ± 0.1	> 80
Meat-product-1	28.88 ± 0.02	> 80
Chocolate-1	18.05 ± 0.02	> 80
Chocolate-2	19.3 ± 0.1	> 80
<i>B) Commercial food products that declared may contain traces of wheat, barley, rye and/or gluten</i>		
Pre-cooked meal-1	27.81 ± 0.08	< LOQ
Breakfast cereal-1	26.94 ± 0.08	37.7 ± 1.7
Breakfast cereal-2	30.05 ± 0.09	13.1 ± 0.2
Snack-1	25.70 ± 0.07	> 80
Spice-1	30.2 ± 0.1	< LOQ
Seeds-1	31.3 ± 0.1	13.5 ± 0.3
<i>C) Commercial food products that did not declare wheat, barley, rye nor gluten</i>		
Breakfast cereal-1 ^a	29.12 ± 0.01	> 80
Breakfast cereal-2 ^a	25.96 ± 0.04	28.4 ± 1.3
Breakfast cereal-3	32.0 ± 0.4	< LOQ
Breakfast cereal-4 ^a	23.02 ± 0.04	> 80
Breakfast cereal-5 ^a	25.80 ± 0.07	45.3 ± 0.8
Breakfast cereal-6 ^a	29.54 ± 0.03	> 80
Breakfast cereal-7 ^a	24.56 ± 0.01	42.5 ± 0.5
Breakfast cereal-8 ^a	27.5 ± 0.4	> 80
Breakfast cereal-9 ^a	25.49 ± 0.08	> 80
Breakfast cereal-10 ^a	26.70 ± 0.05	63.2 ± 1.8
Breakfast cereal-11 ^a	28.82 ± 0.05	> 80
Breakfast cereal-12 ^a	31.1 ± 0.4	20.7 ± 1.5
Breakfast cereal-13 ^a	31.6 ± 0.3	40.4 ± 2.3
Breakfast cereal-14 ^a	27.89 ± 0.04	77.2 ± 3.0
Nut bar-1 ^a	26.7 ± 0.4	65.9 ± 2.8
Sauce-1	29.7 ± 0.9	< LOQ
Beverage-1 ^a	31.7 ± 0.5	10.0 ± 0.3
Beverage-2 ^a	28.75 ± 0.05	10.2 ± 0.6
Beverage-3 ^a	26.65 ± 0.06	15.6 ± 0.7
Beverage-4 ^a	27.75 ± 0.08	16.6 ± 0.9
Beverage-5 ^a	29.4 ± 0.2	13.0 ± 0.3
Spice-1	31.90 ± 0.01	< LOQ
Spice-2	29.5 ± 0.4	< LOQ
<i>D) Commercial food products labelled/certified as gluten free</i>		
Nut bar-1	30.6 ± 0.5	12.7 ± 1.4
Nut bar-2	29.05 ± 0.05	15.6 ± 0.8
Nut bar-3	29.86 ± 0.08	30.4 ± 1.5
Nut bar-4	31.3 ± 0.1	13.2 ± 1.3
Biscuit-1	32.10 ± 0.05	< LOQ
Sauce-1	32.2 ± 0.8	< LOQ
Sauce-2	30.2 ± 0.1	< LOQ
Flour-1	32.0 ± 0.8	< LOQ
Flour-2	30.70 ± 0.06	< LOQ
Pasta-1	31.7 ± 0.9	10.3 ± 1.1
Pasta-2	31.6 ± 0.4	8.2 ± 0.9

ITS WBR.S.S.: wheat/barley/rye-specific real-time PCR system. Results of R5-based ELISA are expressed as gluten content (mg/kg): < LOQ means gluten content below the limit of quantification of 5 mg/kg and > 80 means absorbance values exceeding the highest calibration point of the standard curve (80 mg/kg). Every sample was analysed in duplicate.

^a Products made out of or containing oats which do not explicitly indicate the presence or absence of gluten in their labelling.

the lower real-time PCR sensitivity (10 mg/kg of cereal, theoretically equating to 1 mg/kg of gluten) compared to that of ELISA (5 mg/kg of gluten) when foods lacking intensive processing treatments are to be tested. Besides, the presence in these samples of amplifiable DNA from wheat starch, which would not be detected in ELISA assays, cannot be either discarded.

Regardless unavoidable discrepancies among both techniques, it should be remarked that all the PCR-positive samples yielding Cp values below the upper threshold of 26 were systematically detected by the R5-based ELISA assay to contain gluten levels above the 20 mg/kg limit (Table 7). Likewise, the 169 retail foods that were classified as PCR-negative by means of the upper Cp threshold of 33 generated absorbance values below the LOQ of the ELISA assay (results not shown).

In light of these results, the implementation of the proposed real-time PCR as a complementary method to the more traditional protein-based assays used for gluten determination in foods would be based on the qualitative assumption that samples yielding Cp values below 26 would comprise potentially harmful levels of gluten-containing cereals for sensitive population. Besides, Cp values above the lower set cut-off (Cps > 33) would correspond to negative samples for the presence of wheat, barley and rye DNA, allowing to classify these samples as gluten-free. The rest of the food samples (Cp values from 33 to 26) would be considered as positively detected by the real-time PCR, although their estimated wheat/barley/rye concentration would depend upon the nature, characteristics and processing of each particular sample.

It should be borne in mind that quantification of gluten in foods poses a significant challenge regardless of the analytical basis of the selected method. For both, protein- and DNA-based techniques, some degree of measurement uncertainty and discrepancy will always persist due to a number of factors (gluten or DNA extraction procedures, sample processing conditions, lack of reference materials, etc.). Therefore, it is difficult to select an individual method that combines all advantages for affordable, robust, and unequivocal detection and quantification of the relevant allergenic components (Holzhauser, 2018). In conclusion, the WBR real-time PCR methodology developed herein may be used as a valuable complementary option to support results of the immunological assays currently used to track gluten contamination in foods.

Acknowledgments

CRF-INIA (Spain) kindly supplied the cereal reference samples. This work was supported by Comunidad de Madrid (Consejería de Educación P2018/BAA-4574) and Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO, Spain) through the project AGL2017-84316-R. Aina García-García and Silvia de la Cruz are recipients of a fellowship from Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Spain) and Raquel Madrid is recipient of a fellowship from MINECO.

References

Biesiekierski, J. R. (2017). What is gluten? *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 32(1), 78–81. <https://doi.org/10.1111/jgh.13703>.

Bruins-Slot, I. D., Bremer, M. G. E. G., van der Fels-Klerx, I., & Hamer, R. J. (2015). Evaluating the performance of gluten ELISA test kits: The numbers do not tell the tale. *Cereal Chemistry*, 92(5), 513–521. <https://doi.org/10.1094/CHEM-07-14-0166-R>.

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., et al. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.

Camacho, M. A., Torres, A. L., Gil, M. E., Obregón, M. M., & Ruz, V. (1993). Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. *STP Pharma Pratiques*, 3(3), 197–202.

Caraguel, C. G. B., Stryhn, H., Gagné, N., Dohoo, I. R., & Hammell, K. L. (2011). Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: Analytical and epidemiologic approaches. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(1), 2–15. <https://doi.org/10.1177/104063871102300102>.

Catassi, C., Fabiani, E., Iacono, G., D'Agate, C., Francavilla, R., et al. (2007). A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85(1), 160–166. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.1.160>.

Clímaco-Henggeler, J., Veríssimo, M., & Ramos, F. (2017). Non-coeliac gluten sensitivity: A review of the literature. *Trends in Food Science & Technology*, 66, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.018>.

Comino, I., Moreno, M. D. L., & Sousa, C. (2015). Role of oats in celiac disease. *World Journal of Gastroenterology*, 21(41), 11825–11831. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i41.11825>.

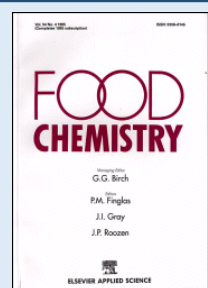
Elli, L., Branchi, F., Tomba, C., Villalta, D., Norsa, L., et al. (2015). Diagnosis of gluten

- related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. *World Journal of Gastroenterology*, 21(23), 7110–7119. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i23.7110>.
- European Network of GMO Laboratories (ENGL) (2008). *Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing*. Brussels, Belgium: European Commission. <https://doi.org/10.2788/65827>.
- Fric, P., Gabrovská, D., & Nevořal, J. (2011). Celiac disease, gluten-free diet, and oats. *Nutrition Reviews*, 69(2), 107–115. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00368.x>.
- García-García, A., Madrid, R., García, T., Martín, R., & González, I. (2018). Use of multiple ligation-dependent probe amplification (MLPA) for screening of wheat, barley, rye and oats in foods. *Food Control*, 84, 268–277. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.037>.
- Garrido-Maestu, A., Azinheiro, S., Fuciños, P., Carvalho, J., & Prado, M. (2018). Highly sensitive detection of gluten-containing cereals in food samples by real-time Loop-mediated isothermal AMPLification (qLAMP) and real-time polymerase chain reaction (qPCR). *Food Chemistry*, 246, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.005>.
- Holzhauser, T. (2018). Protein or no protein? Opportunities for DNA-based detection of allergenic foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(38), 9889–9894. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03657>.
- Köppel, R., Dvorak, V., Zimmerli, F., Breitenmoser, A., Eugster, A., & Waiblinger, H. U. (2010). Two tetraplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from eight allergens in food. *European Food Research and Technology*, 230, 367–374. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1164-3>.
- López-Calleja, I. M., de la Cruz, S., González, I., García, T., & Martín, R. (2015). Market analysis of food products for detection of allergenic walnut (*Juglans regia*) and pecan (*Carya illinoensis*) by real-time PCR. *Food Chemistry*, 177, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.017>.
- Luber, F., Demmel, A., Herbert, D., Hosken, A., Hupfer, C., et al. (2014). Comparative assessment of DNA-based approaches for the quantification of food allergens. *Food Chemistry*, 160, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.077>.
- Martín-Fernández, B., Costa, J., Oliveira, M. B. P. P., López-Ruiz, B., & Mafra, I. (2015). Screening new gene markers for gluten detection in foods. *Food Control*, 56, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.047>.
- Melini, F., & Melini, V. (2018). Immunological methods in gluten risk analysis: A snapshot. *Safety*, 4(4), 56. <https://doi.org/10.3390/safety4040056>.
- Mujico, J. R., Lombardía, M., Mena, M. C., Méndez, E., & Albar, J. P. (2011). A highly sensitive real-time PCR system for quantification of wheat contamination in gluten-free food for celiac patients. *Food Chemistry*, 128, 795–801. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.061>.
- Official Journal of the European Union (OJEU) (2014). Commission Implementing Regulation 828/2014 of 30 July 2014 on the requirements for the provision of information to consumers on the absence or reduced presence of gluten in food. *The Official Journal of the European Union*, L228, 5–8. URL <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0828&from=ES>, Accessed date: 8 February 2019.
- Pegels, N., González, I., García, T., & Martín, R. (2015). Authenticity testing of wheat, barley, rye and oats in food and feed market samples by real-time PCR assays. *LWT - Food Science and Technology*, 60, 867–875. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.049>.
- Pegels, N., González, I., Martín, I., Rojas, M., García, T., & Martín, R. (2011). Applicability assessment of a real-time PCR assay for the specific detection of bovine, ovine and caprine material in feedstuffs. *Food Control*, 22, 1189–1196. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.01.015>.
- Piknová, L., Brežná, B., & Kuchta, T. (2008). Detection of gluten-containing cereals in food by 5'-nuclease real-time polymerase chain reaction. *Journal of Food and Nutrition Research*, 47(3), 114–119.
- Rzychon, M., Brohée, M., Cordeiro, F., Haraszi, R., Ulberth, F., & O'Connor, G. (2017). The feasibility of harmonizing gluten ELISA measurements. *Food Chemistry*, 234, 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.092>.
- Shewry, P. R., Halford, N. G., & Lafiandra, D. (2003). Genetics of wheat gluten proteins. *Advances in Genetics*, 49, 111–184. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(03\)01003-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(03)01003-4).
- Valdés, I., García, E., Llorente, M., & Méndez, E. (2003). Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 15(5), 465–474. <https://doi.org/10.1097/01.meg.0000059119.41030.df>.
- Valenti, S., Corica, D., Ricciardi, L., & Romano, C. (2017). Gluten-related disorders: Certainties, questions and doubts. *Annals of Medicine*, 49(7), 569–581. <https://doi.org/10.1080/07853890.2017.1325968>.
- Yamakawa, H., Akiyama, H., Endo, Y., Miyatake, K., Sakata, K., et al. (2007). Specific detection of wheat residues in processed foods by polymerase chain reaction. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(10), 2561–2564. <https://doi.org/10.1271/bbb.70251>.
- Zeltner, D., Glomb, M. A., & Maeda, D. (2009). Real-time PCR systems for the detection of the gluten-containing cereals wheat, spelt, kamut, rye, barley and oat. *European Food Research and Technology*, 228, 321–330. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0937-4>.

III. 4. A novel approach to produce phage antibody fragments (dAbs) for the detection of gluten in foods

Submitted article

Food Chemistry



A novel approach to produce phage antibody fragments (dAbs) for the detection of gluten in foods.

Aina García-García, Raquel Madrid, Isabel González, Teresa García and Rosario Martín*.

Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

Abstract

In this study, we demonstrated the feasibility of isolating recombinant phage-antibodies against gluten from a non-immunized library of human single-domain antibodies (dAb). Phage display technology enabled the selection of affinity probes by successive rounds of biopanning against a biotinylated synthetic peptide comprising repetitive immunogenic gluten motifs. The analysis of a wide representation of heterologous plant species corroborated that two of the isolated clones were specific to wheat, barley and rye proteins. The phage antibody selected as the most appropriate clone for the detection of gluten in foods (dAb8E-phage) was further applied in an indirect ELISA to the analysis of 50 commercial food samples. Although the limit of detection achieved did not improve those of current immunoassays, the proposed methodology could provide new promising pathways for the generation of recombinant antibodies which allow a comprehensive determination of gluten in foods, whilst replacing the need for animal immunization.

Keywords

Gluten; celiac disease; phage display; single-domain antibody; antibody discovery; ELISA; allergen labelling

1. Introduction

Gluten is the general name used to describe a highly complex mixture of storage proteins mainly found in wheat, barley, rye and their hybridized strains (e.g. triticale, a cross between wheat and rye) (Biesiekierski, 2017; Kucek, Veenstra, Amnuaycheewa, & Sorrells, 2015). Several human pathologies have been linked with the consumption of gluten-containing cereals, such as celiac disease, one of the most

common chronic gastrointestinal disorders that approximately affects 1% of the general population (Koehler, Wieser, & Konitzer, 2014; Lionetti, Gatti, Pulvirenti, & Catassi, 2015). Mainly gliadins, hordeins and secalins, the prolamins from wheat, barley and rye, respectively, have been linked to trigger the toxic reaction, whereas, the role of avenins (prolamins from oats) is still a controversial matter (Comino, Moreno, & Sousa, 2015). Nowadays, specific cultivars of oats grown under

III. 5. Production of genetic constructs for generation of luminescent and fluorescent single-domain antibodies against gluten in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*

Article under preparation

Production of genetic constructs for generation of luminescent and fluorescent single-domain antibodies against gluten in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.

Aina García-García^a, Raquel Madrid^a, Isabel González^a, Marcos Alcocer^b, Rosario Martín^a and Teresa García^a.

^a Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

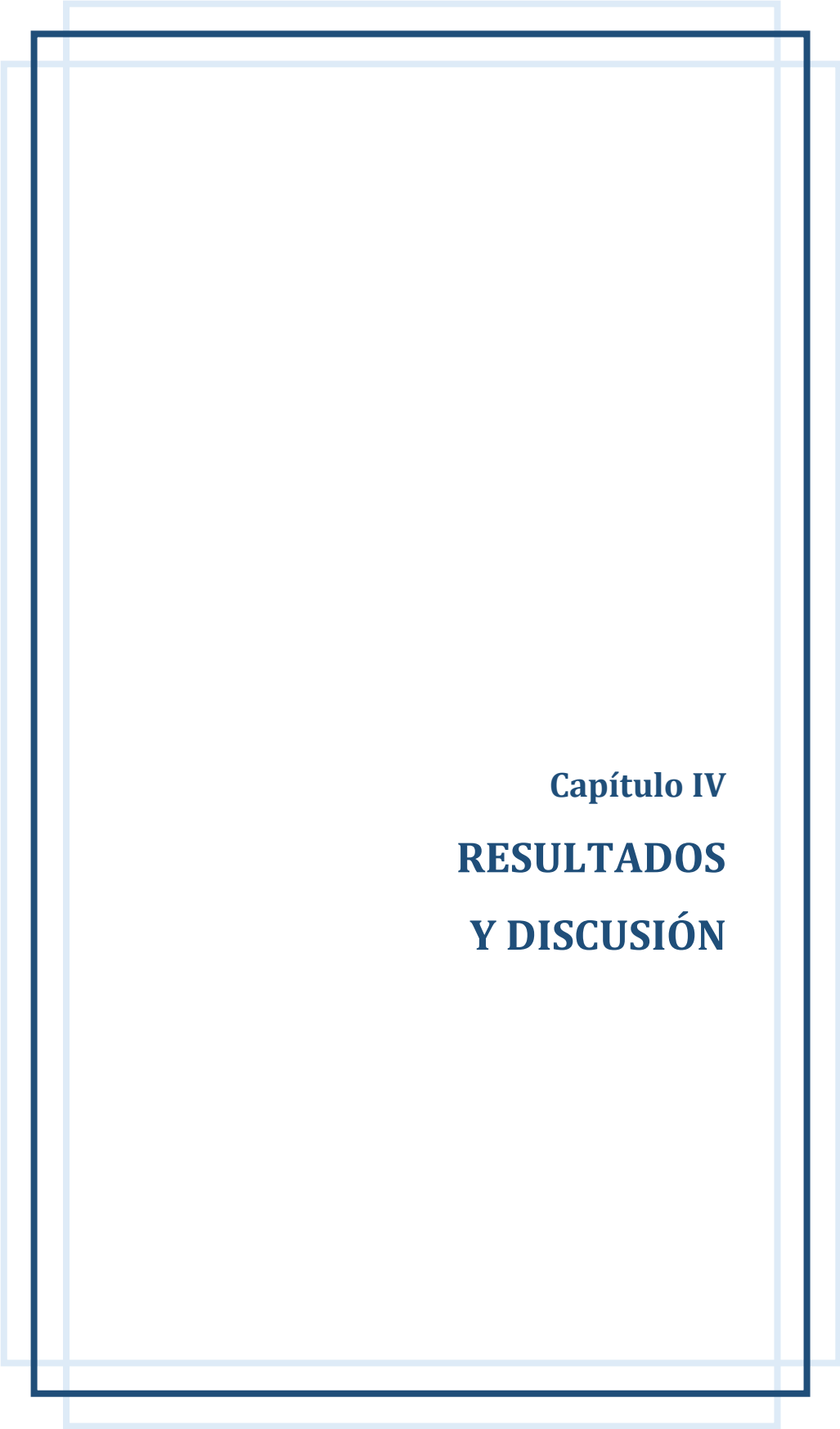
^b School of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough LE12 5RD, United Kingdom.

1. Introduction

Adverse reactions to food, which affect a significant percentage of the world population, have become a major economic concern because they are responsible for a significant number of hospitalizations and food recalls. Specifically, the ingestion of gluten-containing cereals can trigger an array of different conditions, collectively designated as “gluten-related disorders”, that include different autoimmune disorders (i.e. coeliac disease, dermatitis herpetiformis and gluten ataxia), wheat allergy and the controversial non-coeliac gluten sensitivity (NCGS) (Elli et al., 2015; Sapone et al., 2012). In all cases, the only effective treatment for patients suffering from these pathologies is the complete withdrawal of gluten from the diet. Therefore, the development of methods that allow detection and quantitative determination of gluten has gained importance in the last decades (Al-Bawardy et al., 2017; Melini & Melini, 2018).

Enzyme-linked immune-sorbent assay (ELISA) is the technique mostly used for routine analysis of allergens in foods for its high sensitivity and ability to process a large number of samples at a

time (EFSA, 2014; Poms, Klein, & Anklam, 2004). Nevertheless, ELISA procedures can be tedious, time-consuming, and produce unexpected cross-reactions if the employed antibody is not fully characterized (e.g. polyclonal antibodies). Most of these disadvantages might be overcome as a result of the significant progress made in the generation of monoclonal antibodies (mAbs) and molecular engineering techniques (Ledsgaard, Kilstrup, Karatt-Vellatt, McCafferty, & Laustsen, 2018; Morino et al., 2001). In these sense, antibody fragments are widely accepted as a valuable tool in modern immunological determination since they provide small and highly specific reagents against the target antigen (Saerens, Huang, Bonroy, & Muyldermans, 2008). Furthermore, their fusion to fluorescent or bioluminescent proteins offers an interesting alternative for the development of new biosensing devices and fluorescence-linked immune-sorbent assays (FLISA) which do not require the binding of secondary antibodies and enzyme reactions (Sakamoto et al., 2010; Yang et al., 2014). These labelled antibodies can be obtained by chemical conjugation with organic fluorescent dyes, such as FITC, CY-3 or CY-5. However, this approach has several disadvantages such as the requirement of



Capítulo IV
RESULTADOS
Y DISCUSIÓN

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha consistido en el empleo de metodologías, genéticas e inmunológicas, para la detección de diferentes especies vegetales con potencial alergénico en los alimentos. Con relación a las técnicas genéticas, se han desarrollado en primer lugar sistemas de amplificación dependiente de ligasa de múltiples sondas (MLPA) para la detección simultánea de especies como el girasol, amapola, lino, sésamo, soja y cereales de declaración obligatoria (trigo, cebada, centeno y avena). Por otra parte, debido al aumento en la incidencia de patologías asociadas al consumo de cereales con gluten, y a la creciente tendencia a evitar la inclusión de este componente en la dieta, también se ha desarrollado una técnica de PCR en tiempo real para la detección conjunta de ADN procedente de las tres principales especies de cereales con gluten (trigo, cebada y centeno).

Con relación a las técnicas inmunológicas, y en el contexto de la importancia del análisis y trazabilidad del gluten en alimentos, en este trabajo se ha llevado a cabo una nueva estrategia de obtención de anticuerpos monoclonales de dominio único (dAb) para la detección de esta proteína a partir de una genoteca sintética de fago-anticuerpos recombinantes. Este método de selección de anticuerpos permitirá el uso posterior de técnicas de ingeniería genética que introducen modificaciones funcionales en la secuencia nucleotídica codificante de los anticuerpos para mejorar su aplicabilidad en diferentes estrategias analíticas para la detección de gluten en alimentos.

Para cumplir los objetivos mencionados, ha sido necesaria la consecución de los siguientes objetivos parciales:

1. Empleo de técnicas de amplificación dependiente de ligasa de múltiples sondas (MLPA) para la detección de ingredientes alergénicos de origen vegetal en alimentos:
 - a. Sistema de MLPA para la detección simultánea de ADN procedente de girasol, amapola, lino, sésamo y soja en alimentos (sistema MLPA de semillas).
 - b. Sistema de MLPA para la detección simultánea de ADN procedente de trigo, cebada, centeno y avena en alimentos (sistema MLPA de cereales).
2. Empleo de técnicas de PCR en tiempo real con sondas fluorescentes Taqman® para la detección conjunta de cereales con gluten (trigo, cebada y centeno) en alimentos.
3. Selección de anticuerpos monoclonales de dominio único mediante la tecnología de *phage display* para la detección de gluten en alimentos a partir del enriquecimiento por afinidad frente a un péptido sintético de una genoteca *naïve* de fago-anticuerpos recombinantes.

4. Obtención de vectores de expresión para modificar funcionalmente los anticuerpos recombinantes obtenidos frente al gluten mediante su fusión a proteínas con propiedades luminiscentes y la posterior producción empleando la levadura *Pichia pastoris*.

A continuación se resumen y valoran los principales resultados obtenidos en la consecución de los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral.

IV. 1. EMPLEO DE TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DEPENDIENTE DE LIGASA DE MÚLTIPLES SONDAS (MLPA) PARA LA DETECCIÓN DE INGREDIENTES ALERGÉNICOS DE ORIGEN VEGETAL EN ALIMENTOS

Uno de los grandes retos en el análisis de alérgenos radica en la necesidad de detectar bajas concentraciones de un determinado ingrediente en el alimento. Además, es frecuente que un producto alimenticio pueda contener más de un componente o ingrediente que cause alergias o intolerancias alimentarias. Este hecho hace que los ensayos de detección de una única diana puedan ser, a veces, insuficientes desde un punto de vista práctico. Por este motivo, cada vez se está impulsando más el desarrollo de metodologías analíticas que ofrezcan la posibilidad de detectar, de forma rápida y específica, varias dianas a la vez. Entre ellas, la técnica de amplificación dependiente de ligasa de múltiples sondas (MLPA) se ha empleado en los últimos años en el área del análisis de alimentos para aplicaciones como la detección de organismos modificados genéticamente (Ehlert *et al.*, 2008; Guertler *et al.*, 2014; Holck *et al.*, 2009; Moreano *et al.*, 2006; Ujhelyi *et al.*, 2012) y la identificación de especies alergénicas, tanto vegetales como animales (Ehlert *et al.*, 2009; Mustorp *et al.*, 2011; Unterberger *et al.*, 2014). Esta técnica genética no amplifica directamente la secuencia genómica diana, sino el producto resultante de la ligación de parejas de hemi-sondas que hibridan en regiones adyacentes del ADN de interés. De esta manera, mediante el diseño de hemi-sondas MLPA de tamaño variable con extremos 5' y 3' comunes que posibilitan la amplificación conjunta con un único par de cebadores, se puede conseguir la detección de varias secuencias de ADN en una misma reacción.

En primer lugar, se procedió mediante esta técnica a la detección simultánea de ADN procedente de girasol (*Helianthus annuus*), amapola (*Papaver rhoeas*), lino (*Linum usitatissimum*), sésamo (*Sesamum indicum*) y soja (*Glicine max*) en productos alimenticios. La reciente tendencia de incorporar semillas y sus respectivos aceites en la dieta ha ido asociada con un aumento en la incidencia de reacciones de hipersensibilidad causadas por su ingesta, si bien la frecuente falta de información dificulta la identificación del agente causal y conlleva a

la subestimación de los casos registrados (Patel y Bahna, 2016). Hasta la fecha, los estudios epidemiológicos acerca de la alergenidad de este tipo de semillas son escasos y la mayoría se centran en el sésamo, cuya prevalencia se estima en un 0,1-0,2 %, aunque se han observado importantes diferencias geográficas (Adatia *et al.*, 2017; Dalal *et al.*, 2012). En países como Israel y Arabia Saudí el sésamo es uno de los alérgenos que más frecuentemente causa reacciones anafilácticas. La creciente introducción de este ingrediente en numerosos países europeos explica su presencia dentro de la lista de ingredientes de declaración obligatoria del Reglamento (UE) 1169/2011. A pesar de que este listado no recoge a otras semillas con demostrado potencial alergénico como el girasol, la amapola o el lino (Axelsson *et al.*, 1994; Gall, 2000; Keskin y Sekerel, 2006; Panasoff, 2008), la Comisión Europea establece que podrá ser reexaminado y actualizado en función de los últimos avances científicos y conocimientos técnicos. Por ello, no se descarta que en un futuro, estos y otros alérgenos emergentes pasen a formar parte de los ingredientes de declaración obligatoria en el etiquetado de alimentos. Asimismo, la soja también se ha reconocido como uno de los vegetales alergénicos de mayor importancia y frecuencia en los alimentos, siendo uno de los ingredientes que más casos de alergia produce en niños, con prevalencias que varían entre el 0,4 y el 1,2 % (Cordle, 2004; Kattan *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta estas consideraciones, disponer de metodologías analíticas que permitan detectar especies alergénicas como el girasol, amapola, lino, sésamo y soja, ayudará a verificar la autenticidad de los productos alimenticios, previniendo a los consumidores de posibles fraudes económicos y reacciones adversas relacionadas con su consumo. Para facilitar la discusión conjunta de los resultados, a lo largo de este capítulo se usará la terminología “sistema MLPA de semillas” para hacer referencia a esta parte del trabajo aplicada a las especies mencionadas, si bien el término de “semilla” no englobaría adecuadamente a la soja, que pertenece a la familia de las leguminosas *Fabaceae*.

Por otro lado, se empleó la técnica de MLPA para la detección simultánea de ADN procedente de los siguientes cereales con gluten (en adelante “sistema MLPA de cereales”): trigo (*Triticum aestivum vulgare*, *Triticum aestivum spelta*, *Triticum turgidum turgidum* y *Triticum turgidum durum*), cebada (*Hordeum vulgare*), centeno (*Secale cereale*) y avena (*Avena sativa*). La presencia no declarada en alimentos de estas especies vegetales puede suponer para los consumidores importantes implicaciones sanitarias debido a las diferentes patologías asociadas a su consumo, como son la alergia al trigo, la enfermedad celiaca, la sensibilidad al gluten no celiaca o la anafilaxia dependiente de cereales inducida por el ejercicio. En este marco, un etiquetado veraz y libre de ambigüedades también permite evitar el fraude económico y facilitar que la industria alimentaria pueda competir en igualdad de oportunidades en el mercado. Además, el 13 de julio de 2017, la Comisión Europea adoptó una

notificación relativa a la información alimentaria facilitada al consumidor sobre las sustancias o productos que causan alergias o intolerancias donde se especifica que “*en caso de que los ingredientes se produzcan a partir de cereales que contengan gluten, deben declararse con una denominación que haga referencia clara al tipo específico de cereal, es decir, trigo, centeno, cebada o avena*”. Por tanto, es necesario el desarrollo de metodologías analíticas capaces de detectar estas cuatro especies de cereales de manera diferenciada, y que permitan verificar el origen de los ingredientes empleados en la elaboración de los productos alimenticios.

En los siguientes apartados se discuten de manera conjunta los resultados obtenidos en la puesta a punto de los dos sistemas de MLPA desarrollados y su aplicación a la detección de especies vegetales potencialmente alergénicas en alimentos.

IV. 1. 1. Desarrollo de los sistemas MLPA de semillas y de cereales

La detección mediante la técnica de MLPA de los diferentes ingredientes alergénicos que puede contener un alimento requiere, en primer lugar, de la elección de marcadores genéticos adecuados para el diseño de hemi-sondas que permitan la hibridación específica con el ADN procedente de las especies de interés. Una primera aproximación para la elección de dichos marcadores ha consistido en estudiar regiones de ADN ya empleadas con éxito en trabajos previos de nuestro grupo de investigación encaminados a la detección y diferenciación genética de especies vegetales en alimentos. Con este fin, se han publicado varios estudios que abordan el desarrollo de técnicas de PCR en tiempo real basados en la región espaciadora interna de la transcripción del ADN ribosomal (ITS, *Internal transcribed spacer*) (de la Cruz *et al.*, 2013b; López-Calleja *et al.*, 2013, 2014, 2015a, 2015b, 2016; Pegels *et al.*, 2015). Por ello, esta región de ADN ha sido el marcador genético seleccionado en primer lugar para el diseño de las sondas específicas del sistema MLPA de semillas y dos de las sondas del sistema MLPA de cereales (avena y cebada).

Las especies vegetales poseen tres genes nucleares ribosomales (18S-5.8S-26S) entre los que se intercalan los espaciadores internos ITS1 e ITS2. Esta disposición en tándem se repite desde cientos a miles de veces dentro de un determinado locus cromosómico, separada mediante la región espaciadora intergénica (IGS, *Intergenic spacer*) (**Figura 14**).

Muchos estudios filogenéticos usan como fuente de información los genes del ARN ribosómico (ARNr), probablemente debido a que estas regiones desempeñan una misma función en todos los organismos vivos (Álvarez & Wendel, 2003; Coleman, 2015). Así, la

información que proporciona el locus del ARNr se ha empleado en diferentes estudios taxonómicos gracias a que sus secuencias presentan distintos niveles de conservación. Por un lado, las regiones codificantes (18S-5.8S-26S) forman parte de las secuencias genómicas más conservadas dentro de las especies eucariotas. Por el contrario, los espaciadores internos que conforman la región ITS junto con el gen 5.8S del ARNr, presentan un mayor grado de variabilidad nucleotídica, hecho que ha permitido llevar a cabo con éxito estudios evolutivos desde niveles más genéricos hasta el nivel de especie (estudios de especiación y biogeografía) (Poczai y Hyvönen, 2010). Esta característica convierte a la región del ITS del ARNr en una buena candidata para el diseño de oligonucleótidos especie-específicos que permitan la diferenciación de especies, incluso en los casos de elevada relación filogenética. Además, la selección de marcadores genéticos de carácter multicopia, como las regiones del ARNr o los genes de mitocondrias y cloroplastos, incrementa de 10 a 100 veces los límites de detección alcanzados en los ensayos genéticos (Holzhauser y Röder, 2014). Concretamente, en el análisis de productos alimenticios mediante técnicas de amplificación por PCR, donde las muestras han podido someterse a tratamientos térmicos intensos que degradan la molécula del ácido nucleico, esta estructura multicopia permite la recuperación de mayores concentraciones de ADN. A todo lo expuesto anteriormente hay que sumar la posibilidad que ofrece el gen del ARNr de diseñar cebadores universales en las regiones conservadas que flanquean la región ITS, lo que permite fácilmente su amplificación y, dado su bajo tamaño (650-900 pb), su secuenciación.

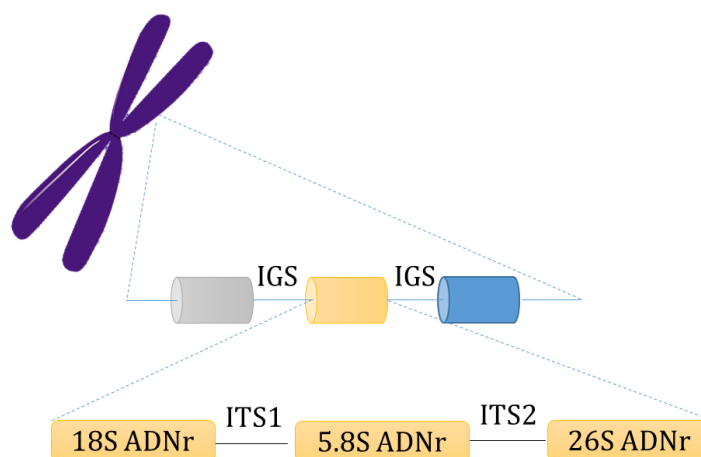


Figura 14. Representación esquemática de la región del ADN ribosómico en especies vegetales. Se muestra la repetición en tándem dentro de un determinado locus cromosómico de las regiones codificantes (18S-5.8S-26S), separadas dentro de un mismo bloque por los espaciadores internos de la transcripción (ITS1 e ITS2) y entre bloques mediante la región espaciadora intergénica (IGS) (adaptada de Poczai et al., 2010).

Teniendo en cuenta la amplia disponibilidad en la base de datos *GenBank* (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*) de secuencias de la región ITS de ARNr para diferentes especies vegetales frecuentemente incluidas en la dieta humana, se realizó un minucioso estudio del alineamiento de diversas entradas con el fin de seleccionar regiones nucleotídicas específicas de las especies objeto de estudio, pero a la vez conservadas dentro de los cultivares de cada una de ellas. El estudio de dichas secuencias permitió diseñar sondas de MLPA específicas de sésamo, amapola, girasol, lino, soja, cebada y avena. Sin embargo, no se encontró ninguna región en la secuencia del ITS que cumpliera los requerimientos para el diseño de sondas específicas de trigo y centeno, por lo que fue necesario buscar marcadores genéticos alternativos para la diferenciación de estas dos especies de cereales.

Otra opción ampliamente adoptada en la selección de marcadores genéticos para la detección de especies alergénicas en alimentos consiste en estudiar las secuencias nucleotídicas que codifican para un determinado alérgeno (D'Andrea *et al.*, 2011; Mustorp *et al.*, 2008; Pafundo *et al.*, 2009; Platteau *et al.*, 2011a; Zeltner *et al.*, 2009). En este sentido, las proteínas de almacenamiento mejor caracterizadas en los cereales objeto de estudio son las prolaminas, fracción proteica integrante del gluten junto con las glutelinas. Las secuencias que codifican para estas proteínas muestran un alto grado de similitud entre las diferentes especies de cereales con gluten, sugiriendo estructuras y funciones muy relacionadas y la existencia de un ancestro común para estas especies. A pesar de ello, son varios los estudios publicados que han demostrado la idoneidad de cebadores diseñados en las secuencias nucleotídicas codificantes de estas proteínas de almacenamiento para la detección diferencial de especies alergénicas (Carloni *et al.*, 2017; Debnath *et al.*, 2009; Garrido-Maestu *et al.*, 2018; Hernández *et al.*, 2005; Martín-Fernández *et al.*, 2015, Terzi *et al.*, 2003). Por ejemplo, las secuencias codificantes de las prolaminas han permitido el desarrollo de técnicas de PCR en tiempo real para la identificación de especies concretas. Entre ellas destaca la detección específica de cebada mediante cebadores diseñados en la secuencia de la γ -hordeína (Hernández *et al.*, 2005), o de varias dianas a la vez, como describen los trabajos de Garrido-Maestu *et al.* (2018) y Martín-Fernández *et al.* (2015), que demostraron la utilidad de las secuencias de la α 2-gliadina para la detección conjunta de trigo, cebada y centeno. De manera similar, Terzi *et al.* (2003) y Carloni *et al.* (2017) evidenciaron el gran potencial de las secuencias que codifican para la glutenina de bajo peso molecular para el análisis y diferenciación genética de especies pertenecientes al género *Triticum*.

Con el fin de buscar marcadores genéticos alternativos para la detección específica de los cultivares de trigo y centeno, en este trabajo se realizó un exhaustivo análisis informático de

varias secuencias disponibles en la base de datos *GenBank* de los genes codificantes de diferentes prolaminas: gliadinas (trigo), secalinas (centeno), hordeínas (cebada), aveninas (avena), zeínas (maíz) y orzeínas (arroz), así como de las gluteninas de bajo y alto peso molecular presentes en el trigo. De esta manera, se encontraron regiones adecuadas para el diseño de hemi-sondas de MLPA específicas del género *Triticum* en las secuencias de ADN que codifican para la glutenina de bajo peso molecular. Así mismo, el análisis permitió encontrar secuencias de la ω -secalina adecuadas para el diseño de hemi-sondas de MLPA específicas de centeno.

Un aspecto importante a tener en cuenta a la hora de desarrollar y aplicar métodos genéticos para la detección de especies alergénicas en alimentos, es que los componentes de la propia matriz alimentaria pueden afectar significativamente a la eficiencia de las reacciones de amplificación (Holzhauser y Röder, 2014). Los alimentos contienen varios compuestos (grasas, polisacáridos, minerales o enzimas) que pueden inhibir la reacción de polimerización de ADN dando lugar a resultados incoherentes y fallos en la amplificación, especialmente notables en el caso de muestras con bajas concentraciones de la especie diana (Schrader *et al.*, 2012). Otro aspecto clave para evitar resultados falsos negativos consiste en partir de una adecuada cantidad y calidad del ADN a analizar, para lo que es fundamental seleccionar un protocolo de extracción y purificación de ácidos nucleicos a partir del alimento lo más eficaz posible. Se ha demostrado que componentes como los polifenoles presentes en productos como el cacao, el café y el té, pueden disminuir o inhibir la eficacia de la extracción de ADN impidiendo su posterior análisis mediante PCR (Gryson *et al.*, 2007). Todo ello, unido a la posible degradación del ADN por los tratamientos térmicos aplicados en la elaboración de un alimento, pone de manifiesto la importancia de analizar las muestras, además de con los sistemas de MLPA especie-específicos, con otro sistema que asegure la adecuada integridad y calidad del ADN analizado y la correcta interpretación de los resultados obtenidos. Por ello, como control positivo de la reacción, se incluyó en todos los análisis de MLPA otra pareja de hemi-sondas diseñadas para hibridar en una región del gen de ADN ribosómico 18S altamente conservada en eucariotas.

La **Tabla 4** recoge toda la información relativa a las secuencias de las hemi-sondas diseñadas para los sistemas MLPA de semillas y de cereales, así como de las hemi-sondas del control positivo de amplificación. Como se plasma en la tabla, para ambos sistemas de MLPA se obtuvo una pequeña diferencia de entre uno y dos nucleótidos entre el tamaño teórico de las sondas y el obtenido tras la posterior separación electroforética. Otros autores han observado este efecto previamente y describen que puede deberse a varias causas, como la

diferente movilidad electroforética del ADN, la incorporación de un residuo adicional de adenina por la polimerasa o el uso de distintos fluoróforos en el marcador de peso molecular y el ADN amplificado (Ehlert *et al.*, 2009; Unterberger *et al.*, 2014).

El diseño de las hemi-sondas de cada uno de los sistemas de MLPA se realizó siguiendo las recomendaciones indicadas por MRC-Holland, compañía líder en el desarrollo de reactivos y protocolos de MLPA (MRC-Holland, 2018.). Esta empresa dispone, además, de sondas de diseño propio dirigidas principalmente a la detección de mutaciones genéticas humanas. Tal y como se describe en este protocolo, el diseño de las sondas sintéticas de MLPA constituye la fase más crítica para el éxito de la detección múltiple de diferentes dianas genéticas, ya que requiere de una elevada experiencia y debe acogerse a una serie de reglas estrictas de mayor complejidad que las requeridas para el diseño de los oligonucleótidos empleados en las técnicas de PCR con cebadores específicos. La **Figura 15** resume de forma esquemática la composición estructural de las hemi-sondas de MLPA y las principales normas recomendadas para su diseño. Para una correcta hibridación, las hemi-sondas no deben poseer estructura secundaria y la temperatura de fusión (T_m , *melting temperature*) de ambas secuencias de hibridación debe ser igual o superior a 71 °C para que se produzca una unión estable al ADN complementario. Además, es importante que el contenido total de citosina y guanina (CGs) en la región de hibridación sea próximo al 50 %, siendo preferible que en los cinco nucleótidos adyacentes a las secuencias de hibridación de los cebadores y en la región de ligación de la hemi-sonda izquierda haya un máximo de 3 y 2 CGs, respectivamente. Las hemi-sondas diseñadas para una misma diana deben tener una longitud similar y dar lugar, tras su ligación, a sondas de tamaños comprendidos entre 88 y 168 nucleótidos (zona óptima entre 100-140 nt). Así mismo, en el protocolo se especifican una serie de recomendaciones para potenciar o disminuir el efecto de un *mismatch* en la detectabilidad de la sonda según la localización de la zona de ligación de ambas hemi-sondas. Por último, cabe destacar que la identidad del primer nucleótido situado inmediatamente después de la secuencia de hibridación del cebador directo, afecta a la intensidad de señal de la sonda (mayor señal de fluorescencia cuando este nucleótido es una citosina, seguido de guanina, timina y, por último, adenina). Por ello, se recomienda seleccionar citosina o guanina en dicha posición para sondas de tamaño superior a 120 nt, dado que suelen proporcionar señales con intensidades más débiles.

Tabla 4. Hemi-sondas diseñadas para la detección de especies vegetales alergénicas en alimentos.

Especie diana	Marcador genético	Tamaño de amplicón
Nombre sonda	Secuencia (5' → 3')	calculado/observado (pb)
SISTEMA MLPA DE SEMILLAS (sésamo, lino, amapola, girasol y soja)		
Sésamo	ITS	85/86
SesLPO	SCD -TCACGACCAGTGGTGGTTGAACGCT	
SesRPO	Pho -CAACTCGCGTGCTGTCTGCC- SCI	
Lino	ITS	94/93
FlaxLPO	SCD -GGGGCTTTGGCTTAACTGTCAAGTCTC	
FlaxRPO	Pho -TGCCAACAACTAACAAACCCCGGCA- SCI	
Amapola	ITS	101/99
PopLPO	SCD -CACTCTGCGACCCAGGTCAAGCGGGACT	
PopRPO	Pho -ACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCG- SCI	
Girasol	ITS	108/107
SunLPO	SCD -TGTTGCGCCCCGTTGCGGGTGTGCGCGCTGTTC	
SunRPO	Pho -GTGGCTTCTTTGTAACTTAAAACGACTCTCG- SCI	
Soja	ITS	120/119
SoyLPO	SCD -TTGTCGATGCCTCACAATCAGATTGACCCGCGAACTTGTTT	
SoyRPO	Pho -ATTCATCTACCGTCGGGAGGGGATGACCACGGC- SCI	
SISTEMA MLPA DE CEREALES (centeno, cebada, avena y trigo)		
Centeno	ω -secalina	97/95
ryeLPO	SCD -cCATCGGAGGCCAATCAAACAAAGAGA	
ryeRPO	Pho -TATAGTACTAGACCGGTGGAgcctctcg- SCI	
Cebada	ITS	102/101
barLPO	SCD -CTAGCTTGCTGGTCGTCACCTGTGTTGCAAATA	
barRPO	Pho -TATTTAATCCACAGACTCTCGGCAACG- SCI	
Avena	ITS	111/109
oatsLPO	SCD -cTAGCCGGCGTGATGGCCTAGAATGACCCTTG	
oatsRPO	Pho -TAACGGTGCGCATGACGCTCCGACCGCGACCCAGGT- SCI	
Trigo	Glutenina de bajo peso molecular	135/133
wheatLPO	SCD -ccattatGGCGACAAGTGCAATTGCGCAGATGGAGACTAGATGCAT	
wheatRPO	Pho -CCCTGGTTTGGAGAGACCATGGCAGCAGCAACCATTACTgatcagtc- SCI	
Eucariotas	18S ARNr	128/127
18SLPO	SCD -GGTGCCGACCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATT	
18SRPO	Pho -TAAGTTGTTGCAGTTAAAAGCTCGTATTGGACTTTGGGATGG- SCI	

Secuencias comunes a todas las sondas:

Secuencia de hibridación del cebador directo (**SCD**) 5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA-3'

Secuencia de hibridación del cebador inverso (**SCI**) 5'-TCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'

Pho.: modificación de fosforilación (situada en el extremo 5' de las hemi-sondas derechas).

LPO y RPO: sondas de nucleótidos izquierda y derecha respectivamente (*left and right probe oligonucleotide*)

Letras mayúsculas: secuencias de nucleótidos que hibridan específicamente con el ADN diana.

Letras minúsculas: secuencias de nucleótidos espaciadoras que no hibridan con el ADN diana.

Como ya se ha señalado, gracias a las secuencias idénticas en los extremos de las hemi-sondas de MLPA (SCD y SCI en la **Figura 15**), la reacción de amplificación de todas las sondas que han sido satisfactoriamente ligadas se realiza mediante una única pareja de cebadores. El protocolo seleccionado para llevar a cabo las reacciones de MLPA lo desarrolló en 2011 la compañía MRC-Holland y emplea un único tubo para el proceso completo (ligación, hibridación y amplificación) (MRC-Holland, 2019). Este nuevo protocolo simplifica la manipulación de las muestras, reduce las variaciones experimentales e incluye mejoras en la mezcla de cebadores para minimizar la formación de dímeros.

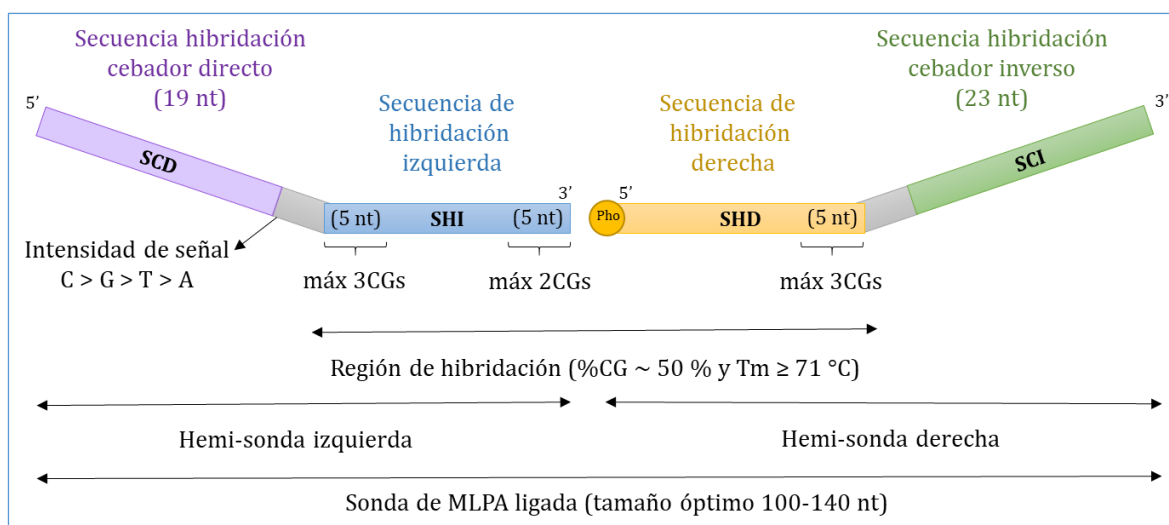


Figura 15. Esquema de la composición estructural de las hemi-sondas de MLPA con las principales reglas recomendadas para su diseño por la compañía MRC-Holland.

Los alimentos están frecuentemente compuestos por una gran variedad de ingredientes, lo que hace necesario verificar que las sondas de MLPA diseñadas no presenten reactividad cruzada frente al mayor número posible de especies vegetales y animales. Primeramente, con ayuda de la base de datos *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*)-NCBI, se comprobó *in silico* la ausencia de posibles homologías nucleotídicas entre cada una de las regiones de ADN seleccionadas para el diseño de las sondas de MLPA y las secuencias de otras especies heterólogas. A continuación, para asegurar experimentalmente la especificidad de las hemi-sondas, se analizaron extractos de ADN obtenidos a partir de diferentes especies vegetales y animales (**Tabla 1** pág. 71 y **Tabla 1** pág. 83). En los dos sistemas de MLPA desarrollados, las sondas seleccionadas permitieron la detección específica exclusivamente de aquellas especies para las que habían sido diseñadas, dando lugar a picos electroforéticos del tamaño esperado para cada una de ellas y sin producir señal de amplificación para el resto de especies heterólogas. La señal positiva de amplificación obtenida al analizar todas las muestras

con la sonda diseñada en el gen 18S del ARNr, corroboró la integridad de los ADNs analizados y el correcto funcionamiento de las reacciones de hibridación, ligación y amplificación de la MLPA. Cabe mencionar que, en el caso de las sondas pertenecientes al sistema de MLPA de cereales, la reproducibilidad de las señales de amplificación se ratificó mediante el análisis de diez cultivares de cada uno de los siguientes cereales: trigo blando, trigo espelta, trigo duro y trigo redondillo, cebada y centeno. Además, el análisis de dos cultivares del cereal híbrido que procede del cruzamiento entre trigo y centeno denominado triticale, produjo la señal de amplificación esperada, tanto con la sonda específica de trigo como con la de centeno.

Una vez verificada de manera individual la correcta especificidad de las sondas en ambas técnicas de MLPA (semillas y cereales), se evaluó su capacidad de multidetección en una misma reacción mediante el análisis de mezclas de ADN de las especies objeto de estudio para cada sistema. Un parámetro clave para garantizar la correcta detección de varias dianas a la vez mediante esta metodología, radica en la optimización del intervalo de concentraciones de cada sonda en la mezcla de hibridación. En el caso del sistema de MLPA de semillas, una mezcla equimolar de todas las sondas (5 fmol) dio como resultado un electroferograma con intensidades comparables para las señales esperadas de sésamo, lino, amapola, girasol y soja (**Figura 1** pág. 74). Sin embargo, en el caso del sistema de MLPA de cereales, al analizar concentraciones iguales de ADN de cada diana con mezclas equimolares de sondas, se obtuvieron picos electroforéticos mucho más intensos para cebada y avena, en comparación con los obtenidos para trigo y centeno. Este hecho puede atribuirse a que el elevado número de copias presentes en los genes ribosomales de la región ITS (marcador genético seleccionado para la detección específica de cebada y avena) aumenta la sensibilidad de la técnica y la capacidad de detección de estas dianas. En cambio, el carácter monocopia de las secuencias que codifican para las proteínas de almacenamiento de trigo y centeno, hace que las sondas diseñadas para estas especies posean una menor eficiencia de amplificación. Teniendo en cuenta estas consideraciones, para conseguir una detección lo más homogénea posible de todas las especies de cereales en una misma reacción de MLPA, la concentración de las sondas de trigo y centeno se aumentó hasta 2,5 fmol con respecto a las sondas de cebada y avena (0,1 y 0,05 fmol respectivamente) (**Figura 1A** pág. 86). Como se deduce de ambas imágenes (**Figura 1** pág. 74 y **Figura 1A** pág. 86), una vez optimizadas las concentraciones de las sondas en las reacciones de hibridación, se pudo confirmar la correcta funcionalidad de los dos sistemas MLPA desarrollados para la detección simultánea de las especies vegetales de interés.

A pesar de las crecientes implicaciones sanitarias de las alergias alimentarias, todavía existe una falta de consenso sobre la dosis umbral de alérgeno necesario para desencadenar la

respuesta inmunológica en individuos sensibles. Este hecho ocasiona un aumento en la demanda de métodos analíticos con una mayor sensibilidad, capaces de detectar la presencia de componentes alergénicos en los alimentos, incluso en cantidades traza. Para determinar la sensibilidad de la técnica, en este trabajo se analizaron distintas concentraciones (0,1-10 000 mg/kg) de un homogeneizado de las especies de interés en una matriz compuesta por mantequilla, azúcar y harina de trigo (en el caso del sistema MLPA de semillas) o harina de maíz (en el sistema MLPA de cereales donde el trigo es una de las especies diana). Además, las muestras se procesaron en un horno convencional a 180 °C durante 10 minutos para comprobar la aplicabilidad de los sistemas de MLPA en el análisis de productos tratados térmicamente. El límite de detección (LOD), expresado como el nivel de concentración más bajo en el que todas las sondas de MLPA produjeron resultados positivos y consistentes, fue de 10 mg/kg (**Figura 2A** pág. 75) para la detección de sésamo, lino, girasol, amapola y soja con el sistema MLPA de semillas, y de 50 mg/kg (**Figura 1B** pág. 86) para la detección conjunta de trigo, cebada, centeno y avena con el sistema MLPA de cereales. Hay que destacar que, dada la condición de detección múltiple que posee la técnica, estos límites de sensibilidad se definieron de forma global en función de las señales con un menor nivel de detección (pertenecientes a la sonda de soja en el sistema de semillas y la sonda de trigo en el sistema de cereales). En este sentido, el resto de especies vegetales podrían ser detectadas de manera individual a niveles inferiores a los establecidos por los LODs especificados.

IV. 1. 2. Aplicación de los sistemas de MLPA para la detección de especies vegetales en productos comerciales

A pesar de que la metodología de MLPA desarrollada en este trabajo no permitiría una cuantificación precisa de las especies alergénicas presentes en una muestra, los límites de detección obtenidos tras el análisis de las mezclas experimentales sugieren el elevado potencial de esta técnica para detectar la presencia de bajas concentraciones de las especies vegetales estudiadas en una matriz alimentaria. Para comprobar esta hipótesis, se analizaron mediante los sistemas de MLPA diferentes productos comerciales (panes, cereales, galletas, chocolates, turrone, bebidas, yogures, etc.) que presentaban distintas categorías de etiquetado (**Tabla 4** pág. 76 y **Tabla 3** pág. 88): 1) muestras que declaraban la presencia de una o varias especies diana, 2) muestras con el etiquetado preventivo “puede contener” para una o varias de las especies diana, 3) muestras que no declaraban la presencia de las especies diana y, en el caso de los productos analizados por el sistema MLPA de cereales, muestras certificadas o etiquetadas con el distintivo “sin gluten”.

En todos aquellos productos comerciales que indicaban en su etiquetado la presencia de una o varias especies diana, la técnica de MLPA detectó simultáneamente las diferentes especies declaradas. Las **Figuras 2B-C** (pág. 75) y **2A-D** (pág. 89) muestran algunos ejemplos de los electroferogramas obtenidos para esta categoría de productos al emplear, respectivamente, los sistemas MLPA de semillas y de cereales. Sin embargo, un significativo porcentaje de muestras presentaron discrepancias entre los ingredientes declarados y los resultados obtenidos mediante ambos sistemas de MLPA. Así, los análisis desarrollados pusieron de manifiesto la presencia de especies alergénicas no declaradas en 20 de los 56 (35,7 %) productos analizados mediante el sistema MLPA de semillas y en 10 de los 40 (25 %) productos analizados mediante el sistema MLPA de cereales. Si se consideran los resultados de ambos trabajos, más del 30 % de los productos alimenticios analizados contenían una o varias especies alergénicas no declaradas en su etiquetado. Las tres especies no declaradas más frecuentemente detectadas en las muestras fueron la cebada, el sésamo y el girasol, con porcentajes del 20 % (8 de 40), 17,8 % (10 de 56) y 14,3 % (8 de 56), respectivamente.

La presencia de alérgenos no declarados en los alimentos es, a día de hoy, una de las principales causas de alertas alimentarias en los países desarrollados, con una incidencia de entre el 42 y el 92 % dependiendo del país (Planque *et al.*, 2017). Como parte del proyecto Europeo titulado “Enfoques integrados para la gestión de alérgenos alimentarios y el riesgo de alergia” (IFAAM, *Integrated Approaches to Food Allergen and Allergy Risk Management*, ID: 312147), Bucchini *et al.* (2016) construyeron una base de datos para recoger las alertas alimentarias relacionadas con la presencia de alérgenos no declarados en alimentos. De acuerdo a la información facilitada por las diferentes autoridades colaboradoras, el mayor número de alertas registradas se asociaron con la presencia de leche y productos lácteos no declarados (16-31 %), seguido de los cereales con gluten (9-19 %), la soja (5-45 %) y el huevo y sus derivados (5-17 %).

La omisión de ingredientes potencialmente alergénicos en el etiquetado de los alimentos puede deberse a diversos factores. Entre ellos, cabe destacar la posibilidad de contaminaciones cruzadas en industrias donde se elaboran diferentes tipos de productos en las mismas líneas de procesado, la sustitución fraudulenta de un ingrediente de mayor valor económico por otro de menor coste, el uso de materiales reciclados y aditivos, los errores de trazabilidad cometidos por los proveedores, la rotación de los cultivos vegetales, y el uso de molinos compartidos en la elaboración de harinas (Alvarez y Boye, 2012; Jouanin *et al.*, 2018). Por ello, incluso bajo el estricto marco legislativo vigente, la salud de los consumidores sensibles puede verse inadvertidamente amenazada por alérgenos presentes en alimentos que supuestamente no los

contienen. Esta situación, sumada a la disponibilidad de técnicas de detección cada vez más sensibles, ha llevado a los operadores industriales a adoptar de manera voluntaria un etiquetado preventivo para advertir a los consumidores de la posible presencia de alérgenos no declarados en los productos que adquieren en el mercado (de la Cruz *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo tras el análisis de los productos comerciales mediante MLPA indicaron que aproximadamente un 57 % de las muestras seleccionadas con este tipo de etiquetado preventivo no contenían el alérgeno del cual se advertía la posible presencia. Este dato evidencia cómo la falta de directrices armonizadas en los planes de control de alérgenos de las industrias alimentarias, así como de reglamentos oficiales que regulen el uso apropiado de esta medida protectora, ha llevado al uso abusivo de este tipo de etiquetado por parte de los operadores. Este hecho limita de manera innecesaria el número de productos aptos para los individuos sensibles, lo que puede causar que estos consumidores deprecien el mensaje transmitido por el etiquetado preventivo y se expongan al riesgo de padecer algún tipo de trastorno alérgico (Barlow *et al.*, 2015; Soon y Manning, 2017; Ward *et al.*, 2010).

Independientemente de su categoría de etiquetado, en todos los productos comerciales analizados se obtuvo una señal de amplificación del tamaño esperado con la sonda del control positivo 18S ARNr, descartando la obtención de falsos negativos y corroborando el adecuado funcionamiento, tanto de la extracción de ADN como de las diferentes etapas de la reacción de MLPA. Este hecho es especialmente relevante para el caso de productos comerciales en los cuales ninguna de las especies analizadas está presente, dado que únicamente la sonda del control positivo de amplificación permite asignar los resultados obtenidos como válidos y descartar la posible ausencia de ADN amplificable (**Figura 2F** pág. 89).

Algunos autores han descrito la posibilidad de formación de artefactos durante la reacción de MLPA, hecho que puede derivar en conclusiones erróneas por la malinterpretación de los electroferogramas (Kim *et al.*, 2016). Por ello, para verificar los resultados obtenidos en las reacciones de MLPA, todos los productos comerciales se analizaron en paralelo con sistemas de PCR en tiempo real, tanto individuales como dúplex, desarrollados en trabajos previos de nuestro grupo de investigación (López-Calleja *et al.*, 2015b, 2016; Pegels *et al.*, 2015). La **Tabla 5** recoge las secuencias nucleotídicas de los cebadores específicos y las sondas de hidrólisis Taqman® empleados para la verificación por PCR en tiempo real de los resultados obtenidos con los sistemas MLPA. La tabla también recoge el marcador genético seleccionado

para cada especie vegetal objeto de estudio y el tamaño del amplicón generado con cada sistema de PCR.

Todos los resultados de amplificación positiva obtenidos en los ensayos de MLPA se verificaron de manera satisfactoria mediante la técnica de PCR en tiempo real. Sin embargo, debido a la mayor sensibilidad de la técnica de PCR, se evidenció la presencia de ingredientes no declarados en 12 muestras adicionales que no se detectaron por MLPA. Estos resultados sugieren que el contenido de la especie diana estaría previsiblemente por debajo del LOD de los ensayos MLPA desarrollados (10-50 mg/kg). Concretamente, con el sistema MLPA de semillas, las especies alergénicas detectadas exclusivamente mediante la técnica de PCR en tiempo real fueron, principalmente, la soja y el sésamo en productos de diferentes características como panes (bagels, pretzels), galletas, cereales de desayuno y bombones. Los ensayos de PCR desarrollados por nuestro grupo y empleados para confirmar estos resultados describen límites de detección inferiores a los alcanzados por el sistema MLPA de semillas (10 mg/kg): 1,3 y 1,4 mg/kg para sésamo y lino, respectivamente (López-Calleja *et al.*, 2015b) y 0,1 mg/kg para girasol, soja y amapola (López-Calleja *et al.*, 2016). No obstante, la mayoría de las discrepancias encontradas entre ambas técnicas genéticas se evidenciaron en los ensayos confirmatorios del sistema MLPA de cereales, debido a que éste presentó un LOD superior (50 mg/kg). En este caso, el trigo y la avena fueron las especies no declaradas de cereales que se detectaron con mayor frecuencia por la técnica de PCR en tiempo real y no mediante el sistema de MLPA. Nuevamente, la mayor sensibilidad de la PCR en tiempo real desarrollada por Pegels *et al.* (2015), con capacidad para detectar trigo y avena hasta niveles de 1 y 0,1 mg/kg respectivamente, explica los resultados discordantes obtenidos.

Dado el elevado número de ingredientes alergénicos susceptibles de encontrarse de manera aislada o combinada en un producto alimenticio, cada vez se demanda más la disponibilidad de técnicas con capacidad de detección múltiple. En este sentido, existe un creciente número de trabajos publicados que abordan el desarrollo de metodologías genéticas para la detección de múltiples dianas. Entre ellos, las técnicas de PCR en tiempo real con sondas específicas son, con diferencia, las más empleadas. En este ámbito, cabe citar los trabajos desarrollados por Köppel *et al.* (2010 y 2012). En el primero, estos autores describen dos sistemas *tetraplex* que detectaron hasta 100 mg/kg de avellana, cacahuete, apio y soja, y sésamo, leche de vaca, almendra y huevo de gallina. En el estudio posterior, ampliaron el primer sistema con anacardo y mostaza y el segundo con pistacho y nuez, para obtener dos sistemas de PCR en tiempo real *hexaplex* que alcanzaron límites de detección de 1000 mg/kg. Estos resultados sugieren que la

Tabla 5. Sistemas de PCR en tiempo real (cebadores específicos y sondas de hidrólisis Taqman®) empleados para la confirmación de los resultados obtenidos en los ensayos de MLPA desarrollados en esta Tesis Doctoral.

Especie diana Nombre	Marcador genético Secuencia (5' → 3')	Amplicón (pb)	Referencia
CONFIRMACIÓN DEL SISTEMA MLPA DE SEMILLAS (sésamo, lino, amapola, girasol, soja)			
Sésamo	ITS	84	López-Calleja <i>et al.</i> (2015b)
sesameITSdir	CCAGTGGTGGTTGAACGC		
sesameITSinv	CCTTTGGGTCCAACGTGAT		
sesameITSP	FAM-TCAACTCGCGTGTGTCG-BBQ		
Lino	ITS	72	López-Calleja <i>et al.</i> (2015b)
flaxseedITSdir	AACCTGCTCGGCAGAATG		
flaxseedITSinv	CCTAGAAGCACACCCAGCTT		
flaxseedITSP	HEX-AACTGTCGTTAAATGCGGG-BBQ		
Amapola	ITS	72	López-Calleja <i>et al.</i> (2016)
poppyITSdir	GGTCGGTCTAAACACAGG		
poppyITSinv	TGAAGAGAGACAACGAGTGT		
poppyITSP	HEX-GTCACGATTCGTGGTGGTC-BBQ		
Girasol	ITS	66	López-Calleja <i>et al.</i> (2016)
sunflowerITSdir	TGGCTTCTTTGTAAACTT		
sunflowerITSinv	TTCTTCATCGATGCG		
sunflowerITSP	FAM-AACGACTCTCGGCAACGGATATCT-BBQ		
Soja	ITS	89	Resultados no publicados
soyITSdir	TCCCGCGGGAGTCATCAC		
soyITSinv	CGCTACGTTCTTCATCGATGCG		
soyITSP	FAM-TGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCT-BBQ		
CONFIRMACIÓN DEL SISTEMA MLPA DE CEREALES (centeno, cebada, avena y trigo)			
Centeno	MIPS	107	Pegels <i>et al.</i> (2015)
rmipsfw	TATTTCCGGCTCTTTGCGA		
rmipsrev	AGAGGGGGTGGACTAACTTTAA		
rmipsp	FAM-CTAGCACGCACCCTCCTCCCT -BBQ		
Cebada	ITS	81	Pegels <i>et al.</i> (2015)
bitsfw	TCGCGTCATCCAATTCTCCTA		
bitsrev	GACCCCGCTCCTAGGAG		
bitssp	FAM-TCGTGTTCCGCCAATTCCAC -BBQ		
Avena	ITS	83	Pegels <i>et al.</i> (2015)
oitsfw	CGGTGGGCCGAAGATAT		
oitsrev	CGGAGACACTGCGGTAAGTAT		
oitssp	FAM-ATCGTGTCCGACACAGCGC -BBQ		
Trigo	ITS	100	Pegels <i>et al.</i> (2015)
witsfw	AGCGGGTGGGAGCTCAG		
witsrev	CGGCTAGCAAGCTAGACATGC		
witssp	HEX-CCGGGTTAGGCACAGTTCCTT -BBQ		
Eucariotas	18S ARNr	77	Pegels <i>et al.</i> (2011)
18Sdir	TGGTGCCAGCAGCCGC		
18Sinv	TCCAACACTACGAGCTTTTTAACTGCA		
18SP	FAM-CGCTATTGGAGCTGGAATTACC-BBQ		

sensibilidad de la técnica de PCR en tiempo real empeora a medida que aumenta el número de dianas a detectar.

Más recientemente, Cheng *et al.* (2016) desarrollaron un sistema de PCR múltiple para la detección de diez alérgenos alimentarios: avellana, pistacho, anacardo, pacana, sésamo, cebada, trigo, avena, cacahuete y soja. Tras la amplificación de los fragmentos de interés, la visualización de los resultados se consiguió con la posterior separación mediante electroforesis capilar. El límite de detección obtenido en este trabajo tras analizar diferentes mezclas de maíz enriquecidas con las especies objeto de estudio fue de 50 mg/kg en mezclas no procesadas. Sin embargo, esta metodología requiere la selección de amplicones de entre 125-200 nucleótidos para garantizar la correcta interpretación de los resultados, lo que podría afectar a la aplicabilidad del método para el análisis de productos procesados.

Debido a que las técnicas de PCR múltiple requieren el uso de una pareja de cebadores específicos para cada diana, es complejo optimizar las condiciones de amplificación y los ensayos están frecuentemente influenciados por la posible formación de dímeros de cebadores. Este hecho deriva en una peor reproducibilidad de los ensayos, así como en una disminución en la eficiencia de la reacción de PCR, que puede incluso llegar a inhibirse. En comparación, las metodologías de MLPA desarrolladas en esta Tesis Doctoral emplean una pareja única de cebadores para amplificar todas las sondas del sistema de detección, lo que simplifica considerablemente la optimización de la reacción de amplificación múltiple. Además, constituyen una estrategia analítica flexible, de forma que los sistemas de MLPA pueden modificarse o ampliarse mediante la incorporación de nuevas hemi-sondas (siempre que originen como resultado de su ligación una sonda de tamaño diferenciado) para adaptarse a los requisitos del análisis. Por ello, las metodologías de MLPA descritas suponen una excelente herramienta analítica para la detección simultánea de diferentes especies vegetales alergénicas, tanto las de declaración obligatoria como las que pudieran añadirse en un futuro a la lista de alérgenos del Reglamento (UE) 1169/2011.

La aplicación de la técnica de MLPA a la detección de componentes alergénicos en alimentos es relativamente reciente, por lo que son escasos los trabajos científicos que hasta la fecha se han publicado en este ámbito. El primero, publicado por Ehlert *et al.* (2009) describe la detección múltiple de 10 especies vegetales con potencial alergénico (cacahuete, sésamo y 8 frutos de cáscara: anacardo, avellanas, pacana, nuez, pistacho, nuez de Brasil, macadamia y almendra). Estos autores obtuvieron un LOD de 5 mg/kg en diferentes matrices alimentarias (chocolate, pesto y galletas) a las que se habían añadido concentraciones conocidas de algunas

dianas (cacahuete, avellana y anacardo), si bien no se realizaron ensayos de sensibilidad para todas las especies estudiadas. La especificidad del ensayo se corroboró mediante el análisis de 48 especies heterólogas y se evaluó la aplicabilidad de la técnica para la detección múltiple de las sondas a través del análisis de 39 productos comerciales.

Posteriormente, Mustorp *et al.* (2011) publicaron un trabajo sobre la detección múltiple de ocho alérgenos alimentarios: sésamo, soja, avellana, cacahuete, altramuza, mostaza, apio y gluten. Todas las hemi-sondas resultaron específicas excepto la sonda diseñada para la detección de mostaza, que también originó señales positivas de amplificación en otras especies del género *Brassica* (rábano, brócoli, repollo, col china o nabo). Los límites de detección obtenidos tras el análisis de diluciones de ADN se situaron entre 5 y 400 copias de ADN. Una de las limitaciones de este trabajo es que la evaluación de la aplicabilidad del ensayo se limitó al análisis de muestras enriquecidas solo con algunas de las especies diana, obteniéndose señales consistentes de amplificación cuando las muestras contenían concentraciones del ingrediente de entre 10 y 1000 mg/kg, dependiendo del alérgeno y del tipo de matriz enriquecida.

Por último, Unterberger *et al.* (2014) desarrollaron un sistema de MLPA para la detección de especies de pescado, moluscos (gasterópodos, bivalvos, cefalópodos y vieras) y crustáceos que alcanzó límites de detección de entre 20 y 100 mg/kg en muestras de sushi enriquecidas experimentalmente. La especificidad de la técnica se corroboró a través del análisis de 48 especies diferentes de pescado, moluscos y crustáceos, así como de otras 56 especies heterólogas y su aplicabilidad se evaluó posteriormente en un total de 10 productos comerciales.

Como se deduce de lo expuesto en esta parte del trabajo, las metodologías de MLPA desarrolladas en esta Tesis Doctoral permitieron la detección múltiple de especies alérgicas en los alimentos con niveles de sensibilidad iguales o superiores (10-50 mg/kg) a los publicados hasta el momento. Además, su aplicación con éxito al análisis de un elevado número de productos comerciales (96 muestras) de diversa naturaleza demuestra que constituyen una herramienta novedosa muy útil para garantizar el cumplimiento de las normas de etiquetado vigentes en la Unión Europea, evitar prácticas fraudulentas en la elaboración de productos alimenticios y facilitar la trazabilidad de los productos comercializados.

IV. 2. EMPLEO DE TÉCNICAS DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE CEREALES CON GLUTEN (TRIGO, CEBADA Y CENTENO) EN ALIMENTOS

Los cereales con gluten constituyen una de las principales fuentes de energía y nutrientes de la dieta, por lo que su consumo está ampliamente extendido a nivel mundial (McKevith, 2004). Sin embargo, determinados péptidos tóxicos presentes principalmente en las prolaminas y glutelinas del trigo, cebada y centeno, se han asociado con el desarrollo de diferentes patologías como la enfermedad celiaca, la alergia al trigo o la sensibilidad al gluten no celiaca. Ello justifica la inclusión de estos cereales dentro de los alérgenos de declaración obligatoria del Reglamento (UE) 1169/2011, y la necesidad de desarrollar métodos analíticos sensibles y fiables para su detección (Catassi *et al.*, 2015; Elli *et al.*, 2015; Ortiz *et al.*, 2017).

Los métodos actualmente empleados para el análisis de gluten en alimentos consisten principalmente en inmunoensayos de ELISA y dispositivos de flujo lateral (DFL, o inmunocromatografía). Entre los ensayos de ELISA más utilizados para este fin destaca el que desarrollaron Valdés *et al.* (2003), basado en el anticuerpo monoclonal R5 y la solución de extracción “cocktail”, que ha sido aceptado como método oficial de análisis tipo I por el *Codex Alimentarius* (Codex Standard 234-1999, 2018). Éste y otros inmunoensayos son metodologías ampliamente aceptadas para el análisis de alérgenos en los alimentos debido, entre otras ventajas, a su fácil manejo y su disponibilidad comercial a precios relativamente competitivos (Melini y Melini, 2018). No obstante, en los últimos años, varios trabajos de investigación han demostrado discrepancias al emplear diferentes kits comerciales para la estimación del contenido de gluten en alimentos, en función de factores como el tipo de anticuerpo empleado, el procedimiento de extracción de las proteínas o el patrón de referencia seleccionado (Bruins-Slot *et al.*, 2015; Lexhaller *et al.*, 2016; Rzychon *et al.*, 2017; Scherf, 2017). Por ello, a pesar de la preferencia por el desarrollo de metodologías analíticas encaminadas a la detección directa de la proteína alergénica, cada vez es más manifiesta la necesidad de desarrollar métodos alternativos que complementen los resultados obtenidos en los ensayos inmunológicos.

En este contexto, en los últimos años ha aumentado exponencialmente el número de trabajos que proponen técnicas alternativas a las inmunológicas basadas en la detección de la presencia de ADN procedente del ingrediente alergénico (métodos indirectos). Entre ellas, la técnica de PCR, empleando cebadores especie-específicos es una de las más extendidas debido, entre otras ventajas, a su rapidez, sensibilidad y especificidad (Holzhauser y Röder, 2014; Pegels, 2015; Prado *et al.*, 2016; Salihah *et al.*, 2016; van Hengel, 2007). Considerando estas premisas, el segundo objetivo de este trabajo de investigación consistió en el desarrollo de un

sistema de PCR en tiempo real con sondas de hidrólisis Taqman® para la detección conjunta de la presencia de ADN procedente de las principales especies de cereales con gluten (trigo, cebada y centeno) en alimentos.

IV. 2. 1. Desarrollo y validación del sistema de PCR en tiempo real

Para la consecución de este objetivo, en primer lugar se realizó una búsqueda informática de marcadores genéticos con un grado de variabilidad nucleotídica adecuado para llevar a cabo la amplificación conjunta y específica de las tres especies de cereales objeto de estudio. Una de las estrategias de elección en el diseño de técnicas genéticas para la detección de alérgenos alimentarios consiste en el estudio de secuencias genómicas que codifican para las proteínas alergénicas. Sin embargo, en el caso de los cereales con gluten, la mayoría de los trabajos de PCR publicados hasta el momento basados en secuencias que codifican para las proteínas de almacenamiento, se centran en la detección de especies independientes, probablemente debido al alto grado de variabilidad genética encontrado en estas secuencias (Debnath *et al.*, 2009; Dubois *et al.*, 2017; Hernández *et al.*, 2005; Terzi *et al.*, 2003; von Büren *et al.*, 2001; Zeltner *et al.*, 2009). Por tanto, se estudió la posibilidad de emplear un marcador alternativo que permitiera la detección conjunta de las tres especies de cereales.

Como ya se ha señalado, las técnicas de PCR en tiempo real diseñadas sobre secuencias genéticas con carácter multicopia han demostrado un gran potencial cuando las especies objeto de estudio se encuentra en bajas concentraciones dentro de una matriz alimentaria. Teniendo en cuenta las ventajas de este tipo de dianas genéticas, y los antecedentes de otros trabajos desarrollados por nuestro grupo, se realizó la búsqueda informática de secuencias de la región espaciadora interna de la transcripción (ITS) del ADNr disponibles en la base de datos *GenBank* para diferentes especies vegetales, incluyendo los principales cereales empleados en la dieta.

En primer lugar, gracias a las herramientas “EMMA” y “showalign” del software bioinformático *EMBOSS* (*European Molecular Biology Open Software Suite*, <http://imed.med.ucm.es/EMBOSS>), se obtuvieron los alineamientos que permitieron seleccionar las regiones óptimas para el diseño del sistema de PCR en tiempo real. Tras un minucioso estudio, se diseñó una pareja de cebadores que acotaba un fragmento de 118 pb en la región *ITS2* que se encuentra separando las subunidades 5.8S y 26S de los genes nucleares ribosomales de las especies vegetales. Asimismo, para realizar el seguimiento de la reacción de PCR en tiempo real, se diseñó una sonda de hidrólisis TaqMan® capaz de hibridar en la región

delimitada por ambos cebadores de amplificación. Como puede observarse en la **Figura 1** pág. 98, la región seleccionada para el diseño del sistema de PCR en tiempo real presentaba un grado de conservación óptimo entre las tres especies diana para permitir su detección conjunta.

En este trabajo, además de los cebadores y sonda específicos para la amplificación conjunta de las tres especies de cereales, se utilizó como control positivo de la reacción de amplificación otro sistema de PCR en tiempo real diseñado en una región del gen *18S ARNr* conservada en eucariotas (Pegels *et al.*, 2011). La **Tabla 3** pág. 95 muestra las principales características y secuencias de todos los cebadores y sondas empleados en esta parte del trabajo. En ambas sondas, el fluorocromo donador seleccionado fue la 6-carboxifluoresceína (*FAM*), que presenta longitudes de onda de excitación y de emisión de 495 y 517 nm, respectivamente. El *quencher* empleado, desarrollado por *Berry & Associates, Inc. Company*, se denomina BlackBerry® (BBQ) y pertenece a una categoría especial de receptores no fluorescentes (NFQ, *Non Fluorescent Quenchers*). Estos receptores son capaces de absorber la energía de emisión de otros fluoróforos sin generar fluorescencia por sí mismos, lo que mejora el rendimiento de los ensayos de PCR en tiempo real al disminuir el ruido de fondo de la técnica (Gašparič *et al.*, 2010). Los resultados de amplificación obtenidos en este trabajo se expresaron como valores numéricos de C_p ya que es la nomenclatura adoptada por la compañía *Roche Diagnostics* que comercializa el equipo donde se han realizado los análisis de PCR en tiempo real.

Tras comprobar con la ayuda de la herramienta informática *BLAST* la adecuada especificidad del sistema de PCR en tiempo real, ésta se verificó de manera experimental mediante el análisis de ADN obtenido de numerosas especies vegetales. Para ello se emplearon muestras de referencia (un total de 92 cultivares) de los siguientes cereales proporcionados por el Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos (CRF-INIA): trigo blando (*Triticum aestivum vulgare*, n = 10), trigo espelta (*Triticum aestivum spelta*, n = 10), trigo rivet o redondillo (*Triticum turgidum turgidum*, n = 10), trigo duro (*Triticum turgidum durum*, n = 10), cebada (*Hordeum vulgare*, n = 10), centeno (*Secale cereale*, n = 10), triticale (x *Triticosecale*, n = 2), avena (*Avena sativa*, n = 10), arroz (*Oryza sativa*, n = 10) y maíz (*Zea mays*, n=10) (**Tabla 1** pág. 94). Además, la especificidad de la técnica se comprobó a través del análisis de un elevado número de especies heterólogas (vegetales y animales) empleadas frecuentemente en la elaboración de alimentos (**Tabla 2** pág. 95). Tal y como se recoge en estas tablas, el sistema de PCR en tiempo real desarrollado para la detección de cereales con gluten permitió la amplificación consistente del fragmento de ADN específico exclusivamente en los cultivares de trigo, cebada, centeno y triticale, sin producirse incremento de la fluorescencia tras 40 ciclos

de amplificación para ninguna de las especies heterólogas analizadas. La validez de estos resultados se verificó mediante el análisis de todas las especies incluidas en los ensayos de especificidad mediante el sistema de PCR diseñado como control positivo. En todos los casos, la señal positiva de amplificación generada confirmó la integridad del ADN analizado y la ausencia de inhibición de la reacción de polimerización.

Para determinar la sensibilidad de la técnica de PCR en tiempo real, se realizaron análisis preliminares con diluciones de ADN de todas las especies de cereales de interés. Los resultados obtenidos demostraron la capacidad del ensayo para amplificar de manera homogénea las cuatro subespecies de trigo, así como la cebada y el centeno, con un buen límite de detección (5 pg de ADN para todas ellas) (**Tabla 4** pág. 96). Estos resultados indican que la región del *ITS* seleccionada constituye un marcador óptimo con una baja tasa de mutación y un número de copias semejante entre los diferentes cultivares de las tres especies de cereales con gluten analizadas. Por el contrario, algunos trabajos describen dificultades a la hora de amplificar de manera uniforme varias especies de cereales mediante PCR en tiempo real. Por ejemplo, Martín-Fernández *et al.* (2015) obtuvieron hasta 6 y 8 ciclos de diferencia entre la amplificación de centeno y cebada con respecto al trigo, empleando un sistema de PCR diseñado en el gen que codifica para la α -gliadina. De manera similar, Hernández *et al.* (2005) describieron una discrepancia de 6 ciclos en la amplificación de diferentes genotipos de trigo empleando como marcador el gen de la acetil-CoA carboxilasa.

Para evaluar la aplicabilidad del ensayo al análisis de productos comerciales, y teniendo en cuenta que el sistema de PCR en tiempo real desarrollado mostró un comportamiento lineal y similar en el reconocimiento de todos los cereales diana, se construyó un modelo teórico de mezclas de referencia de harina de maíz enriquecidas con distintos porcentajes (100 000-10 mg/kg) de un homogeneizado de trigo, cebada y centeno (denominado WBRm, *wheat/barley/rye mixture*). A continuación, se procedió a estudiar la influencia de la temperatura en el comportamiento de amplificación de las mezclas de referencia, dado que la intensidad del procesado térmico es uno de los factores críticos que pueden afectar a la sensibilidad de los métodos de PCR. Para ello, se analizaron las muestras enriquecidas con la mezcla WBRm, tanto cruda como sometida a dos tratamientos térmicos diferentes: 160 °C durante 13 min y 200 °C durante 20 min.

Según diversos estudios, los granos de trigo, cebada y centeno contienen entre un 8 y un 15 % de proteínas, de las cuales el 80-90 % son proteínas del gluten (Biesiekierski, 2017; Kucek *et al.*, 2015; Magliano *et al.*, 2014; Martín-Fernández *et al.*, 2015). En este estudio, las

concentraciones de WBRm en las mezclas binarias se seleccionaron para incluir niveles bajos de enriquecimiento, asumiendo que el contenido de proteínas de gluten es alrededor de un 10 % del peso del cereal. Por lo tanto, las mezclas binarias experimentales utilizadas para la validación experimental del método podrían equipararse a muestras que contienen concentraciones teóricas de gluten de, aproximadamente, 10 000, 1000, 100, 50, 20, 10, 5 y 1 mg/kg.

La **Figura 2** (pág. 98) muestra las rectas de calibración obtenidas tras el análisis de las tres mezclas binarias experimentales mediante la técnica de PCR en tiempo real desarrollada. La validación estadística de los modelos lineales, demostró una correlación significativa entre la concentración de las especies diana en las muestras y los valores de C_p obtenidos. Estos resultados sugieren el potencial cuantitativo del ensayo para detectar la presencia de cereales con gluten en alimentos bajo el modelo experimental descrito. Sin embargo, mientras que los valores de C_p obtenidos con las muestras tratadas a 160 °C no difirieron en gran medida de los alcanzados con las muestras crudas, el aumento de la intensidad del procesado térmico hasta 200 °C durante 20 min sí produjo valores de fluorescencia claramente más tardíos, reflejando un nivel de degradación del ADN mayor comparado con las muestras tratadas a la temperatura inferior. Como se observa en la figura, el sistema de PCR específico de cereales con gluten generó señales de amplificación para todas las concentraciones de WBRm analizadas en las mezclas binarias. No obstante, el calentamiento más intenso (200 °C/20 min) generó dificultades para producir señales de amplificación consistentes en el porcentaje de enriquecimiento más bajo (10 mg/kg). Por este motivo, el límite de detección para la detección de cereales con gluten mediante la técnica de PCR en tiempo real se estableció en el intervalo de 10-50 mg/kg (equivalente teóricamente a 1-5 mg/kg de gluten), dependiendo del tipo de procesado aplicado a la muestra. Como consecuencia, los valores de C_p podrían correlacionarse con la concentración del ingrediente alergénico a detectar, sólo si pudiera disponerse de patrones de calibración basados en una matriz alimentaria lo más similar posible a la muestra analizada (composición y procesado aplicado), condición que es difícil de cumplir desde un punto de vista práctico. Otros autores han descrito esta misma limitación a la hora de intentar cuantificar la presencia de diferentes especies en alimentos procesados mediante técnicas de PCR (López-Calleja *et al.*, 2015a, 2015b; Pegels, 2015).

Los resultados obtenidos sugieren, por tanto, que la metodología de PCR en tiempo real desarrollada tiene el potencial de detectar, con fines cualitativos, bajas concentraciones de trigo, cebada y centeno que podrían equipararse a niveles teóricos de gluten inferiores al límite establecido por la Unión Europea para etiquetar un producto como libre de gluten (20 mg/kg).

IV. 2. 2. Aplicación del sistema de PCR en tiempo real para la detección de cereales con gluten en productos comerciales

Una vez demostrada la idoneidad del sistema de PCR para la detección sensible y específica de los tres cereales con gluten en las mezclas binarias experimentales, se evaluó la aplicabilidad de la técnica mediante el análisis de 220 productos comerciales de diversa naturaleza y sometidos a las diferentes condiciones de procesado que se aplican en la industria alimentaria.

Teniendo en cuenta las recomendaciones propuestas por Caraguel *et al.* (2011), en este trabajo se seleccionó un valor experimental inferior de corte o de ciclo umbral (Cp) para la clasificación cualitativa de las muestras como “PCR-positivas” o “PCR-negativas”, en términos de capacidad de la técnica para detectar o no la presencia de las especies diana en las mismas. Este límite inferior se estableció en un Cp de 33 (**Figura 2** pág. 98), considerando los valores de Cp registrados para la concentración más baja de la mezcla WBRm (50 mg/kg, equiparable teóricamente a 5 mg/kg de gluten) que el sistema de PCR pudo detectar de manera fiable en la mezcla binaria tratada a 200 °C. De esta manera, cualquier Cp por encima de este umbral (Cp 33) se consideraría como no reproducible y se asignaría a muestras PCR-negativas.

Análogamente, se estableció un valor umbral superior para clasificar aquellas muestras que contuvieran concentraciones de cereales con gluten superiores a 200 mg/kg (teóricamente equivalentes a 20 mg/kg de gluten). Este umbral se estableció en un Cp de 26 (**Figura 2** pág. 98), considerando en este caso los valores de Cp registrados tras el análisis de las mezclas crudas y sometidas al tratamiento térmico menos intenso. Así, los resultados de amplificación que produjeran valores de Cp inferiores a este valor se corresponderían a productos con niveles de gluten presumiblemente superiores a 20 mg/kg y, por tanto, potencialmente perjudiciales para los consumidores sensibles. Finalmente las muestras comerciales que originasen valores de Cp situados entre ambos umbrales de corte (33 y 26) se considerarían como positivas respecto a la presencia de trigo, cebada y/o centeno (muestras PCR-positivas). No obstante, para estimar la concentración de cereales (y el correspondiente nivel teórico de gluten) en estas muestras, sería necesario conocer la naturaleza, características y método de procesado de cada producto en particular.

Los resultados obtenidos tras el análisis de los productos comerciales mediante la técnica de PCR en tiempo real se encuentran recogidos en la **Tabla 6** (pág. 97). Como puede observarse, el sistema de PCR desarrollado detectó satisfactoriamente la presencia de los cereales diana en todos los productos que declaraban en su etiquetado trigo, cebada y/o

centeno, demostrando la capacidad del método para detectar la presencia de cereales con gluten, incluso en muestras particularmente complejas como chocolates.

Dentro de la categoría de productos comerciales que advertían de la posible presencia de cereales con gluten, la técnica de PCR produjo señales de amplificación positivas ($C_p < 33$) en el 15,8 % (6 de 38) de las muestras, poniendo nuevamente de manifiesto el bajo porcentaje de productos con etiquetado preventivo que verdaderamente contienen el alérgeno del que se advierte su posible presencia. Este hecho puede deberse a que los fabricantes prefieren alertar de una posible contaminación cruzada por el uso de instalaciones compartidas, incluso cuando la probabilidad de que dicha contaminación ocurra sea mínima. En este contexto, la implementación de medidas como la unificación del lenguaje empleado en el etiquetado preventivo o la evaluación real del riesgo teniendo en cuenta los umbrales establecidos en el sistema VITAL (*Voluntary Incidental Trace Allergen Labelling*), permitiría a los consumidores realizar elecciones con mejor información (Allen *et al.*, 2013; Soon y Manning, 2017).

El análisis de productos comerciales que no contenían como ingrediente ninguno de los cereales con gluten reveló que un 67 % (46 de 69) cumplían con la declaración de su etiquetado ya que el sistema de PCR no produjo señales de amplificación positivas. Sin embargo, un alto porcentaje de muestras (33 %) sí resultaron contener ADN procedente de cereales con gluten. Cabe destacar que un 82 % de estas muestras positivas (19 de 23) contenían avena entre sus ingredientes, lo que refleja una elevada proporción de productos fabricados a base de este cereal, posiblemente contaminados con trigo, cebada y/o centeno.

Por último, el muestreo incluyó un elevado número de productos comerciales elaborados específicamente para consumidores sensibles al gluten. De las 102 muestras analizadas dentro de esta categoría, un 10,8 % (11 productos) produjeron señales positivas de amplificación. Por el contrario, la técnica de PCR sugirió que el resto de muestras (91 productos) sí serían adecuadas para individuos sensibles, dado que no se amplificó el fragmento de ADN seleccionado como marcador de la presencia de cereales con gluten. Dos de estas muestras PCR-negativas pertenecían a productos elaborados a base de avena bajo condiciones de procesamiento específicas para minimizar la posibilidad de contaminación cruzada con otros cereales. Esta clase de avenas certificadas ayudan a mejorar el valor nutricional de las dietas sin gluten y a ampliar el número de productos a los que las personas celiacas tienen acceso (Comino *et al.*, 2015; Fric *et al.*, 2011; Pinto-Sánchez *et al.*, 2017).

Para todos los productos analizados, el sistema de PCR diseñado en el gen 18S del ARNr como control positivo de la reacción, confirmó la presencia de ADN amplificable, corroborando

la adecuada integridad del ADN extraído de las muestras y la ausencia de componentes que pudieran inhibir la reacción de amplificación.

En los últimos años, las técnicas basadas en la PCR han adquirido cada vez más relevancia en el análisis de alimentos, ya que suponen una herramienta muy útil para facilitar la trazabilidad de los productos comercializados y contribuir a garantizar un etiquetado consistente, coherente y transparente. Gracias en parte al abaratamiento del instrumental y reactivos requeridos para este tipo de análisis, hoy día existen protocolos oficiales basados en técnicas de PCR, incorporados en diversos Reglamentos Europeos. Entre ellos, cabe destacar la detección de proteínas animales transformadas en piensos, la detección de organismos modificados genéticamente o la autenticación de carne de caballo y especies de pescado. Además, otros países ya han introducido dentro de sus normativas métodos oficiales basados en la PCR para la detección de alérgenos alimentarios, como la detección de gamba y cangrejo (Japón) o de cacahuete en matrices que contienen chocolate (Alemania) (Holzhauser y Röder, 2014; Sakai *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, la disponibilidad de técnicas de PCR como la desarrollada en esta Tesis Doctoral, capaces de discriminar específicamente las variedades de trigo, cebada y centeno, sería crucial en el caso de que se autorizasen las técnicas genéticas como metodologías complementarias a los inmunoensayos en la determinación de cereales con gluten en alimentos. Sin embargo, a pesar de que las técnicas basadas en la PCR presentan innegables y reconocidas ventajas, como su elevada sensibilidad y especificidad, cuando se aplican a la detección de gluten en alimentos hay que tener presentes ciertas limitaciones inherentes al hecho de que esta técnica detecta la presencia del ingrediente alergénico pero no de la proteína desencadenante de la reacción adversa (Holzhauser, 2018; Scherf y Poms, 2016). En este sentido, el análisis por PCR de la presencia de gluten en productos tales como hidrolizados o fermentados (cervezas, siropes o maltas) puede dar lugar a resultados negativos falsos debido al elevado grado de degradación que sufre la molécula de ADN en estos procesos, que puede dificultar o impedir su correcta amplificación (Mujico *et al.*, 2011, Panda y Garber, 2019).

Por otra parte, la determinación de gluten mediante PCR también supone un desafío en aquellos productos a base de almidón. Las proteínas del gluten se encuentran en el endospermo del cereal en combinación con este polisacárido, que supone hasta el 63-72 % del contenido del trigo (Shewry *et al.*, 2002). Mediante un proceso de fraccionamiento que involucra sucesivos lavados con soluciones acuosas, se puede separar el almidón de las

proteínas del gluten (Kupper, 2005; van der Borgh *et al.*, 2005). Aunque tras este proceso suele permanecer un cierto nivel de gluten residual, puede obtenerse almidón con una concentración de gluten inferior a 20 mg/kg, por lo que podría incorporarse a la dieta para mejorar la aceptabilidad de los productos adecuados para pacientes celíacos gracias a las propiedades que aporta este polisacárido (Kaukinen *et al.*, 1999; Scherf, 2017). Considerando estas premisas, en el caso de que alguno de los productos analizados mediante la técnica de PCR en tiempo real desarrollada contuviera almidón de trigo, cebada o centeno, el ensayo detectaría la presencia del ingrediente a pesar de que podría no contener gluten, produciéndose por tanto un resultado incorrecto (falso positivo). También hay que señalar que, por lo general, dado que existen almidones naturalmente libres de gluten (como por ejemplo almidón de arroz, patata o tapioca), se suele evitar el uso de almidón de trigo en la formulación de productos sin gluten (Arendt y Bello, 2008).

IV. 2. 3. Análisis comparativo de los productos comerciales mediante PCR y ELISA

Debido a las limitaciones inherentes de las técnicas de PCR enfocadas a la determinación de gluten en los alimentos, se consideró importante validar los resultados obtenidos en el análisis de los productos comerciales mediante una técnica de base inmunológica dirigida a detectar las proteínas alergénicas. Para ello, los 220 productos comerciales analizados por PCR en tiempo real, se analizaron también mediante la técnica oficial de ELISA sándwich basada en el anticuerpo monoclonal R5 para la determinación de gluten en alimentos.

La **Tabla 7** (pág. 100) muestra el análisis comparativo de las 51 muestras que generaron resultados positivos de amplificación mediante la técnica de PCR en tiempo real. El método inmunoenzimático confirmó la presencia de altas concentraciones de gluten en todos los productos comerciales (categoría A) que declaraban contener alguno de los cereales con gluten, registrando niveles de absorbancia superiores a la concentración más alta del estándar de calibración (80 mg/kg). En el caso de los productos clasificados como PCR-positivos en el resto de categorías (B, C y D), la mayoría produjeron resultados coherentes en los análisis de ELISA, corroborando la presencia de cereales con gluten independientemente de la naturaleza de la molécula diana (ADN o proteína). No obstante, como se deduce de los resultados mostrados en la **Tabla 7** (pág. 100), no se pudo establecer una equivalencia o relación directa entre los valores de C_p y los niveles de gluten obtenidos en las muestras. Otros autores han alcanzado esta misma conclusión al tratar de correlacionar los resultados generados mediante PCR en tiempo real y ELISA, atribuyendo este resultado a las diferentes características y

particularidades que posee cada alimento (Köppel *et al.*, 1998; 2010; Mašková *et al.*, 2011; Mujico *et al.*, 2011).

Por otro lado, once de las muestras mostraron discrepancias en los resultados proporcionados por ambas técnicas. En estos productos, la técnica de PCR en tiempo real produjo señales de amplificación positivas ($C_p < 33$), mientras que los niveles de gluten se encontraron por debajo del límite de cuantificación (LOQ, *limit of quantification*) del ensayo de ELISA basado en el anticuerpo R5 (5 mg/kg de gluten). Este resultado podría explicarse por la mayor sensibilidad de la técnica de PCR, especialmente en el análisis de productos sometidos a un procesamiento de baja intensidad donde la técnica tiene el potencial de amplificar las especies dianas hasta niveles de 10 mg/kg, equivalentes a un contenido teórico de gluten de 1 mg/kg. Sin embargo, como se ha señalado anteriormente, este resultado también podría atribuirse a la presencia en las muestras de almidones procedentes de trigo, cebada y/o centeno que no fueran detectados por la técnica de ELISA, pero donde sí habría ADN de estos cereales amplificable mediante PCR.

Cabe señalar que el análisis de gluten en muestras de almidón es una determinación problemática también mediante las técnicas inmunoenzimáticas. En la reunión del 3 de noviembre de 2006, la Comisión del *Codex Alimentarius* sugirió que, en un producto como el almidón, el método de ELISA basado en el anticuerpo R5 podría proporcionar resultados que no se correlacionaran con la verdadera toxicidad de la muestra debido a que el anticuerpo reconoce exclusivamente la fracción de las prolaminas y no a las subunidades de las glutelinas. En este sentido, Wieser y Koehler (2009) pusieron de manifiesto que el factor de conversión aplicado para correlacionar el contenido de prolaminas detectado por el R5 con los niveles de gluten (que asume una proporción 1:1 de prolaminas y glutelinas) puede llevar a errores en la estimación del contenido de gluten en muestras de almidón de hasta un 70 %. Además, es importante resaltar un trabajo desarrollado recientemente por Scherf (2017) donde se describen enormes discrepancias en los niveles de gluten cuantificados al analizar 30 muestras de almidón mediante siete inmunoensayos comerciales distintos, principalmente debidas a los diferentes anticuerpos incluidos en cada kit y a que cada protocolo emplea métodos de extracción y estándares de calibración diferentes.

A pesar de estas inevitables divergencias analíticas, en el presente trabajo se observó un correcto funcionamiento de los valores umbrales cualitativos establecidos para clasificar los productos comerciales en función del valor de C_p generado mediante la técnica de PCR en tiempo real. De este modo, todas las muestras que produjeron valores de C_p inferiores al límite

de 26 registraron valores de absorbancia correspondientes a concentraciones de gluten superiores a 20 mg/kg. Por tanto, dicho límite podría emplearse para discriminar aquellas muestras potencialmente peligrosas para los consumidores sensibles. Asimismo, los 169 productos comerciales clasificados como negativos por la técnica de PCR, generaron valores de absorbancia por debajo del LOQ del inmunoensayo, demostrando la conveniencia del límite de Cp fijado en 33 para identificar muestras donde no hay presencia de ADN de trigo, cebada y/o centeno y que podrían, por tanto, clasificarse como libres de gluten. Esta sistemática correlación de resultados obtenida en el caso de las muestras asignadas como negativas para la presencia de gluten, también se ha descrito en otros trabajos dirigidos a la determinación de esta proteína en alimentos. Cabe destacar por ejemplo el trabajo de Rzychon *et al.* (2017) donde se comparan los resultados proporcionados por siete kits de ELISA, concluyendo que solamente se obtenían resultados reproducibles con todos los kits en las muestras donde no se detectaba la presencia de gluten. Sin embargo, dado que las muestras con niveles detectables de gluten proporcionaron resultados dispares con relación al límite de 20 mg/kg, estos autores sugieren que este umbral adoptado por los diferentes reglamentos de etiquetado no es operable desde un punto de vista práctico. Este hecho ha llevado a algunos países como Australia y Nueva Zelanda a regular que los alimentos con la etiqueta "sin gluten" no deben contener concentraciones de gluten detectables por ELISA.

Todas estas observaciones resaltan el gran desafío que supone una cuantificación precisa de los niveles de gluten de los alimentos, independientemente de la base analítica del método seleccionado. Tanto en los ensayos genéticos como en los inmunológicos, es necesario identificar factores de conversión adecuados para correlacionar la cantidad de molécula diana (ADN o proteína) con los niveles de gluten en la muestra, siendo por tanto inevitable un cierto grado de incertidumbre cualquiera que sea la técnica empleada. Este hecho ha llevado a algunos autores a plantear si los métodos basados en el análisis de las proteínas (ELISA o de espectrometría de masas) serían por sí solos suficientes para la detección de alérgenos en los alimentos, o si sería recomendable el uso de técnicas complementarias como las basadas en la PCR (Holzhauser, 2018). Dada la dificultad de seleccionar un único método que reúna todas las cualidades para ofrecer resultados robustos, inequívocos y rápidos en las determinaciones de gluten en los alimentos, el empleo de varias técnicas complementarias proporcionaría una información valiosa a los laboratorios oficiales de análisis para contribuir a aumentar la seguridad de los productos comercializados para consumidores alérgicos.

En las últimas décadas, se ha publicado un número considerable de trabajos basados en las técnicas de PCR en tiempo real para la determinación de cereales con gluten en alimentos. Un

alto porcentaje de ellos se centra en la detección individual de especies, sobre todo de trigo (Hernández *et al.*, 2005; Mujico *et al.*, 2011; Terzi *et al.*, 2003; von Büren *et al.*, 2001; Zeltner *et al.*, 2009). Sin embargo, son mucho más escasos los trabajos de PCR enfocados a la detección del grupo de cereales que desencadenan trastornos relacionados con el gluten (trigo, cebada y centeno), probablemente debido al alto nivel de polimorfismo existente entre las diferentes especies. En este sentido, el empleo de técnicas de PCR en tiempo real como la desarrollada en esta Tesis Doctoral para la detección conjunta de trigo, cebada y centeno proporciona una correlación más realista entre las determinaciones de ADN y las de proteína presente en las muestras.

Dahinden *et al.* (2001) desarrollaron el primer método de PCR convencional para la detección simultánea de cereales con gluten basada la amplificación de un fragmento específico de la región no codificante de cloroplastos del gen *trnL* (amplicón de 201 pb para trigo y centeno y de 196 bp para cebada). Al igual que el marcador genético *ITS*, este gen también presenta carácter multicopia, y permitió la detección de 20 pg de ADN de trigo y 2 pg de ADN de cebada y centeno. Mediante la adición de un patrón interno de mayor longitud que los amplicones, estos autores consiguieron una cuantificación relativa de las muestras en el intervalo entre 200 y 2000 mg/kg (concentraciones de gluten teóricas entre 20 y 200 mg/kg). La visualización de los resultados en geles de agarosa permitió clasificar un total de 15 muestras en función de su contenido superior o inferior al límite de 20 mg/kg de gluten.

Olexová *et al.* (2006) emplearon los mismos cebadores diseñados por Dahinden *et al.* (2001) en otra técnica de PCR convencional optimizada para detectar hasta un 0,1 % de trigo en mezclas de soja (1000 mg/kg), límite equivalente al nivel establecido para considerar un producto como “bajo contenido en gluten” (100 mg/kg). La aplicabilidad de la técnica se demostró a través del análisis de 4 harinas y 15 muestras de galleta, encontrándose contaminaciones de cereales con gluten en tres de ellas.

El primer método de PCR en tiempo real con sondas de hidrólisis Taqman® con capacidad para amplificar de manera conjunta el ADN de trigo, cebada y centeno, fue descrito por Píknová *et al.* (2008). El sistema de PCR amplificaba un fragmento de 95 pb en el gen que codifica para la puroindolina b del trigo, con un límite de detección de 200 mg/kg de trigo. No obstante, el trabajo no hace referencia al límite de detección para cebada y centeno, mencionando exclusivamente que las señales para estas dos dianas eran de intensidad considerablemente menor debido a las diferencias nucleotídicas entre el sistema de cebadores/sonda y las secuencias de la puroindolina b de cebada y centeno.

Martín-Fernández *et al.* (2015) evaluaron tres sistemas de PCR con cebadores específicos y sondas Taqman® dirigidos a los genes que codifican para tres proteínas alergénicas del trigo: α 2-gliadina, aglutinina isolectina A (*Tri a 18*) y tiorredoxina h (*Tri a 25*). La sensibilidad del método se evaluó a partir del análisis de diluciones de ADN y mezclas binarias de harina de soja y trigo, mostrando un límite de detección de 20 pg de ADN y 500 mg/kg de trigo para los sistemas diseñados en las dianas genéticas de una sola copia (*Tri a 18* y *Tri a 25*). No obstante, el sistema basado en el gen con carácter multicopia de la α 2-gliadina alcanzó una mayor sensibilidad, con límites de detección de 2 pg de ADN y 50 mg/kg de trigo. Cabe mencionar que todos los sistemas desarrollados en este trabajo permitieron también la detección de otros cereales relacionados con la enfermedad celiaca (cebada, centeno y avena), a pesar de que presentaron una eficiencia de amplificación menor y el límite de detección para estas especies de cereales no se determinó. Otra limitación de este trabajo es que no evaluó la aplicabilidad del ensayo al análisis de productos comerciales.

Teniendo en cuenta los resultados publicados por Martín-Fernández *et al.* (2015), Garrido-Maestu *et al.* (2018) desarrollaron un nuevo sistema de cebadores específicos y sonda de hidrólisis en la diana genética que proporcionó mejores resultados para la detección de cereales con gluten: la secuencia nucleotídica que codifica para la α 2-gliadina. En este trabajo, se compararon dos sistemas diferentes para visualizar los resultados, *SYBR® Green* y sonda de hidrólisis Taqman®, así como una novedosa técnica de amplificación isotérmica mediada por loop (qLAMP). Todos los sistemas detectaron satisfactoriamente la presencia de trigo, cebada y/o centeno en las 10 muestras analizadas que contenían estos cereales, a excepción de dos muestras de cebada y centeno en grano que resultaron negativas mediante la técnica de qLAMP. El análisis de mezclas binarias de harina de maíz enriquecidas con diferentes concentraciones de trigo fijó el límite de cuantificación del ensayo en 50 mg/kg de trigo (100 mg/kg cuando se emplea el agente *SYBR® Green*). No obstante, en este trabajo no se realizaron mezclas experimentales enriquecidas con cebada y centeno para determinar la sensibilidad de las técnicas frente a estas especies, ni se incluyeron análisis de especificidad con avena.

Además de los trabajos publicados en la bibliografía científica, actualmente existen en el mercado kits comerciales para la detección de ADN de cereales con gluten. Cabe citar por ejemplo el kit *SureFood® Allergen ID Gluten (R-Biopharm, Alemania)* que permite la detección mediante PCR en tiempo real de trigo, cebada, centeno y avena. Este ensayo declara un LOD de 0,4 mg/kg y un LOQ de 1 mg/kg de los ingredientes alergénicos, si bien los resultados pueden variar en función de la matriz alimentaria, el grado de procesado de la muestra o la pureza del

ADN analizado. Otro kit comercializado es *foodproof*[®] *Gluten Detection Kit -5'Nuclease-* (*BIOTECON Diagnostics*, Alemania) que ofrece la detección específica de trigo, cebada, centeno y triticale con un LOD de 0,1-1 mg/kg.

Teniendo en cuenta todos los antecedentes y estudios previamente expuestos, se puede concluir que la metodología de PCR en tiempo real desarrollada en esta Tesis Doctoral para la detección de cereales con gluten en alimentos presenta una serie de ventajas respecto al resto de trabajos publicados en este ámbito. Este es el primer trabajo que emplea como diana molecular la región del *ITS*, alcanzando límites de detección inferiores o comparables al resto de trabajos de investigación publicados (10-50 mg/kg) y ha demostrado una eficiencia de amplificación semejante para todos los cultivares de trigo, cebada y centeno analizados. Además, el sistema de PCR está específicamente diseñado para no amplificar ADN de avena y obtener de este modo resultados más equiparables a los proporcionados en los ensayos inmunológicos oficiales, que detectan selectivamente las prolaminas de trigo, cebada y centeno. A pesar de la inevitable influencia de los tratamientos de procesado térmico en la detección de los cereales con gluten, la metodología de PCR desarrollada basada en dos límites umbrales de C_p ha demostrado su potencial para la clasificación cualitativa de aquellos alimentos potencialmente peligrosos para los consumidores sensibles ($C_p < 26$) y de productos libres de gluten ($C_p > 33$). Es importante señalar que la aplicabilidad de la técnica de PCR se constató a través de un muestreo amplio y realista de productos comerciales de diferente índole. Este análisis de mercado añade un valor significativo en comparación con otros trabajos publicados donde exclusivamente se analizan mezclas experimentales, y no siempre enriquecidas con las tres especies de cereales con gluten, o la representación de muestras seleccionada es muy reducida.

En conclusión, la metodología de PCR en tiempo real desarrollada en este trabajo puede suponer una herramienta muy útil para complementar los resultados obtenidos mediante los inmunoensayos destinados a la determinación de gluten en alimentos, contribuyendo a verificar el cumplimiento de las reglas de etiquetado y a confirmar la eficacia de los planes de gestión de alérgenos adoptados por las industrias alimentarias.

IV. 3. OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES (dAb) MEDIANTE LA TECNOLOGÍA DE *PHAGE DISPLAY* PARA LA DETECCIÓN DE GLUTEN EN ALIMENTOS

Como ya se ha señalado, una de las herramientas más eficaces para llevar a cabo los análisis rutinarios para la detección de gluten en los alimentos, consiste en el desarrollo de metodologías de base inmunológica encaminadas a detectar las proteínas alergénicas, entre las que destaca principalmente la técnica de ELISA (Scherf y Poms, 2016). Actualmente existen en el mercado multitud de inmunoensayos destinados a este fin que emplean tanto anticuerpos policlonales (como el desarrollado por el Instituto Morinaga de Ciencias Biológicas, MIOBS), como monoclonales (R5, G12, α -20 y Skerrit o 401/21) (Bruins-Slot *et al.*, 2016; Melini y Melini, 2018). Sin embargo, tal y como demuestran diferentes trabajos de investigación, ninguno de los métodos disponibles ha conseguido superar todas las dificultades implicadas en la determinación de gluten, por lo que son múltiples los factores que llevan a dudar de la precisión de estos inmunoensayos (Lexhaller *et al.*, 2016; Rzychon *et al.*, 2017; Scherf, 2017; Tanner *et al.*, 2013a; Thompson y Méndez, 2008; Wieser y Koehler, 2009).

En la actualidad, uno de los grandes retos por resolver, es la elección de los epítomos hacia los que deben dirigirse los métodos de detección con el fin de proporcionar una cuantificación precisa del contenido de gluten en el alimento. A pesar de que no están claramente definidas todas las fracciones nocivas del gluten, hay un elevado número de péptidos derivados de las prolaminas y glutelinas que se han relacionado con la activación de la enfermedad celiaca y otras patologías asociadas con los cereales con gluten (Dewar *et al.*, 2006; Donnelly *et al.*, 2016; Howdle, 2006). En este sentido, se han identificado cientos de péptidos inmunogénicos en las proteínas de trigo, cebada y centeno que son capaces de estimular las células-T del intestino o de la sangre periférica de pacientes celíacos (Cebolla *et al.*, 2018; Sollid *et al.*, 2012). Sin embargo, no todos los péptidos del gluten son igual de nocivos y, además, el número de epítomos presentes puede variar considerablemente en función de los distintos tipos, especies y cultivares de cereal, así como con las condiciones de crecimiento de la planta (Biesiekierski, 2017; Diaz-Amigo y Popping, 2013; Wieser, 2007).

Otros dos grandes obstáculos que influyen directamente en la precisión de la determinación de gluten en alimentos, son la eficacia de los métodos de extracción de las proteínas y la dificultad de producir materiales de referencia normalizados que representen a la muestra lo más fielmente posible. Por ello, el Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad

Alimentaria y Nutrición (AESAN), considera necesario seguir trabajando en el desarrollo de nuevas alternativas que busquen mejorar los métodos ya existentes (Martín *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el tercer objetivo de esta Tesis Doctoral consistió en el desarrollo de una novedosa estrategia de obtención de fago-anticuerpos recombinantes mediante la técnica de *phage display* para la detección de gluten en alimentos. De esta forma, a partir de genotecas sintéticas comerciales de fago-anticuerpos, se seleccionaron sondas de afinidad frente al gluten para el desarrollo de nuevos métodos inmunoenzimáticos (ELISA).

IV. 3. 1. Aislamiento de anticuerpos recombinantes frente al gluten

Gracias al auge de la tecnología de presentación sobre fagos filamentosos o *phage display*, existen en el mercado genotecas de bacteriófagos que expresan en su superficie desde oligopéptidos de secuencia aleatoria hasta fragmentos funcionales de anticuerpos recombinantes (Fab, scFv, dAb, etc.). Una de las principales ventajas de este método alternativo de producción de anticuerpos, es que permite relacionar el fenotipo del fago (proteína exógena expresada) con su genotipo (secuencia nucleotídica que codifica esa proteína). Por ello, esta tecnología ha impulsado el desarrollo de nuevos inmunoensayos basados en anticuerpos monoclonales recombinantes gracias a sus bajos costes de producción y a las grandes posibilidades que ofrece su posterior manipulación mediante técnicas de ingeniería genética (Gupta y Shukla, 2017; Ledsgaard *et al.*, 2018; Rajput *et al.*, 2014).

Desde que a principios de los años noventa se descubriera la existencia de anticuerpos que carecen de cadena ligera en el suero de especies de camélidos (llamas, camellos y vicuñas) (Hamers-Casterman *et al.*, 1993), los denominados nanoanticuerpos o *nanobodies* se han convertido en una herramienta muy prometedora en investigación. Estos fragmentos de anticuerpos recombinantes están formados exclusivamente por el dominio variable de la cadena pesada, por lo que también se les conoce como anticuerpos de dominio único (dAbs, *single-domain antibodies*), y constituyen la fracción de menor tamaño de las inmunoglobulinas con capacidad de unir antígenos. Entre sus principales ventajas, destaca su reducido tamaño, por lo que es sencillo obtener grandes cantidades empleando sistemas de expresión tradicionales. Además, su mayor contenido en residuos hidrofílicos, debido a la ausencia de cadena ligera, les confiere una elevada estabilidad térmica, alta solubilidad y la capacidad de identificar epítomos inusuales (Baghban *et al.*, 2016; Gonzalez-Sapienza *et al.*, 2017). Los dAbs pueden unir antígenos en condiciones extremas, como altas temperaturas o presencia de

detergentes, ya que son capaces de volver a adquirir una conformación activa después de ser desnaturalizados. Por ello, tal y como demostraron Doña *et al.* (2010), estos fragmentos de anticuerpos son especialmente adecuados para el análisis de gluten, donde el proceso de extracción de las prolaminas requiere del uso de detergentes y agentes desnaturalizantes para favorecer la recuperación de aquellas proteínas que hayan podido interactuar con la matriz alimentaria (García *et al.*, 2005; Mujico *et al.*, 2012).

Para llevar a cabo el objetivo planteado en este trabajo, se seleccionó la genoteca de fagos recombinantes, comercializada por *Source Bioscience*, basada en anticuerpos humanos de dominio único (VH3-23/D47). Esta librería sintética no inmune, construida por el grupo del Dr. Daniel Christ (*Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology*) en el fagémido pR2, expresa los fragmentos de anticuerpos fusionados a la proteína menor de recubrimiento pIII del fago M13. La diversidad de los dAbs se introdujo en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR, *complementarity determining region*) mediante mutagénesis dirigida del ADN por PCR (posiciones H27-33, H35, H50, H52-H54, H94, H95-H100(a-k), H101, H102). De esta forma, el tamaño final de la librería ($3 \cdot 10^9$), ofrece un extenso repertorio de fago-anticuerpos, lo que aumenta la probabilidad de encontrar clones de alta afinidad por una determinada diana molecular. Además, la composición de los dAbs de esta librería ha sido especialmente diseñada para minimizar su tendencia a agregar y, aunque la longitud del CDR-3 se ha reducido, mantienen la capacidad de reconocimiento del antígeno (Dudgeon *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2007).

El proceso de obtención de dAbs frente al gluten, se realizó a través de un mecanismo reiterativo denominado *biopanning* que comprende diferentes rondas de selección por afinidad (Parmley y Smith, 1988; Teixeira y Gonzalez-Pajuelo, 2018). Para llevar a cabo este proceso, se pueden plantear diferentes estrategias de selección, variando tanto el tipo de soporte como la diana proteica empleada (por ejemplo extractos proteicos totales o proteínas purificadas) (de la Cruz *et al.*, 2013a; 2015). Una estrategia relativamente novedosa empleada para mejorar la detección de los alérgenos alimentarios en productos procesados, es el uso de anticuerpos obtenidos a partir de un péptido determinado (Cucu *et al.*, 2013). En este caso, para asegurar que la unión antígeno-anticuerpo no se vea afectada, es muy importante seleccionar péptidos estables durante el procesado del alimento, tal y como ocurre en el caso de los péptidos inmunogénicos del gluten, cuyo alto contenido en prolina y glutamina los hace altamente resistentes (Kucek *et al.*, 2015; Tye-Din *et al.*, 2018).

produciendo el sesgo de la librería con anticuerpos de baja afinidad (Hentrich *et al.*, 2018; Ward *et al.*, 1996).

Tras finalizar cada ronda de selección, se calculó el número de fagos recuperados con el fin de estimar el nivel de enriquecimiento de la librería y evaluar el proceso de selección. De ese modo, el número de fagos eluidos tras la segunda ronda experimentó un incremento de 300 veces con relación a los recuperados después de la primera ronda (de 10^7 a $3 \cdot 10^9$ pfu/mL). Este aumento en el número de fagos eluidos conforme se suceden las rondas de selección, es un indicio de que el proceso selectivo se ha producido satisfactoriamente. Para comprobar que se había producido un verdadero enriquecimiento de la genoteca en variantes de fago-anticuerpos que presentaran afinidad por la molécula diana, se realizó un ELISA indirecto para evaluar la capacidad del repertorio de fagos recuperado tras cada ronda para reconocer tanto al péptido consenso y a un extracto proteico de trigo blando (controles positivos), como a la molécula de estreptavidina (control negativo). Los resultados obtenidos en este ELISA policlonal, pusieron de manifiesto que el incremento en el número de fagos eluidos tras la segunda ronda de selección se debía principalmente al enriquecimiento de la librería en fagos con variantes afines al péptido consenso, y no a otras moléculas presentes en el sistema como la estreptavidina (**Figura 1** pág. 124). Asimismo, aunque en menor medida, se observó un enriquecimiento en el número de fagos con capacidad para reconocer el extracto proteico de trigo. En vista de estos resultados, se descartó realizar rondas adicionales de *biopanning* y se procedió al aislamiento de un total de 95 clones individuales a partir de la subpoblación de fagos recuperados de la segunda ronda de selección.

IV. 3. 2. Desarrollo de una técnica de ELISA indirecto basado en fago-anticuerpos recombinantes (dAb) para la detección de gluten en alimentos

Dado que el propósito final de los anticuerpos seleccionados es desarrollar un inmunoensayo para la detección de gluten en alimentos, se requiere que los clones seleccionados presenten afinidad hacia las gliadinas del trigo, pero también hacia las proteínas homólogas presentes en la cebada y el centeno. Por ello, con la intención de seleccionar fagos con la especificidad deseada, se realizó un primer cribado enfrentando cada uno de los 95 clones a extractos proteicos de trigo común, cebada y centeno. Aproximadamente un 20 % de los clones analizados reconocieron el extracto de trigo (18 clones) y de cebada (19 clones), mientras que el porcentaje de clones con afinidad hacia el extracto de centeno fue considerablemente menor (8 clones). Aunando los resultados obtenidos con las tres dianas

proteicas, se seleccionaron un total de 7 clones positivos con capacidad para reconocer simultáneamente los extractos de trigo, cebada y centeno.

Para comprobar la integridad e identidad de los fragmentos de anticuerpos codificados por los fagémidos seleccionados, se secuenció el ADN plasmídico obtenido de estos 7 clones. Los resultados de secuenciación demostraron que se habían seleccionado en total 4 secuencias nucleotídicas diferentes, siendo dos de ellas únicas para un determinado clon (dAb8E y dAb10F), y las otras dos comunes a 2 y 3 clones respectivamente (dAb1H y dAb4B). Como puede observarse en la **Figura 2** (pág. 125), los fagémidos seleccionados codificaban para secuencias aminoacídicas de fragmentos de anticuerpos humanos de dominio único correspondientes con la línea germinal VH3-23 (número de acceso *UniProtKB* P01764.2), demostrando que las regiones marco o *frameworks* (FR) de los clones seleccionados se encontraban mínimamente mutadas.

Una vez reducido a cuatro el número de clones, se purificaron mediante precipitación con polietilenglicol grandes cantidades de los cuatro fagos seleccionados para realizar una caracterización más homogénea de los anticuerpos monoclonales que expresan en su superficie (Yamamoto *et al.*, 1970). Para ello, previamente a la realización de los ensayos de ELISA indirectos, se titularon los fagos precipitados y se optimizó el número de partículas a utilizar en los inmunoensayos, fijándose finalmente en $4 \cdot 10^{11}$ viriones por pocillo.

La adecuada especificidad de estos 4 clones de fago-anticuerpos se comprobó mediante el análisis de un total de 62 muestras de cereales cedidos como muestras de referencia por el CRF-INIA y 35 especies vegetales heterólogas (**Tabla 1** pág. 122). Dentro de las muestras de referencia, se incluyeron diez cultivares diferentes de dos subespecies de trigo hexaploides (trigo blando y espelta), dos subespecies de trigo tetraploides (trigo duro y redondillo), cebada y centeno, así como dos cultivares del híbrido triticale. Tras realizar los ensayos de especificidad con los cuatro clones positivos para gluten, se seleccionaron únicamente dos de ellos para continuar con una caracterización más exhaustiva (dAb8E y dAb4B), dado que fueron los que mostraron un fuerte reconocimiento de todas las muestras de referencia, sin producir reacciones cruzadas con ninguno de los extractos proteicos de las diferentes especies heterólogas analizadas.

Una vez confirmado que los clones dAb8E y dAb4B reconocían los extractos proteicos de cada uno de los diferentes cultivares de cereales con gluten, se realizaron mezclas individuales de las variedades de trigo (n = 40), cebada (n = 10) y centeno (n = 10) para evaluar la capacidad de reconocimiento de los clones cuando la concentración de las dianas empleada en el tapizado

del inmunoensayo disminuía progresivamente. La **Figura 3A-B** (pág. 126) muestra las curvas dosis-respuesta obtenidas tras analizar las diluciones de los extractos proteicos de estas mezclas de referencia con los clones dAb8E y dAb4B, respectivamente. Tal y como se esperaba, ambos fago-anticuerpos reconocieron positivamente a los tres cereales diana. Sin embargo, como puede observarse en la imagen, los valores de absorbancia generados en el análisis de concentraciones bajas de proteína resultaron considerablemente superiores cuando se empleó el clon dAb8E en comparación con el fago-anticuerpo dAb4B, indicando que el primero de ellos presentaría una sensibilidad más acorde a la requerida para llevar a cabo la detección de gluten en alimentos.

Para corroborar estos resultados y obtener los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del ensayo se procedió al análisis de diluciones del patrón de gliadina producido por el Grupo de Trabajo en Prolaminas (PWG, *Prolamin Working Group*). A pesar de los grandes avances que se han realizado en la caracterización de las proteínas de diferentes variedades de trigo, cebada, centeno y avena (Hajas *et al.*, 2018; Schalk *et al.*, 2017), todavía no existe un material de referencia certificado para el gluten. Debido a ello, uno de los puntos críticos en la cuantificación del contenido de gluten consiste en encontrar el patrón adecuado para cada tipo de inmunoensayo (Rosell *et al.*, 2014). Este estándar debería de ser lo más representativo posible de las proteínas analizadas y uno de los materiales más empleado hasta el momento para este fin, es el patrón de gliadina-PWG. Este patrón aislado de 28 variedades de trigo frecuentemente cultivadas en Europa, a pesar de que fue ampliamente caracterizado (van Eckert *et al.*, 2006), no llegó a ser aprobado como un material de referencia de gliadina por el Instituto de Materiales y Medidas de Referencia (IMMR) debido al elevado contenido en gluteninas.

La **Figura 3C** (pág. 126) muestra los resultados obtenidos tras analizar las diluciones del patrón de gliadina-PWG, observándose nuevamente un mejor comportamiento a bajas concentraciones del clon dAb8E (rango lineal 0,01-2,5 µg/mL de gliadina) en comparación con el dAb4B (rango lineal 2-10 µg/mL de gliadina). Siguiendo las directrices de la guía *Eurachem* para la validación de métodos analíticos, el LOD y LOQ se calcularon como la concentración de gliadina que mostró un valor de absorbancia igual al valor medio de absorbancia de diez réplicas del blanco, más tres y diez veces su desviación estándar, respectivamente (Magnusson y Örnemark, 2014). Una vez calculados de esta forma los LODs y LOQs a partir del análisis del patrón de gliadina, se calculó el contenido de gluten al que corresponderían en un producto comercial que hubiera sido sometido a un ELISA indirecto empleando sendos fago-anticuerpos (**Tabla 6**). En base a estos resultados, se descartó seguir trabajando con el clon dAb4B, ya que

el LOD alcanzado en los ELISAS con este fago-anticuerpo fue muy superior al límite máximo establecido para certificar un producto como libre de gluten (20 mg/kg).

Dado que la técnica de ELISA no implica una separación de las proteínas presentes en el extracto alimentario analizado, es importante verificar que el método analítico no se encuentre afectado por el resto de componentes de la matriz alimentaria (Koerner *et al.*, 2013; Oldfield, 2014). Además, se ha demostrado que ciertos ingredientes con altas cantidades de taninos y polifenoles (cacao, café, trigo sarraceno, mijo, especias, etc.), pueden interferir en el proceso de extracción del gluten, por lo que en este tipo de muestras se recomienda el uso de aditivos como la leche desnatada o la gelatina de pescado y la polivinilpirrolidona para facilitar la extracción del gluten (Besler, 2001; Mena *et al.*, 2012). En este trabajo, la idoneidad del inmunoensayo basado en el fago-anticuerpo dAb8E para detectar bajas concentraciones de gluten en una matriz alimentaria, se evaluó mediante el análisis de mezclas binarias de harina de arroz con diferentes concentraciones (0,1-100 mg/g) de un homogeneizado de las especies diana (trigo, cebada y centeno, WBRm). Como ya se ha comentado previamente, teniendo en cuenta el contenido promedio de gluten en estos cereales, se puede estimar que la concentración de gluten en estas mezclas estaría en el intervalo de 10-10 000 mg/kg (asumiendo que las proteínas del gluten suponen un 10 % en peso del cereal). La **Figura 4A** (pág. 127) muestra los resultados del ajuste a una curva sigmoidea de cuatro parámetros de los valores de absorbancia generados frente al logaritmo de la concentración de los cereales en las mezclas binarias (coeficiente de correlación $r^2 = 0,998$). Teniendo en cuenta esta alternativa al patrón de gliadina-PWG basada en mezclas experimentales enriquecidas para calcular el contenido de gluten en las muestras, el LOD y LOQ alcanzados por el fago-anticuerpo dAb8E fue de 0,15 y 0,50 mg/g de la mezcla de cereales WBRm, lo que equivale a una concentración teórica de gluten de 15 y 50 mg/kg, respectivamente. Como puede observarse comparando estos resultados con los datos de la **Tabla 6**, los límites obtenidos mediante ambas aproximaciones resultaron muy similares.

Los tratamientos térmicos aplicados durante el procesado del alimento parecen no alterar la capacidad de las prolaminas para desencadenar una respuesta inmune (Rumbo *et al.*, 2001). Sin embargo, los cambios producidos en el alimento pueden afectar a la detectabilidad de las proteínas mediante técnicas inmunológicas, dado que pueden modificar los epítomos reconocidos por los anticuerpos (Sathe *et al.*, 2005; van Hengel, 2007). Para evaluar la influencia del procesado en la capacidad de detección del fago-anticuerpo dAb8E, se sometió el homogeneizado de cereales WBRm a dos tratamientos térmicos diferentes, uno más suave a

160 °C durante 13 min, y otro más intenso a 200 °C durante 20 min. La comparación de los resultados obtenidos puso de manifiesto cómo, a medida que aumentaba la intensidad del tratamiento térmico aplicado para una misma cantidad de proteína analizada, la sensibilidad alcanzada fue mayor (**Figura 4B** pág. 127). Este aumento de sensibilidad en el análisis de muestras procesadas, puede atribuirse a que las condiciones del tratamiento produzcan determinadas modificaciones estructurales que exponen en mayor medida los epítomos y favorecen su reconocimiento por el anticuerpo (de la Cruz *et al.*, 2013a). Además, este hecho podría sugerir que la selección realizada frente a un péptido concreto haya favorecido la obtención de un fago-anticuerpo que reconozca un epítomo lineal (secuencia continuada de aminoácidos), en lugar de epítomos conformacionales que requieren de una determinada estructura tridimensional para ser reconocidos y por lo tanto, el procesado del alimento puede comprometer su detección (Rowley *et al.*, 2004; van Hengel, 2007).

Tabla 6. Comparación de los límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) obtenidos en el análisis del patrón de gliadina-PWG con los fago-anticuerpos dAb8E y dAb4B mediante la técnica de ELISA indirecto. Se muestran también los niveles de gluten a los que corresponderían dichos límites en un producto comercial analizado mediante estos fago-anticuerpos.

Fago-anticuerpo	LOD gliadina	LOQ gliadina	LOD gluten	LOQ gluten
dAb8E	0,01 µg/mL	0,025 µg/mL	20 mg/kg	50 mg/kg
dAb4B	0,22 µg/mL	0,5 µg/mL	440 mg/kg	1000 mg/kg

No obstante, cabe mencionar que los tratamientos térmicos aplicados afectaron a la capacidad del método de extracción para solubilizar las prolaminas de los cereales, disminuyendo el contenido proteico de los extractos a medida que aumentaba la intensidad del procesado. Este hecho se debe a que, mayoritariamente en los subgrupos de prolaminas que contienen altas cantidades de azufre, el calentamiento produce la reorganización de los enlaces disulfuro, pasando de ser puentes intramoleculares a intermoleculares, lo que produce la formación de grandes agregados de menor solubilidad que llevarían a subestimar el contenido real de gluten (Bugyi *et al.*, 2013; Kanerva, 2011; Rumbo *et al.*, 2001). Usando agentes reductores, se puede mejorar la extracción de este tipo de agregados, sin embargo, hay otras interacciones formadas durante el procesado que no se pueden revertir, como la creación de enlaces isopeptídicos (Rombouts *et al.*, 2010). Por lo tanto, debido a la gran diversidad de matrices y tratamientos de procesado a los que puede someterse un producto alimenticio, la

cuantificación precisa del contenido de gluten en una muestra determinada requeriría una curva estándar basada en una matriz alimentaria lo más similar posible al producto analizado.

IV. 3. 3. **Aplicación del inmunoensayo desarrollado para la detección de gluten en productos comerciales**

Una vez demostrada la eficacia de la técnica de ELISA indirecto basada en el fago-anticuerpo dAb8E para el análisis de las mezclas experimentales de cereales con gluten en harina de arroz, se evaluó su aplicabilidad mediante el análisis de un total de 50 productos comerciales. Para validar los resultados obtenidos, todas las muestras se analizaron en paralelo con el inmunoensayo oficial para la determinación de gluten en alimentos basado en el anticuerpo monoclonal R5 (*RIDASCREEN® Gliadin*, ELISA sándwich).

Para correlacionar las intensidades de absorbancias generadas en el ELISA indirecto con los niveles de gluten en las muestras, se optó por emplear la regresión lineal obtenida con el patrón de gliadina-PWG (**Figura 4C** pág. 127), en lugar de la curva proporcionada por las mezclas experimentales. Esta decisión estuvo principalmente motivada por el hecho de que los patrones suministrados en el inmunoensayo comercial para obtener la curva de calibración, también empleaban dicho material de referencia, por lo que se evitaría la introducción de un mayor número de variables diferentes durante la comparación de los resultados. Dado que para proporcionar una correcta cuantificación del contenido de gluten se requeriría de un extenso trabajo adicional de caracterización de las dianas moleculares reconocidas por el fago-anticuerpo, en esta primera aproximación se ha realizado la clasificación de las muestras entre positivas y negativas en función del LOD alcanzado por ambos inmunoensayos. En este sentido, cabe mencionar que el LOD proporcionado por el fago-anticuerpo (20 mg/kg) fue superior al indicado por el fabricante para el ELISA comercial (2,5 mg/kg).

La **Tabla 2** (pág. 123) recoge los resultados obtenidos del estudio comparativo de ambos inmunoensayos para la detección de gluten en alimentos. Como puede observarse, se obtuvieron resultados coincidentes entre ambos métodos para todos los productos que declaran alguno o varios de los cereales diana como ingrediente y para los que declaraban contener trazas de gluten. Estos resultados pusieron de manifiesto la capacidad del ELISA indirecto basado en el clon dAb8E para detectar la presencia de gluten en diferentes tipos de matrices alimentarias y de productos procesados (chocolates, cereales de desayuno, panes, productos cárnicos, comidas precocinadas, etc.). El análisis de 17 productos comerciales que no indicaban ninguno de los cereales con gluten como ingrediente, produjo resultados

positivos en 12 de las muestras con el fago-anticuerpo dAb8E, mientras que todas resultaron positivas al emplear el anticuerpo R5. Este alto nivel de incumplimiento se debe a que dentro de esta categoría se incluyeron productos a base de avena que no indicaban explícitamente la presencia de gluten, lo que pone de manifiesto que este tipo de productos se encuentran frecuentemente contaminados con niveles de gluten que podrían suponer un riesgo para los consumidores sensibles. De los 15 productos analizados con certificación libre de gluten, el ELISA indirecto produjo resultados positivos para dos de las muestras. La presencia de gluten en estas muestras se confirmó mediante el ELISA sándwich del R5, sin embargo, mediante este método se obtuvieron resultados positivos en una muestra adicional. Estos últimos resultados pusieron de manifiesto las diferencias de sensibilidad encontradas entre ambos métodos, dado que los niveles de gluten cuantificados por el ELISA comercial para las seis muestras negativas en el ensayo basado en el fago-anticuerpo dAb8E resultaron muy cercanos o inferiores al LOD alcanzado (valores de concentración de gluten entre 10,0 y 25,3 mg/kg).

Varios autores han desarrollado técnicas inmunoenzimáticas para la detección de gluten en alimentos haciendo uso de anticuerpos obtenidos frente a fragmentos inmunogénicos de las secuencias de las prolaminas y no de las proteínas purificadas (como es el caso de los anticuerpos monoclonales Skerrit y R5). Por ejemplo, mediante inmunización de ratones con el péptido 19-mer (LGQQQPFPPQYPQPQPF) de la A-gliadina, Ellis *et al.* (1998) obtuvieron el anticuerpo monoclonal PN3 que reconoce al epítipo QQQFPF. Aplicando un ELISA tipo sándwich que empleaba un anticuerpo policlonal frente a las gliadinas como anticuerpo de captura y el PN3 como anticuerpo de detección, consiguieron detectar hasta 4 ng/mL de gliadina, 500 ng/mL de secalinas y 1000 ng/mL de hordeínas y aveninas. Posteriormente, Bermudo-Redondo *et al.* (2005) desarrollaron un ensayo competitivo basado en este mismo anticuerpo monoclonal con el fin de acortar el tiempo necesario para completar el análisis, que alcanzó LODs de 0,128 ng/mL de gliadina, 0,201 ng/mL de secalinas, 0,261 ng/mL de hordeínas y 0,296 ng/mL de aveninas. Uno de los péptidos más estudiados por estar estrechamente implicado con el desarrollo de la enfermedad celiaca, es el 33-mer (LQLQFPFPQLPYPQQLPYPQQLPYPQ PQQPF) (Shan *et al.*, 2002). Empleando esta secuencia, Morón y colaboradores obtuvieron los anticuerpos monoclonales G12 y A1 que reconocen respectivamente los epítipos QPQLPY y QLPYPQP (Morón *et al.*, 2008a; 2008b). Aunque el anticuerpo G12 presentó una mejor afinidad por el péptido 33-mer, la sensibilidad obtenida con el anticuerpo A1 fue superior, probablemente debido a que las secuencias de las prolaminas contienen un mayor número de repeticiones del epítipo que reconoce. Ambos anticuerpos reconocieron las prolaminas de trigo, cebada, centeno y, en menor medida, avena.

El ELISA competitivo que emplea el anticuerpo monoclonal A1 demostró la capacidad de detectar concentraciones de gluten de hasta 0,33 mg/kg en productos alimentarios (Morón *et al.*, 2008b). A día de hoy, la casa comercial *Romer Labs*[®] (Reino Unido) comercializa tiras inmunocromatográficas (*AgraStrip*[®] *Gluten G12*) y un ELISA tipo sándwich que presenta un LOD de 4 mg/kg (*AgraQuant*[®] *ELISA Gluten G12*) para el análisis de gluten basados en el anticuerpo G12. En la bibliografía consultada aparecen otros trabajos donde se describe la obtención de anticuerpos monoclonales mediante la inmunización de ratones con fragmentos de prolaminas, como el publicado por Spaenij-Dekking *et al.* (2004), que emplearon para ello un total de ocho péptidos diferentes presentes en la $\alpha 2/9$ -gliadina y $\gamma 1$ -gliadina. Aunque los autores obtuvieron varios anticuerpos frente a epítomos de las prolaminas estimuladores de células-T, solo uno de ellos, comúnmente conocido como α -20, se ha utilizado para desarrollar un método de ELISA para la detección de α -gliadinas y secuencias homólogas de las prolaminas de cebada y centeno. Este método se comercializa por *Europroxima* (Países Bajos) bajo el nombre de *Gluten-Tec*[®] *ELISA*, y dado que reconoce solo estas fracciones de las prolaminas, el límite de cuantificación se expresa como 3,6 mg/kg de α -gliadina, por lo que no es fácil correlacionar los resultados con la cantidad de gluten presente en las muestras.

Todos estos trabajos, se centraron en el uso de la tecnología de hibridomas para producir anticuerpos monoclonales obtenidos a partir de linfocitos del bazo de ratones inmunizados con secuencias peptídicas de las prolaminas con demostrada capacidad antigénica. Hasta la fecha, son muy escasos los trabajos que hacen uso de fragmentos de anticuerpos recombinantes para la determinación de gluten en alimentos. Doña *et al.* (2010) construyeron una genoteca de fago-anticuerpos a partir del dominio variable de la cadena pesada (VHH) de llamas inmunizadas con el patrón de gliadina comercializado por *Sigma* (EEUU). Gracias a la elevada estabilidad de los dAbs en presencia de etanol y agentes desnaturalizantes, los fragmentos de anticuerpos seleccionados por estos autores mediante la tecnología de *phage display* demostraron la capacidad de detectar la presencia de hasta 0,24 mg/kg de gliadina. Sin embargo, no fueron capaces de reconocer otras prolaminas presentes en cebada y centeno también implicadas en la enfermedad celiaca y no se incluyó la avena en los estudios de especificidad, descartando exclusivamente la reactividad cruzada con soja, arroz y maíz. Recientemente, Stadlmann *et al.* (2015) describieron la obtención de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv, *single chain variable fragment*) a partir de la inmunización de gallinas ponedoras con un preparado de gliadina digerido con pepsina y tripsina. Tras sacrificar a los animales, se aislaron los linfocitos para obtener el material genético (ADNc) que permitiera clonar en el vector de expresión pET28a(+) las cadenas V_H y V_L que conforman un scFv. Los autores analizaron los scFv expresados por varios clones de *E. coli* transformados con la

genoteca producida, demostrando que el fragmento de scFv seleccionado fue capaz de reconocer diferentes variedades de trigo con afinidades muy similares en el rango nanomolar. Sin embargo, la afinidad por el centeno resultó inferior a la obtenida frente al trigo y el scFv no logró detectar los extractos de cebada, maíz, arroz y amaranto. Nuevamente, en este trabajo la avena tampoco se incluyó en los ensayos de especificidad.

Comparando los resultados obtenidos en esta parte de trabajo de investigación con los antecedentes bibliográficos expuestos, podemos concluir que, aunque el ELISA indirecto basado en el fago-anticuerpo dAb8E ha demostrado poseer la especificidad necesaria para permitir la identificación inequívoca de gluten procedente de trigo, cebada y centeno simultáneamente, el LOD alcanzado por el método (20 mg/kg de gluten), fue superior a los LODs obtenidos en otros trabajos o en inmunoensayos comerciales. Sin embargo, es importante resaltar que la estrategia propuesta para la producción heteróloga de dAbs frente al gluten no requiere el uso de animales de experimentación, si no que se fundamenta en el enriquecimiento mediante *phage display* de una genoteca comercial no inmune de fragmentos de anticuerpos producidos sintéticamente. En este sentido, la producción de anticuerpos recombinantes mediante esta metodología se adhiere estrictamente a las recomendaciones de la Directiva 2010/63/UE (transpuesta a la legislación española en el Real Decreto 53/2013) relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Estas normativas establecen como principio general la implementación del “principio de las tres erres”, propuesto por Russel y Burch en 1959, que hace referencia al desarrollo de alternativas de reemplazo, reducción y refinamiento de los procedimientos experimentales llevados a cabo con animales vivos.

Por el contrario, el resto de trabajos bibliográficos citados describen la generación de anticuerpos a partir de la inmunización de animales vivos. En este caso, cuando se activa el sistema inmune de estos organismos tiene lugar un proceso de maduración de la afinidad mediante hipermutación somática y selección de linfocitos con receptores de mayor afinidad. De esta forma, se obtienen de manera natural variantes de anticuerpos con capacidad de unión al antígeno. Por tanto, no es de extrañar que la menor sensibilidad alcanzada en el inmunoensayo con los fago-anticuerpos dAb8E y dAb4B sea consecuencia de haber reemplazado el uso de animales de experimentación por genotecas sintéticas. En este sentido, gracias a que se conocen las secuencias nucleotídicas de los anticuerpos obtenidos mediante técnicas recombinantes, se puede mejorar la afinidad de los fragmentos de anticuerpos seleccionados mediante estrategias de maduración *in vitro*. De esta forma, a partir de los clones obtenidos en este trabajo, existen diferentes alternativas para generar librerías de segunda

generación para introducir variabilidad genética como técnicas de mutagénesis al azar (*error-prone PCR*) o dirigida, o mediante el intercambio de las regiones de las CDRs. La selección mediante *biopanning* de fragmentos de anticuerpos de la librería resultante, frecuentemente produce clones con una mayor afinidad (Hoogenboom, 2005; Kobayashi y Oyama, 2011; Pande *et al.*, 2010; Teixeira y Gonzalez-Pajuelo, 2018; Yuan *et al.*, 2006). Además, dado que los dAbs presentan un menor número de CDRs en comparación con una inmunoglobulina completa, también se puede incrementar su afinidad por la molécula diana produciendo estructuras que imiten a la molécula de IgG, como la fusión de varios anticuerpos de dominio único entre sí o empleando una región Fc que aporte mayor estabilidad a la estructura (Bannas *et al.*, 2017; Gonzalez-Sapienza *et al.*, 2017; Hassanzadeh-Ghassabeh *et al.*, 2013).

Dentro de los posibles tratamientos para la enfermedad celiaca, se está investigando en la posibilidad de producir pequeñas variaciones en las secuencias de aminoácidos para cultivar variedades trigo con un contenido reducido en epítomos inmunogénicos (Gil-Humanes *et al.*, 2014; Jouanin *et al.*, 2018; Shewry y Tatham, 2016). En este contexto, algunos autores proponen desarrollar inmunoensayos con capacidad de cuantificar la presencia de epítomos inmunogénicos presentes en el alimento y no únicamente el contenido total de gluten. De esta manera, se proporcionaría a los consumidores un etiquetado más preciso con relación al potencial nocivo del gluten presente en los alimentos, y se podría ampliar el acceso a una nueva clase de productos alimenticios seguros para los pacientes celiacos. Además, sería interesante poder actualizar los métodos de detección en función del avance de los conocimientos científicos sobre nuevos epítomos relevantes de las prolaminas para los cuales no se disponga de anticuerpos específicos (Bruins-Slot *et al.*, 2016; Röckendorf *et al.*, 2017). En este sentido, es necesario seguir trabajando en el desarrollo de nuevas tecnologías sencillas, rápidas y económicas para la obtención de anticuerpos frente a epítomos inmunogénicos del gluten que presenten una adecuada sensibilidad y especificidad para proporcionar resultados consistentes sobre el contenido de gluten en alimentos.

Con este trabajo, se ha conseguido demostrar que es factible obtener fragmentos de anticuerpos específicos frente al gluten a partir de una genoteca sintética, empleando para el proceso de selección un péptido sintético formado por repeticiones de aminoácidos presentes en las regiones más inmunogénicas de las prolaminas. Por lo tanto, la metodología propuesta en este trabajo supone una alternativa sencilla y rápida para la producción heteróloga de fragmentos de anticuerpos específicos frente al gluten que no requiere del uso de animales de experimentación. Además, los fago-anticuerpos obtenidos se aplicaron exitosamente en

técnicas inmunoenzimáticas para la detección de gluten en alimentos. Sin embargo, sería necesario mejorar la aplicabilidad de los anticuerpos obtenidos mediante técnicas de ingeniería genética para producir la maduración *in vitro* de su afinidad o incluir modificaciones funcionales que permitieran reducir los límites de detección alcanzados.

IV. 4. OBTENCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN PARA LA PRODUCCIÓN EN LA LEVADURA METILOTRÓFICA *Pichia pastoris* DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES (dAb) FRENTE AL GLUTEN CON PROPIEDADES LUMINISCENTES

Los sistemas de expresión procariotas, especialmente *Escherichia coli*, son uno de los métodos más empleados para la producción de fragmentos de anticuerpos recombinantes (Gupta y Shukla, 2017). Sin embargo, estos sistemas presentan algunas limitaciones como su incapacidad para generar modificaciones post-traduccionales, el bajo rendimiento para producir ciertas proteínas eucariotas, la posibilidad de contaminación de la proteína recombinante con endotoxinas bacterianas o su acumulación como cuerpos de inclusión. Además, el ambiente reductor del citoplasma bacteriano impide la formación de puentes disulfuro necesarios para que se produzca el correcto plegamiento de las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas (Baral y Arbabi-Ghahroudi, 2012; Liu y May, 2012). Si bien este hecho puede solventarse expresando los anticuerpos fusionados a un péptido líder que dirija la expresión de las proteínas al espacio periplásmico, donde el ambiente es más oxidativo, frecuentemente se recurre al empleo de sistemas de expresión eucariotas que mejoren la producción del anticuerpo recombinante.

Multitud de sistemas eucariotas se han empleado con éxito para la producción de anticuerpos de dominio único, como por ejemplo levaduras, hongos filamentosos, plantas transgénicas o células de mamífero e insecto (Agrawal *et al.*, 2012; Bazl *et al.*, 2007; de Buck *et al.*, 2012; de Marco, 2015; Joosten *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2018). La levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffi*) posee la habilidad de utilizar metanol como única fuente de carbono y energía, y es por tanto ampliamente utilizada gracias a la disponibilidad del promotor de la enzima alcohol oxidasa (AOX), que es uno de los más fuertemente inducibles y regulables por la presencia de metanol en el medio (Serrano-Rivero *et al.*, 2016). Esta levadura presenta la ventaja de que puede realizar modificaciones post-traduccionales (glicosilación, formación de puentes disulfuro o procesamiento proteolítico), pero mantiene a la vez algunos beneficios de los sistemas procariotas como facilidad de manipulación genética, rápido crecimiento celular, procesos de fermentación escalables y bajo coste de producción (Daly y Hearn, 2005; Nylén y Chen, 2018). Además, *P. pastoris* puede expresar las proteínas

recombinantes en el medio intracelular o secretarlas al medio de cultivo, lo que facilita las etapas posteriores de purificación gracias a que secreta bajas cantidades de proteínas endógenas. Otra de las características que hacen de esta levadura un organismo ideal para la expresión de proteínas recombinantes es que puede integrar múltiples copias de ADN externo en su genoma, produciendo transformantes estables. Por otro lado, como posibles inconvenientes en el empleo de *P. pastoris*, cabe citar que no sintetiza chaperonas (implicadas en el plegamiento de ciertas proteínas), y que puede producir la hiperglicosilación de la proteína (Damasceno *et al.*, 2012; de la Cruz, 2017).

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriormente expuestas, el último objetivo de esta Tesis Doctoral consistió en la obtención de vectores de expresión para producir anticuerpos de dominio único (dAbs) fusionados genéticamente a proteínas con propiedades luminiscentes en la levadura *P. pastoris*. Esta medida tiene como finalidad mejorar la funcionalidad de los dAbs obtenidos en el **Capítulo III.4** (pág. 103) para la detección de gluten en alimentos, ya que demostraron una aplicabilidad limitada cuando se emplearon en la técnica de ELISA fusionados a la proteína pIII del fago filamentoso M13 (Morino *et al.*, 2001).

En este sentido, algunos autores han demostrado mejoras en los límites de detección de los ELISA convencionales al emplear anticuerpos marcados con moléculas y proteínas fluorescentes en los ensayos denominados FLISA (*Fluorescence-Linked ImmunoSorbent Assay*) (Sakamoto *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2014). Además, la disponibilidad de la secuencia nucleotídica de los anticuerpos permite incluir grupos funcionales a través de su fusión genética con proteínas marcadoras u otras moléculas como biotina con una estequiometría definida y en posiciones específicas. Esta estrategia supone una gran ventaja frente a los métodos de conjugación química, ya que estos últimos pueden modificar el sitio de reconocimiento del epítipo y no permiten producir reactivos uniformes utilizables con fines cuantitativos por la dificultad de controlar el número de moléculas incorporadas (Kusharyoto *et al.*, 2018).

Algunas de las proteínas marcadoras más empleadas son las luciferasas, enzimas que tienen la propiedad de generar luz durante la reacción de oxidación del sustrato. Dos de las luciferasas mejor caracterizadas son las denominadas *Firefly* y *Renilla*, enzimas intracelulares que emplean como sustrato la luciferina y la coelenteracina, respectivamente (Liu *et al.*, 1997; Sherf *et al.*, 1996; Venisnik *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2014). Dentro del grupo de las luciferasas que son secretadas de forma natural se encuentra *Gaussia princeps*, que fue aislada de las glándulas de una subclase de crustáceos marinos de pequeño tamaño. Este tipo de luciferasas han sido

ampliamente estudiadas dado que permiten detectar su presencia en el medio de cultivo sin necesidad de lisar las células (Knappskog *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 1989; Venisnik *et al.*, 2007; Verhaegent y Christopoulos, 2002). Recientemente, la casa comercial *Invivogen* (San Diego, CA, EEUU) ha producido una luciferasa sintética, exitosamente secretada por células mamíferas, que exhibe una mayor intensidad de luminiscencia en comparación con las luciferasas naturales (Invivogen, 2012).

Otro grupo de proteínas ampliamente utilizado para producir anticuerpos marcados son las proteínas con propiedades fluorescentes ya que presentan la ventaja de que no necesitan el uso de cofactores o sustratos para generar luz (Scott *et al.*, 2018). La primera proteína fluorescente aislada fue la GFP (*green fluorescent protein*). Sin embargo, el posterior descubrimiento de proteínas fluorescentes que emiten luz a longitudes de onda diferentes de la GFP ha permitido desarrollar ensayos con capacidad de monitorizar varios eventos a la vez (Rodrigues *et al.*, 2001). Las proteínas rojas fluorescentes (RFP) surgieron con el descubrimiento de la proteína DsRed y, debido a que tiende a formar tetrámeros, se ha trabajado en el desarrollo de proteínas monoméricas derivadas de DsRed con propiedades mejoradas (**Figura 16**) (Bevis y Glick, 2002; Shaner *et al.*, 2008; Shrestha y Deo, 2006; Strack *et al.*, 2008).

Entre la extensa variedad de proteínas marcadoras que exhiben propiedades luminiscentes, en este trabajo de investigación se seleccionaron la luciferasa sintética Lucia y las proteínas rojas fluorescentes denominadas DsRed-Express2 y mCherry, para obtener proteínas quiméricas de los anticuerpos frente al gluten dAb8E y dAb4B (**Figura 16**).

Para llevar a cabo este último objetivo, se empleó un plásmido aceptor derivado del vector pPIC α B, utilizado para producir proteínas recombinantes expresadas en el medio extracelular de *P. pastoris* ya que contiene la señal pre-pro del factor alfa de *S. cerevisiae*, que dirige la expresión de la proteína hacia la ruta secretora de la levadura (Lin-Cereghino *et al.*, 2013). Además, este vector incorpora un epítipo c-myc y una cola de polihistidina en el extremo C-terminal de la proteína que facilitan el proceso de purificación y la determinación de su nivel de expresión. Los principales elementos reguladores del plásmido seleccionado (promotor AOX y péptido pre-pro del factor alfa) han demostrado una alta eficiencia para la secreción de proteínas fluorescentes, tal y como demostraron Obst *et al.* (2017) tras la comparación de los niveles de secreción de 124 construcciones diferentes que expresaban las proteínas RFP y γ EGFP.

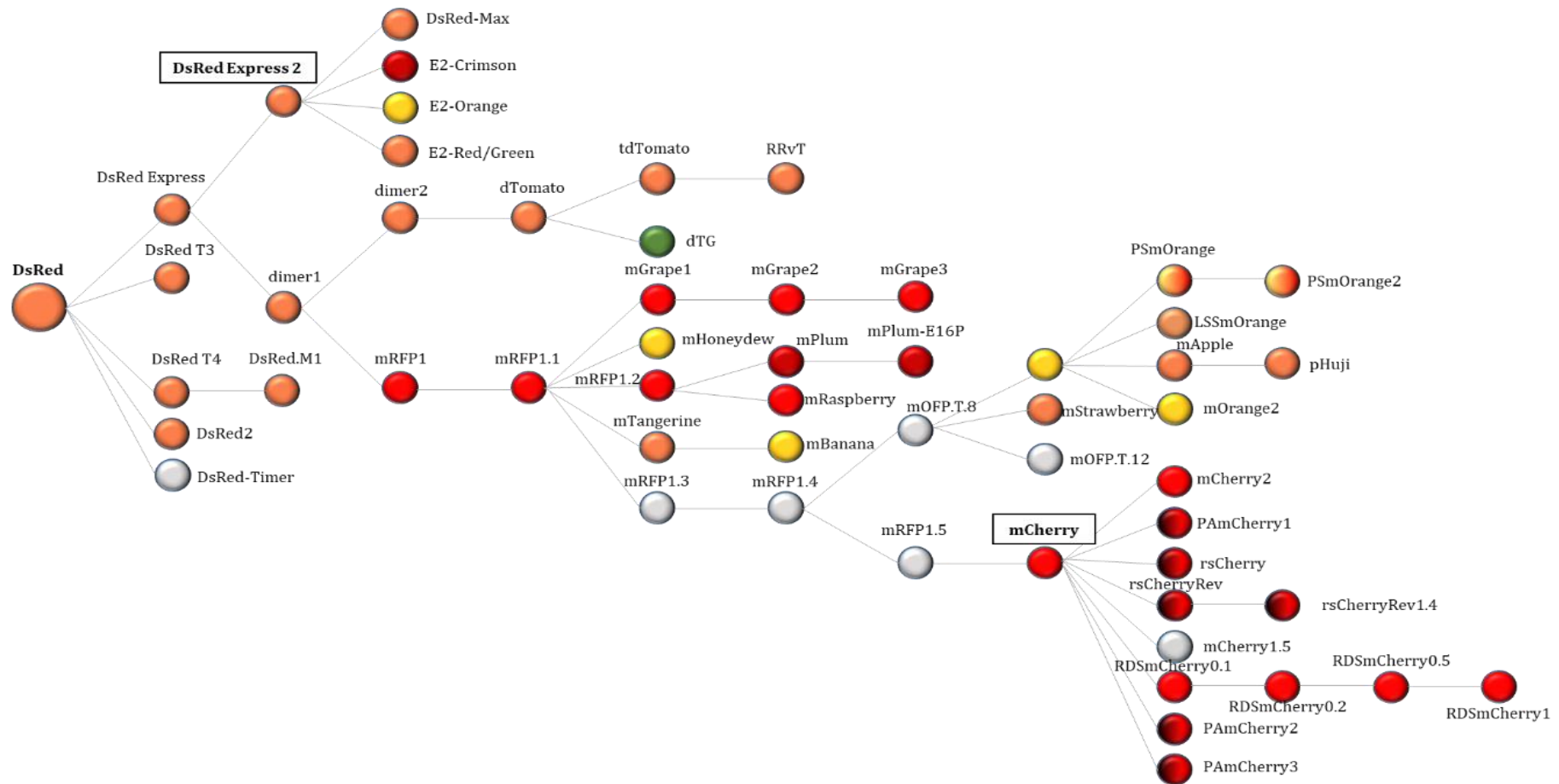


Figura 16. Familia de proteínas fluorescentes derivadas de DsRed. Los círculos muestran el color de longitud de onda de excitación/emisión de la proteína. Las dos proteínas seleccionadas en este trabajo de investigación están resaltadas (adaptado de la base de datos FPbase, www.fpbase.org).

En primer lugar, se clonaron las secuencias codificantes de los fragmentos de anticuerpo dAb8E y dAb4B a partir de la información genética contenida en el fagémido pR2 de ambos clones. Los nuevos plásmidos generados se transformaron en células competentes de *P. pastoris* y se seleccionaron clones individuales para verificar mediante *dot blot* que fueran productores de los dAbs solubles. Como puede observarse en la **Figura 3A** (pág. 149), los sobrenadantes obtenidos de la inducción a pequeña escala de 5 clones de cada transformación mostraron una coloración intensa al revelar la membrana con un anticuerpo anti-c-myc. Además, se confirmó mediante *Western blot* que la proteína reconocida por este anticuerpo tenía un peso molecular próximo al tamaño esperado para un dAb (15 kDa) **Figura 3B** (pág. 149). Por tanto, estos resultados indicaron que *P. pastoris* fue capaz de secretar eficazmente los fragmentos de anticuerpo solubles.

Con el fin mejorar la aplicabilidad de los dAbs seleccionados, se construyeron seis plásmidos adicionales para fusionar los anticuerpos a las proteínas marcadoras Lucia, DsRed-Express2 y mCherry en su extremo C-terminal. Cuando se producen proteínas de fusión es necesario incluir un espaciador o *linker* de composición y longitud adecuadas para favorecer el plegamiento independiente de cada una de las partes. En este trabajo se seleccionó el espaciador (Gly₄Ser)₂ dado que otros autores lo han empleado con éxito para obtener construcciones similares (Huang y Shusta, 2006; Kusharyoto *et al.*, 2018; Sakamoto *et al.*, 2011). La secuenciación de los vectores obtenidos en este trabajo permitió comprobar la correcta orientación de los insertos y el mantenimiento del marco de lectura. La **Tabla 2** (pág. 146) recoge los vectores de expresión construidos y la **Figura 2** (pág. 148) ilustra su composición y las secuencias aminoacídicas de las proteínas que codifican.

Un total de 24 clones de cada una de las transformaciones quiméricas dAb-Lucia se indujeron a pequeña escala y los sobrenadantes se analizaron mediante la adición de *QUANTI-Luc™*, un reactivo optimizado para detectar en el medio la presencia de la luciferasa Lucia y otras enzimas similares que usen la coelenteracina como sustrato. Por tanto, la intensidad de luz emitida será directamente proporcional al nivel de expresión de la proteína recombinante. Los valores de luminiscencia registrados en los sobrenadantes de estos clones mostraron intensidades muy superiores en comparación con los sobrenadantes de clones transformados con las proteínas de la familia RFP (**Figura 4A** pág. 150). Por tanto, los resultados demostraron que *P. pastoris* fue capaz de secretar proteínas con actividad luciferasa, aunque sería necesario realizar un estudio más amplio para comprobar la identidad completa de la proteína recombinante y evaluar si el anticuerpo mantiene la capacidad de reconocimiento del antígeno.

De forma análoga, se evaluaron los sobrenadantes de los clones transformados con las dos proteínas rojas fluorescentes seleccionadas. Cabe mencionar que en este caso, durante el segundo y tercer día de inducción con metanol se observó visualmente un cambio de color hacia tonalidades rojizas en las células y sobrenadantes de algunos de los clones. La comparación de los niveles de fluorescencia entre el medio de cultivo y los sobrenadantes centrifugados (sin células), puso de manifiesto que los dAbs fusionados a la proteína mCherry parecían secretarse correctamente al medio de cultivo de *P. pastoris*. Sin embargo, el nivel de secreción de las quimeras dAb-DsRedExpress2 fue significativamente menor, dado que los valores de fluorescencia registrados en los sobrenadantes de estos clones fueron prácticamente indetectables (**Figura 4B-D** pág. 150).

En este sentido, se ha descrito que la secreción de proteínas heterólogas en *P. pastoris* puede conducir a la acumulación de la proteína recombinante en el interior celular a pesar de ir precedida de un péptido líder como la señal pre-pro del factor alfa. En este caso, la proteína expresada suele quedarse retenida en el retículo endoplásmico o en el aparato de Golgi, orgánulos celulares implicados en la ruta de secreción de la levadura, originando el efecto conocido como “cuello de botella” que disminuye enormemente la producción extracelular de la proteína (**Figura 17**) (Lin-Cereghino *et al.*, 2013; Obst *et al.*, 2017).

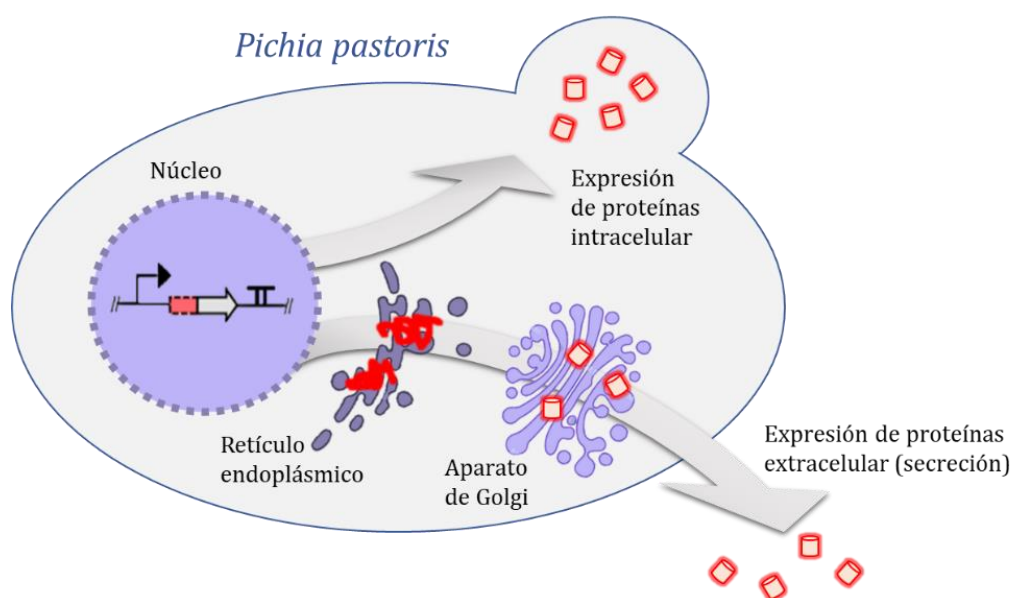


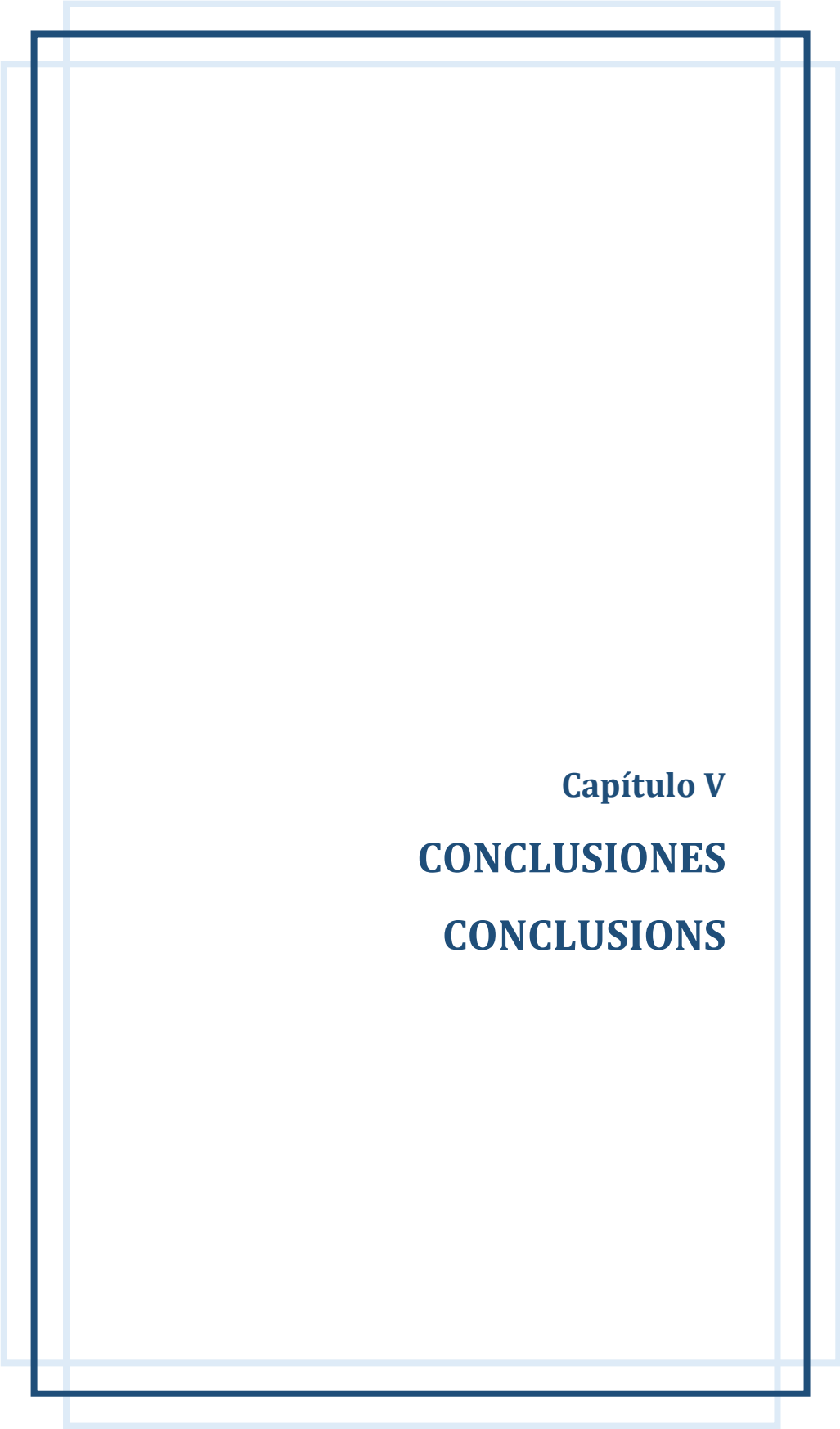
Figura 17. La levadura *Pichia pastoris* puede expresar proteínas recombinantes de manera intracelular o extracelular. La ruta de secreción involucra el paso de las proteínas por diferentes orgánulos celulares, como el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, lo que ofrece la posibilidad de obtener proteínas con modificaciones post-traduccionales pero también puede dar lugar al efecto de “cuello de botella” que bloquea la ruta de secreción.

La inducción de volúmenes más grandes de un clon de *P. pastoris* transformado con la proteína de fusión dAb8E-mCherry permitió purificar mediante una columna de afinidad de níquel cantidades de proteína suficientes para realizar una mejor caracterización de esta proteína. La separación electroforética de las fracciones obtenidas tras la purificación y su posterior análisis por *Western blot*, evidenció la presencia de una banda proteica del tamaño esperado (aproximadamente 41,6 kDa) satisfactoriamente reconocida por el anticuerpo anti-HisTag (**Figura 5A** pág. 151). Además, la solución resultante de unificar y dializar las diferentes fracciones, mostró un intenso color morado sin formación aparente de agregados insolubles. El análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF de la banda del gel de poliacrilamida confirmó la identidad de la proteína quimérica, ya que los péptidos reconocidos pertenecieron tanto al dAb8E (incluyendo la secuencia del CDR2) como a la mCherry, cubriendo en conjunto un 30 % de la secuencia proteica (**Figura 5B-C** pág. 151). Para evaluar el rendimiento de la producción, se cuantificó la concentración de proteína purificada con un kit comercial basado en patrones de concentración conocida de albúmina sérica bovina (BSA). Los 150 mL de sobrenadante obtenidos proporcionaron un total de 13 mg de proteína, lo que supuso un rendimiento de 86 mg/L. Generalmente, *P. pastoris* es capaz de producir grandes cantidades de proteína recombinante, llegando incluso al orden de g/L en algunos estudios. Cabe mencionar que no se ha encontrado ningún trabajo publicado que describa la producción de un fragmento de anticuerpo fusionado a la proteína mCherry empleando como sistema de expresión la levadura *P. pastoris*. Tras la revisión bibliográfica de trabajos similares donde se describe el empleo de *E. coli*, *S. cerevisiae* o células de mamífero e insecto para la producción de fragmentos de anticuerpo fusionados a proteínas fluorescentes (Huang y Shusta, 2006; Kusharyoto *et al.*, 2018; Markiv *et al.*, 2011; Peipp *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2010), se concluyó que el rendimiento obtenido al emplear *P. pastoris* fue superior al declarado en el resto de publicaciones.

Por último, para evaluar la aplicabilidad del anticuerpo fluorescente dAb8E-mCherry para el análisis de gluten en alimentos, se analizaron diluciones del patrón de gliadina-PWG. A pesar de que en el formato de ELISA empleado no resultó posible basar la medida en el nivel de fluorescencia generado por el anticuerpo, se consiguió alcanzar un LOD de 3 µg/mL de gliadina cuando se reveló el inmunoensayo con el anticuerpo secundario anti-HisTag (**Figura 5D** pág. 151). Estos resultados demostraron que *P. pastoris* fue capaz de producir dAbs fusionados a la proteína fluorescente mCherry que mantienen la funcionalidad de ambas proteínas. Sin embargo, con la plataforma de ELISA utilizada no se ha conseguido mejorar la sensibilidad alcanzada en experimentos anteriores con el fago-anticuerpo dAb8E (LOD 0,01 µg/mL de gliadina-PWG).

Por tanto, es necesario seguir trabajando en esta línea de investigación para mejorar los anticuerpos ya obtenidos o seleccionar otros nuevos que presenten mayor afinidad hacia las proteínas del gluten. En este sentido, sería interesante disponer de vectores de expresión universales que pudieran incorporar fragmentos de anticuerpo obtenidos en experimentos futuros del grupo de investigación. Con el propósito de intercambiar la secuencia nucleotídica del anticuerpo en el plásmido que expresa la proteína dAb8E-mCherry (pMJA304) por otro inserto diferente, sería necesario digerir el vector con las enzimas *PstI/NotI*. No obstante, esta estrategia no podría realizarse debido a que la secuencia que codifica para la proteína mCherry presenta un sitio de restricción *PstI* interno. Por ello, se modificó mediante mutagénesis dirigida la identidad de uno de los nucleótidos de esta región para obtener el nuevo plásmido pMJA304m (**Figura 6** pág. 152). De esta manera, el nuevo plásmido generado podría digerirse con las enzimas *PstI/NotI* para eliminar mediante electroforesis el inserto dAb8E y poder clonar otras secuencias fusionadas a la proteína mCherry.

El empleo de los vectores de expresión generados en este trabajo de investigación abre la posibilidad al diseño de nuevas técnicas de análisis que permitan hacer uso de las propiedades de los anticuerpos quiméricos fusionados a la luciferasa Lucia y a las proteínas rojas fluorescentes mCherry y DsRed-Express2 para la detección de gluten en alimentos. Además, la construcción de vectores similares en los que se intercambien estas proteínas fluorescentes por otras con espectros de excitación/emisión diferentes, como las proteínas verdes (GFP, EGFP o Sapphire), azules (BFP, mCerulean o mKalama) o amarillas (mBanana, mCitrine o mVenus), daría lugar a una potente plataforma para generar una amplia gama de anticuerpos fluorescentes que permitan el desarrollo de ensayos con capacidad de detección de múltiples dianas.



Capítulo V
CONCLUSIONES
CONCLUSIONS

Primera. La técnica de amplificación dependiente de ligasa de múltiples sondas (MLPA) ha permitido la detección múltiple y específica de ADN procedente de diferentes especies vegetales con potencial alergénico en los alimentos. El sistema MLPA de semillas diseñado en la región espaciadora interna de la transcripción (ITS) del ARN ribosómico permitió detectar simultáneamente la presencia de girasol, amapola, lino, sésamo y soja con un límite de detección (LOD) de 10 mg/kg. Por otra parte, el sistema MLPA de cereales diseñado en la región ITS de avena y cebada, y en los genes de la glutenina del trigo y la ω -secalina de centeno, identificó la presencia simultánea de hasta 50 mg/kg de estos cuatro cereales de declaración obligatoria en el etiquetado de alérgenos.

Segunda. El análisis de una amplia variedad de productos comerciales mediante los dos sistemas de MLPA desarrollados, y la posterior confirmación de los resultados por PCR en tiempo real, puso de manifiesto la presencia de alérgenos no declarados en más de un 30 % de las muestras analizadas, demostrando la aplicabilidad de esta novedosa metodología para la detección múltiple de alérgenos alimentarios.

Tercera. La técnica de PCR en tiempo real con cebadores específicos y sonda Taqman diseñados en la región ITS del ARN ribosómico de trigo, cebada y centeno ha permitido la detección conjunta de ADN procedente de las tres principales especies de cereales con gluten en los alimentos con un LOD en el intervalo de 10-50 mg/kg, equivalente a una concentración teórica de gluten de entre 1-5 mg/kg. El análisis de una amplia muestra de productos comerciales y la posterior validación de los resultados con el inmunoensayo de ELISA basado en el anticuerpo monoclonal R5, puso de manifiesto la capacidad de la técnica de PCR en tiempo real para discriminar productos con alérgenos no declarados que podrían superar el límite legal de 20 mg/kg de gluten, así como para confirmar los alimentos libres de gluten.

Cuarta. Se han obtenido por primera vez sondas de afinidad específicas frente al gluten a partir de una genoteca no inmune de anticuerpos de dominio único (dAbs). El fago-anticuerpo dAb8E, se ha empleado con éxito en un método de ELISA indirecto para la detección específica de gluten procedente de trigo, cebada y centeno, alcanzándose un LOD de 20 mg/kg de gluten. Esta estrategia de obtención de anticuerpos es congruente con la normativa actual sobre protección de animales de experimentación, por lo que representa una interesante alternativa al desarrollo de anticuerpos mediante métodos dependientes de inmunización *in vivo*.

Quinta. Los vectores de expresión obtenidos para la producción de anticuerpos de dominio único frente al gluten fusionados genéticamente a la luciferasa Lucia y a las proteínas rojas fluorescentes mCherry y DsRed-Express2, han permitido evaluar el nivel de secreción de dichas proteínas recombinantes, siendo este trabajo el primer estudio que describe la producción de este tipo de anticuerpos quiméricos empleando la levadura *Pichia pastoris*. Estos anticuerpos abren la posibilidad al diseño de nuevas plataformas analíticas para la determinación de gluten en alimentos.

Sexta. Las metodologías analíticas desarrolladas en este trabajo de investigación basadas en el análisis de ADN y de proteínas de especies alergénicas de origen vegetal, han demostrado ser potentes herramientas que pueden emplearse para garantizar la trazabilidad de los productos comercializados, detectar posibles fraudes alimentarios y verificar el cumplimiento de la normativa de etiquetado de ingredientes alergénicos para proteger la salud de los consumidores sensibles.

First. The multiplex ligation-dependent probe amplification technique has enabled multiple and specific detection of DNA from different plant species with allergenic potential in foods. The seeds MLPA system, designed in the internal transcribed spacer (ITS) region from ribosomal RNA, allowed simultaneous detection of sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy with a limit of detection (LOD) of 10 mg/kg. On the other hand, the cereals MLPA system, designed in oats and barley ITS region and in wheat glutenin and rye ω -secalin genes, identified the simultaneous presence of up to 50 mg/kg of these four cereals that must be declared in allergen labelling.

Second. The analysis of a wide variety of commercial food products by means of the two MLPA systems developed, and the subsequent confirmation of the results by real-time PCR, revealed the presence of undeclared allergens in more than 30 % of the analysed samples, proving the applicability of this novel methodology for multiple detection of food allergens.

Third. The real-time PCR technique with specific primers and Taqman probe designed in the ribosomal RNA ITS region of wheat, barley and rye has allowed concurrent detection of DNA from the three main gluten containing-cereal species in foods with a LOD in the range of 10-50 mg/kg, equivalent to a theoretical gluten concentration of 1-5 mg/kg. Analysis of a broad selection of commercial food products and subsequent validation of the results by means of the R5 monoclonal antibody-based ELISA revealed the ability of the real-time PCR technique to discriminate products with undeclared allergens that could exceed the legislated limit of 20 mg/kg of gluten, as well as to confirm gluten-free foods.

Fourth. Gluten-specific affinity probes have been obtained for the first time from a naïve library of single-domain antibodies (dAbs). The phage-antibody dAb8E has been successfully employed in an indirect ELISA method for the specific detection of gluten from wheat, barley and rye, achieving a LOD of 20 mg/kg of gluten. This antibody production strategy is congruent with current regulations on the protection of experimental animals and therefore represents an interesting alternative to antibodies produced by using *in vivo* immunization methods.

Fifth. The expression vectors obtained for the production of single domain antibodies against gluten genetically fused to the Lucia luciferase and the red fluorescent proteins mCherry and DsRed-Express2, have enabled to evaluate the secretion level of these recombinant proteins, resulting in the first study describing the production of this class of chimeric antibodies using the yeast *Pichia pastoris*. These antibodies open the possibility to design new analytical platforms for gluten analysis in foods.

Sixth. The analytical methodologies developed in this work, based on the analysis of both DNA and protein from allergenic plant species, have proven to be powerful tools which may be used to guarantee traceability of marketed products, detect possible food frauds and verify compliance with allergen labelling regulations to ensure protection of sensitive consumers.



Capítulo VI
TRABAJO FUTURO

Incremento de la sensibilidad de los anticuerpos recombinantes obtenidos frente al gluten mediante técnicas de maduración *in vitro* de la afinidad

Como continuación de la presente Tesis Doctoral, se propone mejorar la afinidad de los anticuerpos seleccionados gracias a la ventaja que ofrece la tecnología de anticuerpos recombinantes de disponer de las secuencias que codifican para los dAbs obtenidos. Para este propósito, existen diferentes estrategias de ingeniería genética encaminadas principalmente a la modificación de las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) del anticuerpo, como la mutagénesis al azar, la mutagénesis dirigida o el intercambio de CDRs completas. La elección de una estrategia u otra, se basará en un estudio preliminar de la interacción de los dAbs con su molécula diana, para lo que se determinarán los epítomos reconocidos por los anticuerpos y los residuos de las CDRs implicados en dicha unión.

Con este fin, se propone el empleo de las librerías de péptidos *Ph.D.TM-7* y *Ph.D.TM-12* comercializadas por *New England Biolabs* (Ipswich, MA, EEUU), que están basadas en genotecas combinatoriales de heptapéptidos y dodecapéptidos aleatorios fusionados a la proteína de recubrimiento menor pIII del fago M13 mediante el espaciador Gly4Ser (Rami *et al.*, 2017). Mediante la realización de rondas de selección por afinidad de estas librerías frente a los anticuerpos dAb8E y dAb4B, será posible identificar los epítomos que reconocen a través del análisis de las secuencias genómicas de los fagos recuperados en el proceso. Una vez conocidos los epítomos, se analizarán las secuencias de las prolaminas y glutelinas disponibles en las bases de datos para identificar las fracciones proteicas del gluten que podrían ser reconocidas. Asimismo, se utilizarán técnicas de fraccionamiento cromatográfico, *Western blot*, ELISA y MALDI-TOF/TOF para confirmar los resultados teóricos obtenidos.

Para definir el mecanismo de acción de los anticuerpos e identificar su parátomo, será necesario disponer de su estructura tridimensional. En los últimos años se han desarrollado varios servidores gratuitos para realizar el modelado molecular de anticuerpos *in silico*: *Rosie* (<http://rosie.graylab.jhu.edu/>), *Rosetta* (www.rosettacommons.org), PiGS (<http://circe.med.uniroma1.it/pigs/>), etc. La **Figura 18** muestra los modelos teóricos obtenidos con el servidor *Rosetta* para los clones dAb8E y dAb4B, así como para uno de los clones descartados por generar reactividad cruzada con otras especies heterólogas (dAb1H). La comparación entre estos modelos permitirá realizar hipótesis sobre el tipo de interacciones que se producen entre el anticuerpo y el antígeno. Una vez que se disponga de la secuencia concreta del epítomo reconocido, estos servidores también permitirán realizar estudios de *docking* o de acoplamiento computacional del complejo antígeno-anticuerpo para predecir los residuos del

anticuerpo implicados en la unión (Pedotti *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta los datos obtenidos de estos modelos teóricos, se diseñarán estrategias para mejorar la afinidad de los anticuerpos dAb8E y dAb4B con el fin de incrementar la sensibilidad de la técnica. Además, conocer los epítomos y las fracciones proteicas del gluten reconocidos por los anticuerpos, permitirá aplicar factores de corrección más apropiados para convertir los valores de absorbancia generados en los inmunoensayos con el contenido de gluten de la muestra.

Obtención de anticuerpos recombinantes frente al gluten procedentes de una genoteca construida a partir del suero de pacientes celíacos

Otra propuesta para obtener anticuerpos monoclonales con características analíticas mejoradas, consistirá en seleccionar nuevos fragmentos de anticuerpos a partir de una genoteca inmune de fago-anticuerpos en sustitución de la genoteca sintética empleada en esta Tesis Doctoral. Dado que no se dispone comercialmente de este tipo de librerías específicas, en primer lugar se llevará a cabo la construcción de una genoteca de anticuerpos recombinantes a partir de linfocitos de sangre periférica (PBLs) de pacientes celíacos (Frenzel *et al.*, 2014). Con este propósito, nuestro grupo de investigación ha contactado con profesionales del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz para colaborar estrechamente en la consecución de este objetivo. En primer lugar, se identificarán los donantes apropiados para este estudio mediante análisis serológicos y genéticos. Se seleccionarán un total de 2 o 3 individuos de cada uno de los siguientes grupos: pacientes celíacos diagnosticados (grupo CD) y pacientes celíacos que no han experimentado mejoras tras llevar una dieta libre de gluten (grupo GF-CD), es decir, individuos que presentan enfermedad celíaca refractaria (Al-Bawardy *et al.*, 2017; Vivas y Ruiz, 2008). En colaboración con el hospital, y con consentimiento informado de los candidatos, se obtendrá el material biológico (suero y sangre) de aquellos pacientes que presenten títulos elevados de anticuerpos anti-gliadina y anti-tTG (transglutaminasa tisular). Para asegurar la diversidad y complejidad de la genoteca, se extraerán entre 100 y 200 mL de sangre de cada donante y se purificará la fracción de PBLs con el kit comercial *Lymphoprep*[™] (*STEMCELL Technologies*, Canadá). Una vez aislado el ARN de cada muestra, se determinará su integridad y se generará el ADN complementario (ADNc). A partir de este material genético se obtendrán mediante PCR con cebadores específicos los genes correspondientes a las cadenas pesadas (V_H) y ligeras (V_L) de los isotipos más relevantes (IgG e IgA). El repertorio de fragmentos de ADN resultante se clonará en vectores de expresión procariotas (fagémidos) para obtener una genoteca de Fabs (V_L - C_L + V_H - C_{H1}) capaz de mantener y expresar cada una de las combinaciones posibles. El conjunto de fagémidos obtenido se

transformará en *E. coli* mediante electroporación, constituyendo así la genoteca de anticuerpos recombinantes. La infección de dichas bacterias con fagos M13 defectivos, dará lugar a la generación de amplias colecciones de partículas virales en las que cada clon exprese en su superficie un anticuerpo determinado y puedan someterse a rondas de selección para obtener anticuerpos recombinantes con afinidad por diferentes proteínas o péptidos inmunogénicos del gluten. La **Figura 19** muestra un esquema del procedimiento descrito.

Previsiblemente, esta genoteca de fago-anticuerpos obtenida a partir de donantes inmunizados, permitirá el aislamiento de anticuerpos que presenten una mayor especificidad y afinidad hacia las proteínas del gluten, ya que asegura la obtención de anticuerpos que han sido somáticamente madurados frente al antígeno.

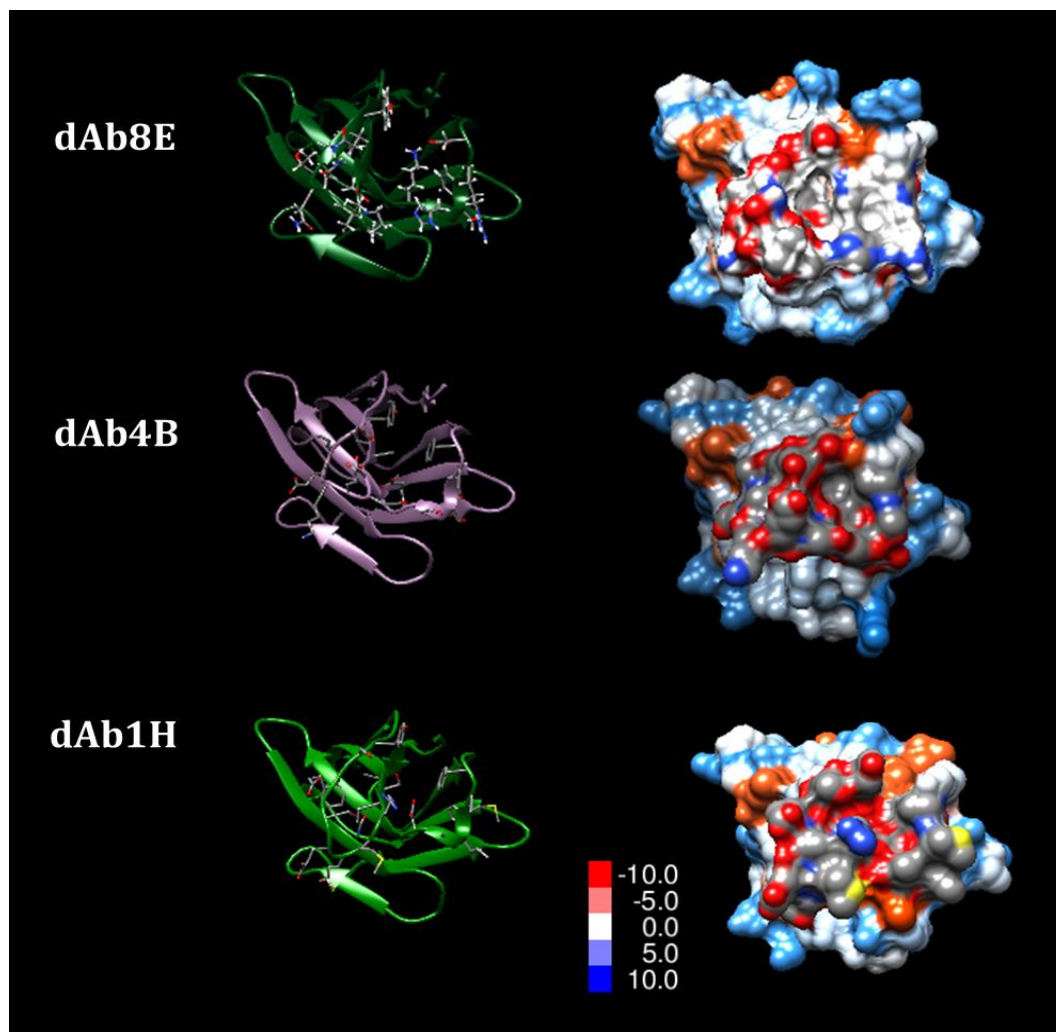


Figura 18. Modelado de los anticuerpos de dominio único (dAbs) frente al gluten obtenidos en esta Tesis Doctoral empleando el servidor Rosetta.

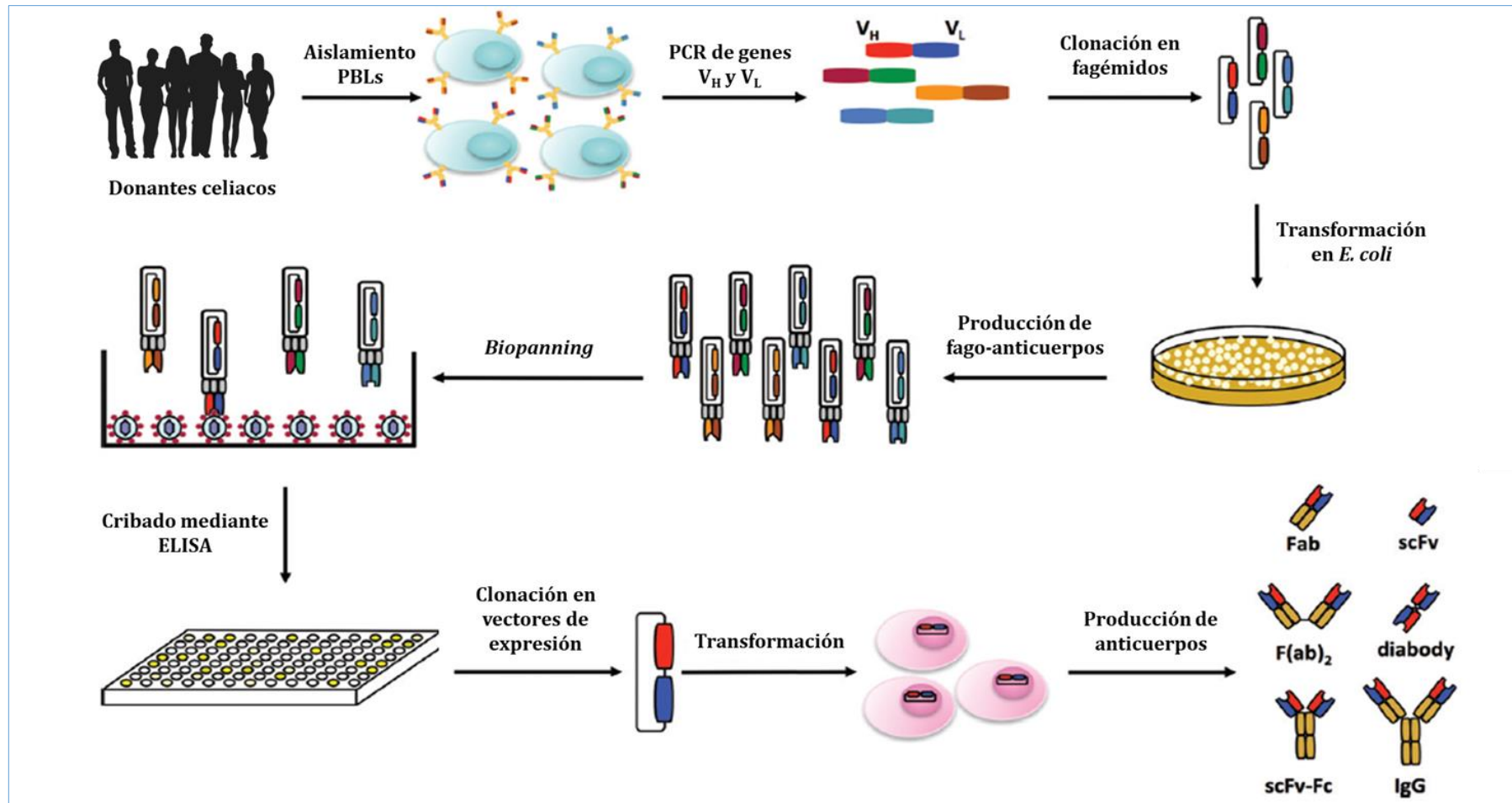


Figura 19. Esquema metodológico para la generación de una genoteca de fago-anticuerpos a partir de donantes celíacos para la obtención de anticuerpos recombinantes frente al gluten (adaptada de Diebold y Krawczyk, 2017).



Capítulo VII
REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

A

- Adatia, A., Clarke, A. E., Yanishevsky, Y., y Ben-Shoshan, M. (2017). Sesame allergy: current perspectives. *Journal of Asthma and Allergy*, 10, 141–151. <http://doi.org/10.2147/JAA.S113612>
- Adda, C. G., Anders, R. F., Tilley, L., y Foley, M. (2002). Random sequence libraries displayed on phage: identification of biologically important molecules. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 5, 1–14. <http://doi.org/10.2174/1386207023330561>
- Agrawal, V., Slivac, I., Perret, S., Bisson, L., St-Laurent, G., Murad, Y., Zhang, J., y Durocher, Y. (2012). Stable expression of chimeric heavy chain antibodies in CHO cells. En: *Single Domain Antibodies: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (vol. 911, pp. 287–303), Saerens, D., y Muyldermans, S. (Ed.), Humana Press, Totowa, NJ, Estados Unidos. http://doi.org/10.1007/978-1-61779-968-6_18
- Ahrens, B., Sampson, H. A., y Beyer, K. (2016). Adverse reactions to food. En: *Allergy, immunity and tolerance in early childhood: the first step of the atopic march* (1st ed. pp. 45–63) Wahn, U. y Sampson, H. A. (Ed.). Academic Press, Cambridge, MA, Estados Unidos. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-420226-9.00004-8>
- Akobeng, A. K., y Thomas, A. G. (2008). Systematic review: tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 27(11), 1044–1052. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2008.03669.x>
- Al-Bawardy, B., Codipilly, D. C., Rubio-Tapia, A., Bruining, D. H., Hansel, S. L., y Murray, J. A. (2017). Celiac disease: a clinical review. *Abdominal Radiology*, 42(2), 351–360. <http://doi.org/10.1007/s00261-016-1034-y>
- Allen, K. J., y Koplin, J. J. (2012). The epidemiology of IgE-mediated food allergy and anaphylaxis. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 32(1), 35–50. <http://doi.org/10.1016/j.iac.2011.11.008>
- Allen, K. J., Remington, B. C., Baumert, J. L., Crevel, R. W. R., Houben, G. F., Brooke-Taylor, S., Kruizinga, A. G., y Taylor, S. L. (2013). Allergen reference doses for precautionary labeling (VITAL 2.0): clinical implications. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(1), 156–164. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.06.042>
- Álvarez, I., y Wendel, J. F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29, 417–434. [http://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00208-2](http://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00208-2)
- Alvarez, P. A., y Boye, J. I. (2012). Food production and processing considerations of allergenic food ingredients: a review. *Journal of Allergy*, 2012, artículo número 746125, pp 1–14. <http://doi.org/10.1155/2012/746125>
- Alves, R. C., Barroso, M. F., González-García, M. B., Oliveira, M. B. P. P., y Delerue-Matos, C. (2016). New trends in food allergens detection: towards biosensing strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 2304–2319. <http://doi.org/10.1080/10408398.2013.831026>
- Añíbarro, B., Seoane, F. J., y Múgica, M. V. (2007). Involvement of hidden allergens in food allergic reactions. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 17(3), 168–172. Disponible online en (último acceso 10 de julio de 2019): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17583104>
- Arendt, E. K. y Bello, F. D. (2008). Gluten-free cereal products and beverages. (1ª ed.). Academic Press, Cambridge, MA, Estados Unidos. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-373739-7.X5001-1>
- Axelsson, I. G. K., Ihre, E., y Zetterström, O. (1994). Anaphylactic reactions to sunflower seed. *Allergy*, 49(7), 517–520. <http://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1994.tb01122.x>

B

- Baghban, R., Gargari, S. L. M., Rajabibazl, M., Nazarian, S., y Bakherad, H. (2016). Camelid-derived heavy-chain nanobody against *Clostridium botulinum* neurotoxin e in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 63(2), 200–205. <http://doi.org/10.1002/bab.1226>
- Bakhshinejad, B., Zade, H. M., Shekarabi, H. S. Z., y Neman, S. (2016). Phage display biopanning and isolation of target-unrelated peptides: in search of nonspecific binders hidden in a combinatorial library. *Amino Acids*, 48(12), 2699–2716. <http://doi.org/10.1007/s00726-016-2329-6>
- Balakireva, A. V., y Zamyatnin, A. A. (2016). Properties of gluten intolerance: gluten structure, evolution, pathogenicity and detoxification capabilities. *Nutrients*, 8, artículo número 644, pp. 1–27. <http://doi.org/10.3390/nu8100644>
- Bannas, P., Hambach, J., y Koch-Nolte, F. (2017). Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics. *Frontiers in Immunology*, 8, artículo número 1603, pp. 1–13. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01603>
- Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J., y Kuster, B. (2007). Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(4), 1017–1031. <http://doi.org/10.1007/s00216-007-1486-6>
- Baral, T. N., y Arbabi-Ghahroudi, A. (2012). Expression of single-domain antibodies in bacterial systems. En: *Single Domain Antibodies: Methods and*

- Protocols, Methods in Molecular Biology* (vol. 911, pp. 257–275), Saerens, D., y Muyldermans, S. (Ed.), Humana Press, Totowa, NJ, Estados Unidos.
<http://doi.org/10.1017/CBO9780511596773.019>
- Barbaro, M. R., Cremon, C., Stanghellini, V., y Barbara, G. (2018). Recent advances in understanding non-celiac gluten sensitivity. *F1000Research*, 7(0), artículo número 1631, pp. 1–8.
<http://doi.org/10.12688/f1000research.15849.1>
- Barlow, S. M., Boobis, A. R., Bridges, J., Cockburn, A., Dekant, W., Hepburn, P., Houben, G. F., König, J., Nauta, M. J., Schuermans, J. y Bánáti, D. (2015). The role of hazard- and risk-based approaches in ensuring food safety. *Trends in Food Science and Technology*, 46, 176–188.
<http://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.007>
- Bazl, M. R., Rasaei, M. J., Foruzandeh, M., Rahimpour, A., Kiani, J., Rahbarizadeh, F., Alirezapour, B., y Mohammadi, M. (2007). Production of chimeric recombinant single domain antibody. Green fluorescent fusion protein in Chinese hamster ovary cells. *Hybridoma*, 26(1), 1–9.
<http://doi.org/10.1089/hyb.2006.037>
- Berciano, F. Á., y Caro, F. Á. (2008). Reacciones adversas a alimentos e historia natural de la alergia alimentaria en la infancia. *Boletín de Pediatría*, 48, 21–36. Disponible online en (último acceso 10 de julio de 2019):
http://www.sccalp.org/boletin/203/BolPediatr2008_48_021-036.pdf
- Bermudo-Redondo, M. C., Griffin, P. B., Ransanz, M. G., Ellis, H. J., Ciclitira, P. J., y O'Sullivan, C. K. (2005). Monoclonal antibody-based competitive assay for the sensitive detection of coeliac disease toxic prolamins. *Analytica Chimica Acta*, 551(1–2), 105–114.
<http://doi.org/10.1016/j.aca.2005.07.023>
- Besler, M. (2001). Determination of allergens in foods. *Trends in Analytical Chemistry*, 20, 662–672.
[http://doi.org/10.1016/S0165-9936\(01\)00119-4](http://doi.org/10.1016/S0165-9936(01)00119-4)
- Besler, M., Steinhart, H., y Paschke, A. (2001). Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *Journal of Chromatography B*, 756, 207–228.
[http://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00110-4](http://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00110-4)
- Bevis, B. J., y Glick, B. S. (2002). Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nature Biotechnology*, 20(1), 83–87.
<http://doi.org/10.1038/nbt0102-83>
- Biesiekierski, J. R. (2017). What is gluten? *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 32(s1), 78–81.
<http://doi.org/10.1111/jgh.13703>
- Biesiekierski, J. R., Newnham, E. D., Irving, P. M., Barrett, J. S., Haines, M., Doecke, J. D., Shepherd, S. J., Muir, J. G., y Gibson, P. R. (2011). Gluten causes gastrointestinal symptoms in subjects without celiac disease: a double-blind randomized placebo-controlled trial. *American Journal of Gastroenterology*, 106(3), 508–514.
<http://doi.org/10.1038/ajg.2010.487>
- Birch, J. R., y Racher, A. J. (2006). Antibody production. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 671–685.
<http://doi.org/10.1016/j.addr.2005.12.006>
- Blom, W. M., Vlieg-Boerstra, B. J., Kruizinga, A. G., van der Heide, S., Houben, G. F., y Dubois, A. E. J. (2013). Threshold dose distributions for 5 major allergenic foods in children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(1), 172–179.
<http://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.10.034>
- Bouziat, R., Hinterleitner, R., Brown, J. J., Stencel-Baerenwald, J. E., Ikizler, M., Mayassi, T., Meisel, M., Kim, S. M., Discepolo, V., Pruijssers, A. J., Ernest, J. D., Iskarpatyoti, J. A., Costes, L. M. M., Lawrence, I., Palanski, B. A., Varma, M., Zurenski, M. A., Khomandiak, S., McAllister, N., Aravamudhan, P., Boehme, K. W., Hu, F., Samsom, J. N., Reinecker, H., Kupfer, S. S., Guandalini, S., Semrad, C. E., Abadie, V., Khosla, C., Barreiro, L. B., Xavier, R. J., Ng, A., Dermody, T. S., y Jabri, B. (2017). Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease. *Science*, 356(6333), 44–50.
<http://doi.org/10.1126/science.aah5298>
- Bradbury, A. R. M., Sidhu, S., Dübel, S., y Mccafferty, J. (2011). Beyond natural antibodies: the power of *in vitro* display technologies. *Nature Biotechnology*, 29(3), 245–254.
<http://doi.org/10.1038/nbt.1791.Beyond>
- Bratkovič, T. (2010). Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(5), 749–767.
<http://doi.org/10.1007/s00018-009-0192-2>
- Breiteneder, H., y Radauer, C. (2004). A classification of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(5), 821–830.
<http://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.01.779>
- Breiteneder, H., y Mills, E. N. C. (2014). Food allergens. Molecular and immunological characteristics. En: *Food Allergy: Adverse Reactions to Foods and Food Additives* (5ª ed. pp. 31–46) Metcalfe, D. D., Sampson, H. A., Simon, R. A., y Lack, G. (Ed.) John Wiley & Sons Ltd, Chichester, Reino Unido.
<http://doi.org/10.1002/9781118744185.ch4>
- Bruins-Slot, I. D., Bremer, M. G. E. G., van der Fels-Klerx, I., y Hamer, R. J. (2015). Evaluating the performance of gluten ELISA test kits: the numbers do not tell the tale. *Cereal Chemistry*, 92(5), 513–521.
<http://doi.org/10.1094/CCHEM-07-14-0166-R>
- Bruins-Slot, I. D., van der Fels-Klerx, H. J., Bremer, M. G. E. G., y Hamer, R. J. (2016). Immunochemical detection methods for gluten in food products: where do we go from here? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 2455–2466.
<http://doi.org/10.1080/10408398.2013.847817>
- Bucchini, L., Guzzon, A., Poms, R., y Senyuva, H. (2016). Analysis and critical comparison of food allergen recalls from the European Union, USA, Canada, Hong Kong, Australia and New Zealand. *Food*

- Additives and Contaminants - Part A*, 33(5), 760–771.
<http://doi.org/10.1080/19440049.2016.1169444>
- Bugyi, Z., Török, K., Hajas, L., Adonyi, Z., Popping, B., y Tömösközi, S. (2013). Comparative study of commercially available gluten ELISA kits using an incurred reference material. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods*, 5(1), 79–87.
<http://doi.org/10.3920/QAS2012.0174>
- ## C
- Campuzano, S., Montiel, V. R. V., Torrente-Rodríguez, R. M., Reviejo, Á. J., y Pingarrón, J. M. (2016). Electrochemical biosensors for food security: allergens and adulterants detection. En: *Advances sciences and technologies for security applications* (pp. 287–307), Nikolelis, D. P., y Nikoleli, G. P. (Ed.), Springer International, Suiza.
<http://doi.org/10.1007/978-3-319-28926-7>
- Caraguel, C. G. B., Stryhn, H., Gagné, N., Dohoo, I. R., y Hammell, K. L. (2011). Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: analytical and epidemiologic approaches. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(1), 2–15.
<http://doi.org/10.1177/104063871102300102>
- Carloni, E., Amagliani, G., Omiccioli, E., Ceppetelli, V., Del Mastro, M., Rotundo, L., Brandi, G., y Magnani, M. (2017). Validation and application of a quantitative real-time PCR assay to detect common wheat adulteration of durum wheat for pasta production. *Food Chemistry*, 224, 86–91.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.053>
- Catassi, C., Fabiani, E., Iacono, G., D'Agate, C., Francavilla, R., Biagi, F., Volta, U., Accomando, S., Picarelli, A., De Vitis, I., Pianelli, G., Gesuita, R., Carle, F., Mandolesi, A., Bearzi, I., y Fasano, A. (2007). A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85(1), 160–166.
<http://doi.org/10.1093/ajcn/85.1.160>
- Catassi, C., y Fasano, A. (2010). Celiac disease diagnosis: simple rules are better than complicated algorithms. *The American Journal of Medicine*, 123(8), 691–693.
<http://doi.org/10.1016/j.amjmed.2010.02.019>
- Catassi, C., Elli, L., Bonaz, B., Bouma, G., Carroccio, A., Castillejo, G., Cellier, C., Cristofori, F., de Magistris, L., Dolinsek, J., Dieterich, W., Francavilla, R., Hadjivassiliou, M., Holtmeier, W., Körner, U., Leffler, D. A., Lundin, K. E. A., Mazzarella, G., Mulder, C. J., Pellegrini, N., Rostami, K., Sanders, D., Skodje, G. I., Schuppan, D., Ullrich, R., Volta, U., Williams, M., Zavallos, V. F., Zopf, Y., y Fasano, A. (2015). Diagnosis of non-celiac gluten sensitivity (NCGS): The Salerno experts' criteria. *Nutrients*, 7(6), 4966–4977.
<http://doi.org/10.3390/nu7064966>
- Cebolla, Á., Moreno, M. L., Coto, L., y Sousa, C. (2018). Gluten immunogenic peptides as standard for the evaluation of potential harmful prolamins content in food and human specimen. *Nutrients*, 10, artículo número 1927, pp. 1–16.
<http://doi.org/10.3390/nu10121927>
- Charlebois, S., Schwab, A., Henn, R., y Huck, C. W. (2016). Food fraud: an exploratory study for measuring consumer perception towards mislabeled food products and influence on self-authentication intentions. *Trends in Food Science and Technology*, 50, 211–218.
<http://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.02.003>
- Chen, T., Hoffmann, K., Ostman, S., Sandberg, A. S., y Olsson, O. (2011). Identification of gliadin-binding peptides by phage display. *BMC Biotechnology*, 11(1), pp. 1–16.
<http://doi.org/10.1186/1472-6750-11-16>
- Cheng, F., Wu, J., Zhang, J., Pan, A., Quan, S., Zhang, D., Kim, H. Y., Li, X., Zhou, S., y Yang, L. (2016). Development and inter-laboratory transfer of a decaplex polymerase chain reaction assay combined with capillary electrophoresis for the simultaneous detection of ten food allergens. *Food Chemistry*, 199, 799–808.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.058>
- Chinuki, Y., y Morita, E. (2012). Wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis sensitized with hydrolyzed wheat protein in soap. *Allergology International*, 61, 529–537.
<http://doi.org/10.2332/allergolint.12-RAI-0494>
- Chiriaco, M. S., de Feo, F., Primiceri, E., Monteduro, A. G., De Benedetto, G. E., Pennetta, A., Rinaldi, R., y Maruccio, G. (2015). Portable gliadin-immunochip for contamination control on the food production chain. *Talanta*, 142, 57–63.
<http://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.04.040>
- Cianferoni, A., y Spergel, J. M. (2009). Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergology International*, 58(4), 457–466.
<http://doi.org/10.2332/allergolint.09-rai-0138>
- Clímaco-Henggeler, J., Veríssimo, M., y Ramos, F. (2017). Non-coeliac gluten sensitivity: a review of the literature. *Trends in Food Science and Technology*, 66, 84–92.
<http://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.018>
- Cochrane, S., Beyer, K., Clausen, M., Wjst, M., Hiller, R., Nicoletti, C., Szepefalusi, Z., Savelkoul, H., Breiteneder, H., Manios, Y., Crittenden, R., y Burney, P. (2009). Factors influencing the incidence and prevalence of food allergy. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 64(9), 1246–1255.
<http://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02128.x>
- Codex Standard 234-1999. (2018). Recommended methods of analysis and sampling. *Codex Alimentarius Commission*. Disponible online en (último acceso 10 de julio de 2019):
<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/>

- sh-proxy/en/?lnk=1&url=http%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%252FBSTAN%252B234-1999%252FCXS_234e.pdf
- Codex Standard 118-1979 (2008). Codex standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten. *Codex Alimentarius Commission*. Disponible online en (último acceso 10 de julio de 2019): http://www.fao.org/input/download/standards/291/CXS_118s_2015.pdf
- Coleman, A. W. (2015). Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure. *Trends in Genetics*, 31(3), 157-163. <http://doi.org/10.1016/j.tig.2015.01.002>
- Comino, I., Moreno, M. L., Real, A., Rodríguez-Herrera, A., Barro, F., y Sousa, C. (2013). The gluten-free diet: testing alternative cereals tolerated by celiac patients. *Nutrients*, 5(10), 4250-4268. <http://doi.org/10.3390/nu5104250>
- Comino, I., Moreno, M. L., y Sousa, C. (2015). Role of oats in celiac disease. *World Journal of Gastroenterology*, 21(41), 11825-11831. <http://doi.org/10.3748/wjg.v21.i41.11825>
- Commission Notice of the European Commission of 13 July 2017 relating to the provision of information on substances or products causing allergies or intolerances as listed in Annex II to Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council on the provision of food information to consumers. Official Journal of the European Union, C428, 1-5.
- Connors, L., O'Keefe, A., Rosenfield, L., y Kim, H. (2018). Non-IgE-mediated food hypersensitivity. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 14(s2:56), 83-91. <http://doi.org/10.1186/s13223-018-0285-2>
- Cordle, C. T. (2004). Soy protein allergy: incidence and relative severity. *Journal of Nutrition*, 134, 1213-1219S. <http://doi.org/10.1093/jn/134.5.1213S>
- Croese, J., Giacomini, P., Navarro, S., Clouston, A., McCann, L., Dougall, A., Ferreira, I., Susianto, A., O'Rourke, P., Howlett, M., McCarthy, J., Engwerda, C., Jones, D., y Loukas, A. (2015). Experimental hookworm infection and gluten microchallenge promote tolerance in celiac disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(2), 508-516. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.022>
- Croote, D., y Quake, S. R. (2016). Food allergen detection by mass spectrometry: the role of systems biology. *Npj Systems Biology and Applications*, 2, artículo número 16022, pp. 1-10. <http://doi.org/10.1038/npjbsa.2016.22>
- Cucu, T., Jacxsens, L., y De Meulenaer, B. (2013). Analysis to support allergen risk management: Which way to go? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(24), 5624-5633. <http://doi.org/10.1021/jf303337z>
- ## D
- D'Agostino, M., Robles, S., Hansen, F., Ntafis, V., Ikononopoulos, J., Kokkinos, P., Alvarez-Ordóñez, A., Jordan, K., Delibato, E., Kukier, E., Sieradzki, Z., Kwiatek, K., Milanov, D., Petrović, T., Gonzalez-Garcia, P., Lazaro, D. R., Jackson, E. E., Forsythe, S. J., O'Brien, L., y Cook, N. (2016). Validation of a loop-mediated amplification/ISO 6579-based method for analysing soya meal for the presence of *Salmonella enterica*. *Food Analytical Methods*, 9(11), 2979-2985. <http://doi.org/10.1007/s12161-016-0602-7>
- D'Andrea, M., Coisson, J. D., Locatelli, M., Garino, C., Cereti, E., y Arlorio, M. (2011). Validating allergen coding genes (Cor a 1, Cor a 8, Cor a 14) as target sequences for hazelnut detection via real-time PCR. *Food Chemistry*, 124(3), 1164-1171. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.029>
- Dahinden, I., von Büren, M., y Lüthy, J. (2001). A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. *European Food Research and Technology*, 212, 228-233. <http://doi.org/10.1007/s002170000252>
- Dalal, I., Goldberg, M., y Katz, Y. (2012). Sesame seed food allergy. *Current Allergy and Asthma Reports*, 12, 339-345. <http://doi.org/10.1007/s11882-012-0267-2>
- Daly, R., y Hearn, M. T. W. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 18(2), 119-138. <http://doi.org/10.1002/jmr.687>
- Damasceno, L. M., Huang, C., y Batt, C. A. (2012). Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1), 31-39. <http://doi.org/10.1007/s00253-011-3654-z>
- Danezis, G. P., Tsagkaris, A. S., Camin, F., Brusica, V., y Georgiou, C. A. (2016). Food authentication: techniques, trends and emerging approaches. *Trends in Analytical Chemistry*, 85, 123-132. <http://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.026>
- De Buck, S., Viridi, V., De Meyer, T., De Wilde, K., Piron, R., Nolf, J., Van Lerberge, E., De Paepe, A., y Depicker, A. (2012). Production of camel-like antibodies in plants. En: *Single Domain Antibodies: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (vol. 911, pp. 305-324), Saerens, D., y Muyltermans, S. (Ed.), Humana Press, Totowa, NJ, Estados Unidos. <http://doi.org/10.1017/CBO9780511596773.019>
- de la Cruz, S., López-Calleja, I. M., Alcocer, M., González, I., Martín, R., y García, T. (2013a). Selection of recombinant antibodies by phage display technology and application for detection of allergenic Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*) in processed foods. *Journal of Agricultural and Food*

- Chemistry*, 61(43), 10310–10319.
<http://doi.org/10.1021/jf403347t>
- de la Cruz, S., López-Calleja, I. M., Alcocer, M., González, I., Martín, R., y García, T. (2013b). TaqMan real-time PCR assay for detection of traces of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) in food products. *Food Control*, 33, 105–113.
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.053>
- de la Cruz, S., Cubillos-Zapata, C., López-Calleja, I. M., Ghosh, S., Alcocer, M., González, I., Martín, R., y García, T. (2015). Isolation of recombinant antibody fragments (scFv) by phage display technology for detection of almond allergens in food products. *Food Control*, 54, 322–330.
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.011>
- de la Cruz, S. (2017). Desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas con anticuerpos recombinantes y de técnicas de PCR en tiempo real para la detección de almendra y nuez de Brasil en alimentos. Tesis Doctoral. Departamento de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España.
- de la Cruz, S., González, I., García, T., y Martín, R. (2018). Food allergies: the importance of food allergen management. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, 38(1), 142–148.
<http://doi.org/10.12873/381RMartin>
- de Marco, A. (2011). Biotechnological applications of recombinant single-domain antibody fragments. *Microbial Cell Factories*, 10(1), artículo número 44, pp. 1–14.
<http://doi.org/10.1186/1475-2859-10-44>
- de Marco, A. (2015). Recombinant antibody production evolves into multiple options aimed at yielding reagents suitable for application-specific needs. *Microbial Cell Factories*, 14(1), artículo número 125, pp. 1–17.
<http://doi.org/10.1186/s12934-015-0320-7>
- De Re, V., Caggiari, L., Tabuso, M., y Cannizzaro, R. (2013). The versatile role of gliadin peptides in celiac disease. *Clinical Biochemistry*, 46(6), 552–560.
<http://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.10.038>
- Debnath, J., Martin, A., y Gowda, L. R. (2009). A polymerase chain reaction directed to detect wheat glutenin: implications for gluten-free labelling. *Food Research International*, 42, 782–787.
<http://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.028>
- Dewar, D. H., Amato, M., Ellis, H. J., Pollock, E. L., Gonzalez-Cinca, N., Wieser, H., y Ciclitira, P. J. (2006). The toxicity of high molecular weight glutenin subunits of wheat to patients with coeliac disease. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 18(5), 483–491.
<http://doi.org/10.1097/00042737-200605000-00005>
- Diaz-Amigo, C., y Popping, B. (2013). Accuracy of ELISA detection methods for gluten and reference materials: a realistic assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(24), 5681–5688.
<http://doi.org/10.1021/jf3046736>
- Diebolder, P., y Krawczyk, A. (2017) Detailed protocols for the selection of antiviral human antibodies from combinatorial immune phage display libraries. En: *Antibody Engineering* (pp 75-102) Böldicke, T. (Ed.). InTechOpen, disponible online en (último acceso 10 de julio de 2019):
<http://www.intechopen.com/books/antibody-engineering>
- Dieterich, W., Ehnis, T., Bauer, M., Donner, P., Volta, U., Riecken, E. O., y Schuppan, D. (1997). Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Medicine*, 3(7), 797–801.
<http://doi.org/10.1042/cs0700111>
- Dieterich, W., Schuppan, D., Schink, M., Schwappacher, R., Wirtz, S., Agaimy, A., Neurath, M. F., y Zopf, Y. (2018). Influence of low FODMAP and gluten-free diets on disease activity and intestinal microbiota in patients with non-celiac gluten sensitivity. *Clinical Nutrition*, 38(2) 697-707.
<http://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.03.017>
- Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union L276*, 33-79
- Domon, B., y Aebersold, R. (2006). Mass spectrometry and protein analysis. *Science*, 312(5771), 212–217.
<http://doi.org/10.1126/science.1124619>
- Doña, V., Urrutia, M., Bayardo, M., Alzogaray, V., Goldbaum, F. A., y Chirido, F. G. (2010). Single domain antibodies are specially suited for quantitative determination of gliadins under denaturing conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 918–926.
<http://doi.org/10.1021/jf902973c>
- Donnelly, S. C., Šuligoj, T., Ellis, H. J., y Ciclitira, P. J. (2016). Identification of coeliac disease triggering glutenin peptides in adults. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 51(7), 819–826.
<http://doi.org/10.3109/00365521.2016.1150504>
- Dubois, B., Bertin, P., Muhovski, Y., Escarnot, E., y Mingeot, D. (2017). Development of TaqMan probes targeting the four major celiac disease epitopes found in α -gliadin sequences of spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*) and bread wheat (*Triticum aestivum* ssp. *aestivum*). *Plant Methods*, 13(1), artículo número 72, pp. 1–14.
<http://doi.org/10.1186/s13007-017-0222-2>
- Dudgeon, K., Rouet, R., Kokmeijer, I., Schofield, P., Stolp, J., Langley, D., Stock, D., y Christ, D. (2012). General strategy for the generation of human antibody variable domains with increased aggregation resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(27), 10879–10884.
<http://doi.org/10.1073/pnas.1202866109>

E

- EFSA (European Food Safety Authority). (2014). Scientific opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. *EFSA Journal*, 12, pp. 1-277. <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.NNNN>
- Ehlert, A., Moreano, F., Busch, U., y Engel, K. H. (2008). Development of a modular system for detection of genetically modified organisms in food based on ligation-dependent probe amplification. *European Food Research and Technology*, 227, 805-812. <http://doi.org/10.1007/s00217-007-0790-x>
- Ehlert, A., Demmel, A., Hupfer, C., Busch, U., y Engel, K. H. (2009). Simultaneous detection of DNA from 10 food allergens by ligation-dependent probe amplification. *Food Additives y Contaminants. Part A*, 26(4), 409-418. <http://doi.org/10.1080/02652030802593529>
- Eisenhardt, S. U., Schwarz, M., Bassler, N., y Peter, K. (2007). Subtractive single-chain antibody (Scfv) phage display: tailoring phage-display for high specificity against function-specific conformations of cell membrane molecules. *Nature Protocols*, 2(12), 3063-3073. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.455>
- Elli, L., Branchi, F., Tomba, C., Villalta, D., Norsa, L., Ferretti, F., Roncorini, L., y Bardella, M. T. (2015). Diagnosis of gluten related disorders: celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. *World Journal of Gastroenterology*, 21(23), 7110-7119. <http://doi.org/10.3748/wjg.v21.i23.7110>
- Ellis, H. J., Rosen-Bronson, S., O'Reilly, N., y Ciclitira, P. J. (1998). Measurement of gluten using a monoclonal antibody to a coeliac toxic peptide of a gliadin. *Gut*, 43(2), 190-195. <http://doi.org/10.1136/gut.43.2.190>

F

- Feldweg, A. M. (2017). Food-dependent, exercise-induced anaphylaxis: diagnosis and management in the outpatient setting. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 5(2), 283-288. <http://doi.org/10.1016/j.jaip.2016.11.022>
- Ferguson, A., Arranz, E., y O'Mahony, S. (1993). Clinical and pathological spectrum of coeliac disease-active, silent, latent, potential. *Gut*, 34(2), 150-151. <http://doi.org/10.1136/gut.34.2.150>
- Focke, F., Haase, I., y Fischer, M. (2013). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): methods for plant species identification in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 2943-2949. <http://doi.org/10.1021/jf304295b>
- Frenzel, A., Kügler, J., Wilke, S., Schirrmann, T., y Hust, M. (2014). Construction of human antibody gene libraries and selection of antibodies by phage display. En: *Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology (vol. 1060, pp. 215-243)*, Steinitz, M. (Ed.), Humana Press, Totowa, NJ, Estados Unidos. http://doi.org/10.1007/978-1-62703-586-6_12
- Fric, P., Gabrovská, D., y Nevorál, J. (2011). Celiac disease, gluten-free diet, and oats. *Nutrition Reviews*, 69(2), 107-115. <http://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00368.x>
- Funari, R., Terracciano, I., Della Ventura, B., Ricci, S., Cardi, T., D'Agostino, N., y Velotta, R. (2017). Label-free detection of gliadin in food by quartz crystal microbalance-based immunosensor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(6), 1281-1289. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04830>

G

- Gall, H. (2000). Food-dependent exercise-induced anaphylaxis to flaxseed. *Allergy International*, 49, 219-221. <http://doi.org/10.1046/j.1440-1592.2000.00182.x>
- García, E., Llorente, M., Hernando, A., Kieffer, R., Wieser, H., y Méndez, E. (2005). Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 17(5), 529-539. <http://doi.org/10.1097/00042737-200505000-00010>
- Garrido-Maestu, A., Azinheiro, S., Fuciños, P., Carvalho, J., y Prado, M. (2018). Highly sensitive detection of gluten-containing cereals in food samples by real-time Loop-mediated isothermal AMplification (qLAMP) and real-time polymerase chain reaction (qPCR). *Food Chemistry*, 246, 156-163. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.005>
- Gašparič, M. B., Tengs, T., la Paz, J. L., Holst-Jensen, A., Pla, M., Esteve, T., Žel, J., y Gruden, K. (2010). Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(6), 2023-2029. <http://doi.org/10.1007/s00216-009-3418-0>
- Gendel, S. M. (2012). Comparison of international food allergen labeling regulations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 63(2), 279-285. <http://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.04.007>
- Ghassabeh, H. G., Devoogdt, N., De Pauw, P., Vincke, C., y Muyldermans, S. (2013). Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine*, 8(6), 1013-1026. <http://doi.org/10.2217/nmm.13.86>
- Gil-Humanes, J., Pistón, F., Altamirano-Fortoul, R., Real, A., Comino, I., Sousa, C., Rosell, C. M., y Barro, F. (2014). Reduced-gliadin wheat bread: an alternative to the gluten-free diet for consumers suffering gluten-related pathologies. *PLoS ONE*,

- 9(3), e90898.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0090898>
- Goel, G., Andrews, J. M., Krause, R., Fogel, R., Barish, C. F., Daveson, A. J., Epstein, R., King, T., Kinney, T., Krishnarajah, J., Miner, P. B., Tye-Din, J. A., Girardin, A., Taavela, J., Popp, A., Maki, M., Goldstein, K., Dzuris, J. L., Williams, L. J., Xavier, R., Sollid, L. M., Jabri, B., y Anderson, R. P. (2016). Nexvax2®, a peptide-based antigen-specific immunotherapy, administered intra-dermally three-times over 15-days attenuates responsiveness to immunodominant gluten peptides in HLA-DQ2.5+ people with celiac disease (CeD). *Gastroenterology*, 150(4), S304.
[http://doi.org/10.1016/S0016-5085\(16\)31064-2](http://doi.org/10.1016/S0016-5085(16)31064-2)
- Gómez-Arribas, L. N., Benito-Peña, E., Hurtado-Sánchez, M. C., y Moreno-Bondi, M. C. (2018). Biosensing based on nanoparticles for food allergens detection. *Sensors*, 18(4), artículo número 1087, pp. 1–32.
<http://doi.org/10.3390/s18041087>
- Gonzalez-Sapienza, G., Rossotti, M. A., y Tabares-da Rosa, S. (2017). Single-domain antibodies as versatile affinity reagents for analytical and diagnostic applications. *Frontiers in Immunology*, 8, artículo número 977, pp. 1–12.
<http://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00977>
- Gryson, N., Dewettinck, K., y Messens, K. (2007). Influence of cocoa components on the PCR detection of soy lecithin DNA. *European Food Research and Technology*, 226(1), 247–254.
<http://doi.org/10.1007/s00217-006-0533-4>
- Guertler, P., Goerlich, O., y Busch, U. (2014). Development of a multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) module for simultaneous detection of five genetically modified rapeseed events. *Agricultural Sciences*, 5, 530–539.
<http://doi.org/10.4236/as.2014.56055>
- Gupta, R. S., Springston, E. E., Warriar, M. R., Smith, B., Rajesh, K., Pongracic, J., y Holl, J. L. (2011). The prevalence, severity, and distribution of childhood food allergy in the United States. *Pediatrics*, 128, e9–e17.
<http://doi.org/10.1542/peds.2012-2183n>
- Gupta, S. K., y Shukla, P. (2017). Microbial platform technology for recombinant antibody fragment production: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(1), 31–42.
<http://doi.org/10.3109/1040841X.2016.1150959>
- ## H
- Haboubi, N. . Y., Taylor, S., y Jones, S. (2006). Coeliac disease and oats: a systematic review. *Postgraduate Medical Journal*, 82, 672–678.
<http://doi.org/10.1136/pgmj.2006.045443>
- Hadjivassiliou, M., Sanders, D. D., y Aeschlimann, D. P. (2015). Gluten-related disorders: gluten ataxia. *Digestive Diseases*, 33(2), 264–268.
<http://doi.org/10.1159/000369509>
- Hajas, L., Scherf, K. A., Török, K., Bugyi, Z., Schall, E., Poms, R. E., Koehler, P., y Tömösközi, S. (2018). Variation in protein composition among wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to identify cultivars suitable as reference material for wheat gluten analysis. *Food Chemistry*, 267, 387–394.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.005>
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. B., y Hamers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 363(6428), 446–448.
<http://doi.org/10.1038/363446a0>
- Hammers, C. M., y Stanley, J. R. (2014). Antibody phage display: technique and applications. *J Invest Dermatol*, 134(2), artículo número e17, pp. 1–13.
<http://doi.org/10.1038/jid.2013.521.Antibody>
- Heick, J., Fischer, M., y Pöpping, B. (2011). First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(7), 938–943.
<http://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.067>
- Hentrich, C., Ylera, F., Frisch, C., Ten Haaf, A., y Knappik, A. (2018). Monoclonal antibody generation by phage display: history, state-of-the-art, and future. En: *Handbook of Immunoassay Technologies* (pp. 47–80), Vashist S. K., y Luong J. H. T. (Ed.), Academic Press, Cambridge, MA, Estados Unidos.
<http://doi.org/10.1016/B978-0-12-811762-0.00003-7>
- Hernández, C. E. (2015). Inmunogenética de la enfermedad celiaca : papel de aa Il-15 y su receptor. Tesis Doctoral, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid, España.
- Hernández, M., Esteve, T., y Pla, M. (2005). Real-time polymerase chain reaction based assays for quantitative detection of barley, rice, sunflower, and wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7003–7009.
<http://doi.org/10.1021/jf050797j>
- Hernando, A., Mujico, J. R., Mena, M. C., Lombardía, M., y Méndez, E. (2008). Measurement of wheat gluten and barley hordeins in contaminated oats from Europe, the United States and Canada by Sandwich R5 ELISA. *European Journal of Gastroenterology y Hepatology*, 20, 545–554.
<http://doi.org/10.1097/MEG.0b013e3282f46597>
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., y Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11(9), 1026–1030.
<http://doi.org/10.1038/nbt0993-1026>
- Holck, A. L., Drømtorp, S. M., y Heir, E. (2009). Quantitative, multiplex ligation-dependent probe amplification for the determination of eight genetically modified maize events. *European Food Research and Technology*, 230, 185–194.
<http://doi.org/10.1007/s00217-009-1155-4>

- Holm, K., Mäki, M., Vuolteenaho, N., Mustalahti, K., Ashorn, M., Ruuska, T., y Kaukinen, K. (2006). Oats in the treatment of childhood coeliac disease: a 2-year controlled trial and a long-term clinical follow-up study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 23(10), 1463–1472.
<http://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.02908.x>
- Holzhauser, T. (2018). Protein or no protein? Opportunities for DNA-based detection of allergenic foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(38), 9889–9894.
<http://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03657>
- Holzhauser, T., y Röder, M. (2014). Polymerase chain reaction (PCR) methods for detecting allergens in foods. En *Handbook of Food Allergen Detection and Control* (1ª ed., pp. 245–263), Flanagan S. (Ed.), Woodhead Publishing, Alemania.
<http://doi.org/10.1533/9781782420217.2.245>
- Holzhauser, T., Stephan, O., y Vieths, S. (2002). Detection of potentially allergenic hazelnut (*Corylus avellana*) residues in food: a comparative study with DNA PCR-ELISA and protein sandwich-ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5808–5815.
<http://doi.org/10.1021/jf025600r>
- Hoogenboom, H. R. (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nature Biotechnology*, 23(9), 1105–1116.
<http://doi.org/10.1038/nbt1126>
- Howdle, P. D. (2006). Gliadin, glutenin or both? The search for the Holy Grail in coeliac disease. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 18(7), 703–706.
<http://doi.org/10.1097/01.meg.0000221847.09792.34>
- Huang, D., y Shusta, E. V. (2006). A yeast platform for the production of single-chain antibody-green fluorescent protein fusions. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7748–7759.
<http://doi.org/10.1128/AEM.01403-06>
- Hudson, P. J., y Kortt, A. A. (1999). High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *Journal of Immunological Methods*, 231, 177–189.
[http://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00157-X](http://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00157-X)
- Huse, W. D., Sastry, L., Iverson, S. A., Kang, A. S., Alting-Mees, M., Burton, D. R., Benkovic, S. J., y Lerner, R. A. (1989). Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science*, 246, 1275–1281.
<http://doi.org/10.1126/science.2531466>
- Hwang, W. Y. K., y Foote, J. (2005). Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods*, 36(1), 3–10.
<http://doi.org/10.1016/j.jymeth.2005.01.001>
- I
- Imperatore, N., Rispo, A., Capone, P., Castiglione, F., Gerbino, N., Lucci, L., Accarino, G., Caporaso, N., y Tortora, R. (2016). FODMAPs free diet: an effective solution for symptomatic coeliac patients on gluten free diet. *Digestive and Liver Disease*, 48(2016), e154.
[http://doi.org/10.1016/S1590-8658\(16\)30208-0](http://doi.org/10.1016/S1590-8658(16)30208-0)
- Inomata, N. (2009). Wheat allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 9(3), 238–243.
<http://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32832aa5bc>
- InvivoGen. (2012). Introducing Lucia™: a new secreted luciferase. *Review InvivoGen*. Disponible online en (último acceso 14 de julio de 2019):
http://www.invivogen.com/sites/default/files/invivogen/old/docs/Insight_201207.pdf
- J
- Jeong, K. J., Jang, S. H., y Velmurugan, N. (2011). Recombinant antibodies: engineering and production in yeast and bacterial hosts. *Biotechnology Journal*, 6(1), 16–27.
<http://doi.org/10.1002/biot.201000381>
- Johansson, S. G. O., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P. S., Lanier, B. Q., Lockey, R. F., Motala, C., Martell, J. A. O., Platts-Mills, T. A. E., Ring, J., Thien, F., Van Cauwenberge, P., and Williams, H. C. (2004). Revised nomenclature for allergy for global use: report of the nomenclature review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(5), 832–836.
<http://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.12.591>
- Johansson, S. G. O., Hourihane, J. O'B., Bousquet, J., Brujnzeel-Koomen, C., Dreborg, S., Haahtela, T., Kowalski, M. L., Mygind, N., Ring, J., van Cauwenberg, M., van Hage-Hamsten, M., y Wüthrich, B. (2001). A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*, 56(9), 813–824.
<http://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2001.t01-1-00001.x>
- Joosten, V., Lokman, C., van den Hondel, C. A., y Punt, P. J. (2003). The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi. *Microbial Cell Factories*, 2(1), artículo número 1, pp. 1–15.
<http://doi.org/10.1186/1475-2859-2-1>
- Jouanin, A., Gilissen, L. J. W. J., Boyd, L. A., Cockram, J., Leigh, F. J., Wallington, E. J., van den Broeck, H. C., van der Meer, I. M., Schaart, J. G., Visser, R. G. F., y Smulders, M. J. M. (2018). Food processing and breeding strategies for coeliac-safe and healthy wheat products. *Food Research International*, 110, 11–21.
<http://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.04.025>
- Junker, Y., Zeissig, S., Kim, S.-J., Barisani, D., Wieser, H., Leffler, D. A., Zevallos, V., Libermann, T. A., Dillon, S., Freitag, T. L., Kelly, C. P., y Schuppan, D. (2012). Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal

inflammation via activation of toll-like receptor 4. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(13), 2395–2408.
<http://doi.org/10.1084/jem.20102660>

K

- Kanerva, P. (2011). *Immunochemical analysis of prolamins in gluten-free foods*. Tesis Doctoral. Department of Food and Environmental Sciences, University of Helsinki, Finlandia.
- Kanerva, P. M., Sontag-Strohm, T. S., Ryöppy, P. H., Alho-Lehto, P., y Salovaara, H. O. (2006). Analysis of barley contamination in oats using R5 and omega-gliadin antibodies. *Journal of Cereal Science*, 44(3), 347–352.
<http://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.08.005>
- Kattan, J. D., Cocco, R. R., y Järvinen, K. M. (2011). Milk and soy allergy. *Pediatric Clinics of North America*, 58(2), 407–426.
<http://doi.org/10.1016/j.pcl.2011.02.005>
- Kaukinen, K., Collin, P., Holm, K., Rantala, I., Vuolteenaho, N., Reunala, T., y Mäki, M. (1999). Wheat starch-containing gluten-free flour products in the treatment of coeliac disease and dermatitis herpetiformis: a long-term follow-up study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 34(2), 163–169.
<http://doi.org/10.1080/00365529950173023>
- Kaukinen, Katri, Collin, P., Huhtala, H., y Mäki, M. (2013). Long-term consumption of oats in adult celiac disease patients. *Nutrients*, 5(11), 4380–4389.
<http://doi.org/10.3390/nu5114380>
- Kemppainen, T., Janatuinen, E., Holm, K., Kosma, V. M., Heikkinen, M., Mäki, M., Laurila, K., Uusitupa, M., y Julkunen, R. (2007). No observed local immunological response at cell level after five years of oats in adult coeliac disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 42(1), 54–59.
<http://doi.org/10.1080/00365520600842245>
- Keskin, O., y Sekerel, B. E. (2006). Poppy seed allergy: a case report and review of the literature. *Allergy and Asthma Proceedings*, 27(4), 396–398.
<http://doi.org/10.2500/aap.2006.27.2881>
- Kim, M. J., Cho, S. I., Chae, J. H., Lim, B. C., Lee, J. S., Lee, S. J., Lee, S. J., Seo, S. H., Park, H., Cho, A., Kim, S. Y., Kim, J. Y., Park, S. S., y Seong, M. W. (2016). Pitfalls of multiple ligation-dependent probe amplifications in detecting DMD exon deletions or duplications. *Journal of Molecular Diagnostics*, 18(2), 253–259.
<http://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.11.002>
- Kirsch, S., Fourdrilis, S., Dobson, R., Scippo, M. L., Maghuin-Rogister, G., y De Pauw, E. (2009). Quantitative methods for food allergens: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(1), 57–67.
<http://doi.org/10.1007/s00216-009-2869-7>
- Knappskog, S., Ravneberg, H., Gjerdrum, C., Tröfse, C., Stern, B., y Pryme, I. F. (2007). The level of synthesis and secretion of *Gaussia princeps* luciferase in transfected CHO cells is heavily dependent on the choice of signal peptide. *Journal of Biotechnology*, 128(4), 705–715.
<http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.11.026>
- Kobayashi, N., y Oyama, H. (2011). Antibody engineering toward high-sensitivity high-throughput immunosensing of small molecules. *Analyst*, 136, 642–651.
<http://doi.org/10.1039/c0an00603c>
- Koehler, P., Wieser, H., y Konitzer, K. (2014). Celiac Disease. A Complex Disorder. En: *Celiac Disease and Gluten* (1st ed. pp. 1–96). Koehler, P., Wieser, H., y Konitzer, K. (Ed.). Academic Press, Cambridge, MA, Estados Unidos.
<http://doi.org/10.1016/B978-0-12-420220-7.00001-8>
- Koerner, T. B., Abbott, M., Godefroy, S. B., Popping, B., Yeung, J. M., Diaz-Amigo, C., Roberts, J., Taylor, S. L., Baumert, J. L., Ulberth, F., Wehling, P., y Koehler, P. (2013). Validation procedures for quantitative gluten ELISA methods: AOAC allergen community guidance and best practices. *Journal of AOAC International*, 96(5), 1033–1040.
<http://doi.org/10.5740/jaoacint.13-043>
- Köhler, G., y Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495–497.
<http://doi.org/10.1038/256495a0>
- Köppel, E., Stadler, M., Lüthy, J., y Hübner, P. (1998). Detection of wheat contamination in oats by polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Z Lebensm Unters Forsch A*, 206, 399–403.
<http://doi.org/10.1007/s002170050281>
- Köppel, R., Dvorak, V., Zimmerli, F., Breitenmoser, A., Eugster, A., y Waiblinger, H. U. (2010). Two tetraplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from eight allergens in food. *European Food Research and Technology*, 230, 367–374.
<http://doi.org/10.1007/s00217-009-1164-3>
- Köppel, R., van Velsen-Zimmerli, F., y Bucher, T. (2012). Two quantitative hexaplex real-time PCR systems for the detection and quantification of DNA from twelve allergens in food. *European Food Research and Technology*, 235(5), 843–852.
<http://doi.org/10.1007/s00217-012-1806-8>
- Krishnareddy, S., y Green, P. H. R. (2017). Celiac disease, the microbiome, and probiotics. En: *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology: Implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics, and Dysbiosis* (pp. 365–371) Floch, M. H. Ringel, Y., y Walker, W. A. (Ed.) Academic Press, Cambridge, MA, Estados Unidos.
<http://doi.org/10.1016/B978-0-12-804024-9.00039-2>

- Kucek, L. K., Veenstra, L. D., Amnuaycheewa, P., y Sorrells, M. E. (2015). A grounded guide to gluten: how modern genotypes and processing impact wheat sensitivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14, 285–302.
<http://doi.org/10.1111/1541-4337.12129>
- Kupper, C. (2005). Dietary guidelines and implementation for celiac disease. *Gastroenterology*, 128(4), S121-S127.
<http://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.02.024>
- Kusharyoto, W., Andriani, D., y Handayani, I. (2018). Generation of mCherryBody: an anti-transferrin receptor antibody variable fragment linked by the fluorescent rotein mCherry. *Annales Bogorienses*, 20, 55–62.
<http://doi.org/10.14203/ann.bogor.2016.v20.n2.55-62>
- L**
- Lebwohl, B., Sanders, D. S., y Green, P. H. R. (2018). Coeliac disease. *The Lancet*, 391, 70–81.
[http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31796-8](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31796-8)
- Ledsgaard, L., Kilstrup, M., Karatt-Vellatt, A., McCafferty, J., y Laustsen, A. H. (2018). Basics of antibody phage display technology. *Toxins*, 10(6), artículo número 236, pp. 1-15.
<http://doi.org/10.3390/toxins10060236>
- Lee, C. M. Y., Iorno, N., Sierro, F., y Christ, D. (2007). Selection of human antibody fragments by phage display. *Nature Protocols*, 2(11), 3001–3008.
<http://doi.org/10.1038/nprot.2007.448>
- Leonard, M. M., Sapone, A., Catassi, C., y Fasano, A. (2017). Celiac disease and nonceliac gluten sensitivity: a review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 318(7), 647–656.
<http://doi.org/10.1001/jama.2017.9730>
- Lexhaller, B., Tompos, C., y Scherf, K. A. (2016). Comparative analysis of prolamin and glutenin fractions from wheat, rye, and barley with five sandwich ELISA test kits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(22), 6093–6104.
<http://doi.org/10.1007/s00216-016-9721-7>
- Lian, D. S., y Zeng, H. S. (2017). Capillary electrophoresis based on nucleic acid detection as used in food analysis. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(6), 1281–1295.
<http://doi.org/10.1111/1541-4337.12297>
- Lin-Cereghino, G. P., Stark, C. M., Kim, D., Chang, J., Shaheen, N., Poerwanto, H., Agari, K., Moua, P., Low, L. K., Tran, N., Huang, A. D., Nattestad, M., Oshiro, K. T., Chang, J. W., Chavan, A., Tsai, J. W., y Lin-Cereghino, J. (2013). The effect of α -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Gene*, 519(2), 311–317.
<http://doi.org/10.1016/j.gene.2013.01.062>
- Lin, H. Y., Huang, C. H., Park, J., Pathania, D., Castro, C. M., Fasano, A., Weissleder, R., y Lee, H. (2017). Integrated magneto-chemical sensor for on-site food allergen detection. *ACS Nano*, 11(10), 10062–10069.
<http://doi.org/10.1021/acsnano.7b04318>
- Lionetti, E., Gatti, S., Pulvirenti, A., y Catassi, C. (2015). Celiac disease from a global perspective. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 29(3), 365–379.
<http://doi.org/10.1016/j.bpg.2015.05.004>
- Liu, H., y May, K. (2012). Disulfide bond structures of IgG molecules. *MAbs*, 4(1), 17–23.
<http://doi.org/10.4161/mabs.4.1.18347>
- Liu, J., O’Kane, D. J., y Escher, A. (1997). Secretion of functional *Renilla reniformis* luciferase by mammalian cells. *Gene*, 203(2), 141–148.
[http://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00505-2](http://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00505-2)
- Liu, K. K., Wu, R. G., Chuang, Y. J., Khoo, H. S., Huang, S. H., y Tseng, F. G. (2010). Microfluidic systems for biosensing. *Sensors*, 10(7), 6623–6661.
<http://doi.org/10.3390/s100706623>
- Liu, Z., Huang, D., Fu, X., Cheng, P., y Du, E. (2018). Comparison of three commonly used fusion tags for the expression of nanobodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 32(2), 462–469.
<http://doi.org/10.1080/13102818.2017.1420426>
- López-Calleja, I. M., de la Cruz, S., Pegels, N., González, I., García, T., y Martín, R. (2013). High resolution TaqMan real-time PCR approach to detect hazelnut DNA encoding for ITS rDNA in foods. *Food Chemistry*, 141, 1872–1880.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.076>
- López-Calleja, I. M., de la Cruz, S., González, I., García, T., y Martín, R. (2014). Survey of undeclared allergenic pistachio (*Pistacia vera*) in commercial foods by hydrolysis probe real-time PCR. *Food Control*, 39(1), 49–55.
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.034>
- López-Calleja, I. M., de la Cruz, S., González, I., García, T., y Martín, R. (2015a). Market analysis of food products for detection of allergenic walnut (*Juglans regia*) and pecan (*Carya illinoensis*) by real-time PCR. *Food Chemistry*, 177, 111–119.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.017>
- López-Calleja, I. M., de la Cruz, S., Martín, R., González, I., y García, T. (2015b). Duplex real-time PCR method for the detection of sesame (*Sesamum indicum*) and flaxseed (*Linum usitatissimum*) DNA in processed food products. *Food Additives y Contaminants: Part A*, 32(11), 1772–1785.
<http://doi.org/10.1080/19440049.2015.1079650>
- López-Calleja, I. M., de la Cruz, S., González, I., García, T., y Martín, R. (2016). Duplex real-time PCR using TaqMan® for the detection of sunflower (*Helianthus annuus*) and poppy (*Papaver rhoeas*) in commercial food products. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 999–1007.
<http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.026>

- López, M. S. P., Cabanillas, G. F., Castañón, M. J. L., y López-Ruiz, B. (2014). Development of a genosensor for peanut allergen Ara h 2 detection and its optimization by surface response methodology. *Biosensors and Bioelectronics*, 62, 350–356.
<http://doi.org/10.1016/j.bios.2014.06.065>
- Luber, F., Demmel, A., Herbert, D., Hosken, A., Hupfer, C., Huber, I., Busch, U., y Engel, K. H. (2014). Comparative assessment of DNA-based approaches for the quantification of food allergens. *Food Chemistry*, 160, 104–111.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.077>
- Luka, G., Ahmadi, A., Najjaran, H., Alocilja, E., Derosa, M., Wolthers, K., Malki, A., Aziz, H., Althani, A., y Hoorfar, M. (2015). Microfluidics integrated biosensors: a leading technology towards lab-on-A-chip and sensing applications. *Sensors*, 15(12), 30011–30031.
<http://doi.org/10.3390/s151229783>
- Lundin, K. E. A., Nilsen, E. M., Scott, H. G., Løberg, E. M., Gjøen, A., Bratlie, J., Skar, V., Mendez, E., Løvik, A., y Kett, K. (2003). Oats induced villous atrophy in coeliac disease. *Gut*, 52(11), 1649–1652.
<http://doi.org/10.1136/gut.52.11.1649>
- ## M
- Macías-Iglesias, E. M. (2018). Alergia a los alimentos. *Pediatría Integral*, XXII(2), 87–93. Disponible online en (último acceso 10 de julio de 2019):
<http://www.pediatriaintegral.es/publicacion-2018-03/alergia-a-los-alimentos/>
- Madrid, R., de la Cruz, S., García-García, A., Alcocer, M. J. C., González, I., García, T., y Martín, R. (2018). Multimeric recombinant antibody (scFv) for ELISA detection of allergenic walnut. An alternative to animal antibodies. *Journal of Food Composition and Analysis*, 67, 201–210.
<http://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.01.017>
- Mafra, I., Ferreira, I. M. P. L. V. O., y Oliveira, M. B. P. P. (2008). Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, 227, 649–665.
<http://doi.org/10.1007/s00217-007-0782-x>
- Magliano, P. N., Prystupa, P., y Gutiérrez-Boem, F. H. (2014). Protein content of grains of different size fractions in malting barley. *Journal of the Institute of Brewing*, 120, 347–352.
<http://doi.org/10.1002/jib.161>
- Magnusson, B., y Örnemark, U. (2014). Eurachem guide: The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics, (2ª ed.). Disponible online en (último acceso 10 de julio de 2019):
<http://www.eurachem.org>
[http://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00500-2](http://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00500-2)
- Mamone, G., Picariello, G., Addeo, F., y Ferranti, P. (2011). Proteomic analysis in allergy and intolerance to wheat products. *Expert Review of Proteomics*, 8(1), 95–115.
<http://doi.org/10.1586/epr.10.98>
- Markiv, A., Beatson, R., Burchell, J., Durvasula, R. V., y Kang, A. S. (2011). Expression of recombinant multi-coloured fluorescent antibodies in *gor-/trxB- E. coli* cytoplasm. *BMC Biotechnology*, 11(1), artículo número 117, pp. 1-10.
<http://doi.org/10.1186/1472-6750-11-117>
- Martín-Fernández, B. (2015). Determinación indirecta de gluten mediante métodos basados en la detección de ADN: PCR y genosensores electroquímicos. Tesis Doctoral. Sección Departamental de Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España.
- Martín-Fernández, B., Costa, J., Oliveira, M. B. P. P., López-Ruiz, B., y Mafra, I. (2015a). Screening new gene markers for gluten detection in foods. *Food Control*, 56, 57–63.
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.047>
- Martín-Fernández, B., de-los-Santos-Álvarez, N., Martín-Clemente, J. P., Lobo-Castañón, M. J., y López-Ruiz, B. (2016). Challenging genosensors in food samples: the case of gluten determination in highly processed samples. *Talanta*, 146, 490–495.
<http://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.017>
- Martín-Fernández, B., Manzanares-Palenzuela, C. L., Sánchez-Paniagua, M., de-los-Santos-Álvarez, N., y López-Ruiz, B. (2017). Electrochemical genosensors in food safety assessment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), 2758–2774.
<http://doi.org/10.1080/10408398.2015.1067597>
- Martín, M., Cacho, J. F., Cepeda, A., Martín, F., y Prieto, I. (2010). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad (AESAN) en relación con la enfermedad celíaca y los problemas que plantean las técnicas analíticas para el control del contenido de gluten en los alimentos. *Revista Del Comité Científico*, 12, 63–78. Disponible online en (último acceso 11 de julio de 2019):
http://www.aecosan.mssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/TECNICAS_ANALITICAS_GLUTEN.pdf
- Mašková, E., Paulíčková, I., Rysová, J., y Gabrovská, D. (2011). Evidence for wheat, rye, and barley presence in gluten free foods by PCR method. Comparison with ELISA method. *Czech Journal of Food Sciences*, 29, 45–50. Disponible online en (último acceso 10 de julio de 2019):
<http://pdfs.semanticscholar.org/53df/0456a896385b4cbcd60a2f61c5c95ebf309f.pdf>
- McKevith, B. (2004). Nutritional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin*, 29(2), 111–142.
<http://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2004.00418.x>
- Melini, F., y Melini, V. (2018). Immunological methods in gluten risk analysis: a snapshot. *Safety*, 4(4),

- artículo número 56, pp. 1-18.
<http://doi.org/10.3390/safety4040056>
- Mena, M. C., Lombardía, M., Hernando, A., Méndez, E., y Albar, J. P. (2012). Comprehensive analysis of gluten in processed foods using a new extraction method and a competitive ELISA based on the R5 antibody. *Talanta*, *91*, 33-40.
<http://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.073>
- Miersch, S., y Sidhu, S. S. (2012). Synthetic antibodies: Concepts, potential and practical considerations. *Methods*, *57*(4), 486-498.
<http://doi.org/10.1016/j.jymeth.2012.06.012>
- Mills, E. N. C., Valovirta, E., Madsen, C., Taylor, S. L., Vieths, S., Anklam, E., Baumgartner, S., Koch, P., Crevel, R. W. R., y Frewer, L. (2004). Information provision for allergic consumers - where are we going with food allergen labelling? *Allergy*, *59*, 1262-1268.
<http://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2004.00720.x>
- Molina-Infante, J., Santolaria, S., Montoro, M., Esteve, M., y Fernández-Bañares, F. (2014). Sensibilidad al gluten no celiaca: una revisión crítica de la evidencia actual. *Gastroenterología y Hepatología*, *37*(6), 362-371.
<http://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2014.01.005>
- Monaci, L., y Visconti, A. (2009). Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens. *Trends in Analytical Chemistry*, *28*(5), 581-591.
<http://doi.org/10.1016/j.trac.2009.02.013>
- Monaci, L., y Visconti, A. (2010). Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives. *Trends in Food Science and Technology*, *21*(6), 272-283.
<http://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.02.003>
- Montalto, M., Santoro, L., D'Onofrio, F., Curigliano, V., Gallo, A., Visca, D., Cammarota, G., y Gasbarrini, G. (2008). Adverse reactions to food: allergies and intolerances. *Digestive Diseases*, *26*(2), 96-103.
<http://doi.org/10.1159/000116766>
- Moreano, F., Ehlert, A., Busch, U., y Engel, K. H. (2006). Ligation-dependent probe amplification for the simultaneous event-specific detection and relative quantification of DNA from two genetically modified organisms. *European Food Research and Technology*, *222*, 479-485.
<http://doi.org/10.1007/s00217-005-0169-9>
- Mori, A., Ojima-Kato, T., Kojima, T., y Nakano, H. (2018). Zipbodyzyme: development of new antibody-enzyme fusion proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *125*(6), 637-643.
<http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.12.021>
- Morino, K., Katsumi, H., Akahori, Y., Iba, Y., Shinohara, M., Ukai, Y., Kohara, Y., y Kurosawa, Y. (2001). Antibody fusions with fluorescent proteins: a versatile reagent for profiling protein expression. *Journal of Immunological Methods*, *257*, 175-184.
[http://doi.org/10.1016/s0022-1759\(01\)00462-8](http://doi.org/10.1016/s0022-1759(01)00462-8)
- Morón, B., Bethune, M. T., Comino, I., Manyani, H., Ferragud, M., López, M. C., Cebolla, Á., Khosla, C., y Sousa, C. (2008a). Toward the assessment of food toxicity for celiac patients: characterization of monoclonal antibodies to a main immunogenic gluten peptide. *PLoS ONE*, *3*(5), artículo número e2294, pp. 1-13.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0002294>
- Morón, B., Cebolla, Á., Manyani, H., Álvarez-Maqueda, M., Megías, M., Thomas, M. C., López, M. C., y Sousa, C. (2008b). Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide. *American Journal of Clinical Nutrition*, *87*, 405-414.
<http://doi.org/10.1093/ajcn/87.2.405>
- MRC-Holland. (2018). Designing synthetic MLPA probes and probemixes. CSM.TECH-001, v.4, pp. 1-22. MRC-Holland, Países Bajos. Disponible online en (último acceso 10 de julio de 2019):
<http://support.mlpa.com/downloads/files/designing-synthetic-mlpa-probes>
- MRC-Holland. (2019). MLPA general protocol: instructions for use, v.7, pp. 1-12. MRC-Holland, Países Bajos. Disponible online en (último acceso 10 de julio de 2019):
<http://www.mlpa.com>
- Mujico, J. R. (2007). Desarrollo de cuatro sistemas de PCR cuantitativa en tiempo real para la cuantificación y caracterización de ADN de trigo, de cebada y de centeno en alimentos "sin gluten" para celíacos: nuevas técnicas en la analítica de gluten. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Química-Física Aplicada y Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), Madrid, España.
- Mujico, J. R., Lombardía, M., Mena, M. C., Méndez, E., y Albar, J. P. (2011). A highly sensitive real-time PCR system for quantification of wheat contamination in gluten-free food for celiac patients. *Food Chemistry*, *128*, 795-801.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.061>
- Mujico, J. R., Dekking, L., Kooy-Winkelaar, Y., Verheijen, R., Van Wichen, P., Streppel, L., Sajic, N., Drijfhout, J. W., y Koning, F. (2012). Validation of a new enzyme-linked immunosorbent assay to detect the triggering proteins and peptides for celiac disease: interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, *95*(1), 206-215.
<http://doi.org/10.5740/jaoacint.11-042>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., y Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *51*, 263-273.
<http://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>
- Mustorp, S., Engdahl-Axelsson, C., Svensson, U., y Holck, A. (2008). Detection of celery (*Apium graveolens*), mustard (*Sinapis alba*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*) and sesame (*Sesamum indicum*) in food by

- real-time PCR. *European Food Research and Technology*, 226(4), 771–778.
<http://doi.org/10.1007/s00217-007-0589-9>
- Mustorp, S. L., Drømtorp, S. M., y Holck, A. L. (2011). Multiplex, quantitative, ligation-dependent probe amplification for determination of allergens in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5231–5239.
<http://doi.org/10.1021/jf200545>
- ## N
- Nagy, A., Vitásková, E., Černíková, L., Křivda, V., Jiřincová, H., Sedlák, K., Horníčková, J., y Havlíčková, M. (2017). Evaluation of TaqMan qPCR system integrating two identically labelled hydrolysis probes in single assay. *Scientific Reports*, 7, artículo número 41392, pp. 1–10.
<http://doi.org/10.1038/srep41392>
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., y Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 439, 231–250.
<http://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>
- Neethirajan, S., Weng, X., Tah, A., Cordero, J. O., y Ragavan, K. V. (2018). Nano-biosensor platforms for detecting food allergens. New trends. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 18, 13–30.
<http://doi.org/10.1016/j.sbsr.2018.02.005>
- Nowak-Węgrzyn, A., Katz, Y., Mehr, S. S., y Koletzko, S. (2015). Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(5), 1114–1124.
<http://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.03.025>
- Nwaru, B. I., Hickstein, L., Panesar, S. S., Roberts, G., Muraro, A., y Sheikh, A. on behalf of the EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group. (2014). Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*, 69(8), 992–1007.
<http://doi.org/10.1111/all.12423>
- Nylen, A., y Chen, M. (2018). Production of full-length antibody by *Pichia pastoris*. En *Recombinant Glycoprotein Production: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (vol. 1674, pp. 37–48), Picanco-Castro, E., y Swiech, K. (Ed.), Humana Press, Totowa, NJ, Estados Unidos.
<http://doi.org/10.1007/978-1-4939-7312-5>
- Nylund, L., Kaukinen, K., y Lindfors, K. (2016). The microbiota as a component of the celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *Clinical Nutrition Experimental*, 6, 17–24.
<http://doi.org/10.1016/j.yclnex.2016.01.002>
- ## O
- Obst, U., Lu, T. K., y Sieber, V. (2017). A modular toolkit for generating *Pichia pastoris* secretion libraries. *ACS Synthetic Biology*, 6(6), 1016–1025.
<http://doi.org/10.1021/acs.synbio.6b00337>
- Oelschlaeger, P., Srikant-Iyer, S., Lange, S., Schmitt, J., y Schmid, R. D. (2002). Fluorophor-linked immunosorbent assay: a time- and cost-saving method for the characterization of antibody fragments using a fusion protein of a single-chain antibody fragment and enhanced green fluorescent protein. *Analytical Biochemistry*, 309(1), 27–34.
[http://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00290-7](http://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00290-7)
- Oldfield, P. R. (2014). Understanding the matrix effect in immunoassays. *Bioanalysis*, 6(11), 1425–1427.
<http://doi.org/10.4155/bio.14.77>
- Olexová, L., Dovicovicová, L., Svec, M., Siekel, P., y Kuchta, T. (2006). Detection of gluten-containing cereals in flours and “gluten-free” bakery products by polymerase chain reaction. *Food Control*, 17, 234–237.
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.10.009>
- Ortiz, C., Valenzuela, R., y Lucero A., Y. (2017). Celiac disease, non celiac gluten sensitivity and wheat allergy: comparison of 3 different diseases triggered by the same food. *Revista Chilena de Pediatría*, 88(3), 417–423.
<http://doi.org/10.4067/S0370-4106201700030017>
- Ortolani, C., y Pastorello, E. A. (2006). Food allergies and food intolerances. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 20(3), 467–483.
<http://doi.org/10.1016/j.bpg.2005.11.010>
- Osborne, T. B. (1924). The vegetable proteins (2^a ed.) Longmans, Green and Co, Londres.
- ## P
- Pafundo, S., Gulli, M., y Marmiroli, N. (2009). SYBR®GreenER™ real-time PCR to detect almond in traces in processed food. *Food Chemistry*, 116(3), 811–815.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.040>
- Panasoff, J. (2008). Poppy seed anaphylaxis. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 18(3), 224–225. Disponible online en (último acceso 10 de julio de 2019):
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18564637>
- Panda, R., y Garber, E. A. E. (2019). Detection and quantitation of gluten in fermented-hydrolyzed foods by antibody-based methods: challenges, progress, and a potential path forward. *Frontiers in Nutrition*, 6, artículo número 97, pp. 1–12.
<http://doi.org/10.3389/fnut.2019.00097>
- Pande, J., Szewczyk, M. M., y Grover, A. K. (2010). Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnology Advances*, 28(6), 849–858.
<http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.004>
- Panjideh, H., Coelho, V., Dervede, J., Fuchs, H., Keilholz, U., Thiel, E., y Deckert, P. M. (2008). Production of bifunctional single-chain antibody-based fusion proteins in *Pichia pastoris* supernatants. *Bioprocess*

- and *Biosystems Engineering*, 31(6), 559–568.
<http://doi.org/10.1007/s00449-008-0203-y>
- Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P. K., Rao, P. V. L., y Morita, K. (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*, 18, 407–421.
<http://doi.org/10.1002/rmv.593>
- Parker, C. H., Khuda, S. E., Pereira, M., Ross, M. M., Fu, T. J., Fan, X., Wu, Y., Williams, K. M., DeVries, J., Pulvermacher, B., Bedford, B., Zhang, X., y Jackson, L. S. (2015). Multi-allergen quantitation and the impact of thermal treatment in industry-processed baked goods by ELISA and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(49), 10669–10680.
<http://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04287>
- Parmley, S. F., y Smith, G. P. (1988). Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*, 73, 305–318.
[http://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90495-7](http://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90495-7)
- Pastorello, E. A., Farioli, L., Conti, A., Pravettoni, V., Bonomi, S., Iametti, S., Fortunato, D., Scibilia, J., Bindslev-Jensen, C., Ballmer-Weber, B., Robino, A. M., y Ortolani, C. (2007). Wheat IgE-mediated food allergy in european patients: α -amylase inhibitors, lipid transfer proteins and low-molecular-weight glutenins. Allergenic molecules recognized by double-blind, placebo-controlled food challenge. *International Archives of Allergy and Immunology*, 144(1), 10–22.
<http://doi.org/10.1159/000102609>
- Patel, A., y Bahna, S. L. (2016). Hypersensitivities to sesame and other common edible seeds. *Allergy*, 71(10), 1405–1413.
<http://doi.org/10.1111/all.12962>
- Pedotti, M., Simonelli, L., Livoti, E., y Varani, L. (2011). Computational docking of antibody-antigen complexes, opportunities and pitfalls illustrated by influenza hemagglutinin. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 226–251.
<http://doi.org/10.3390/ijms12010226>
- Pegels, N. (2015). Aplicación de técnicas de PCR en tiempo real a la trazabilidad y autenticidad de los piensos. Tesis Doctoral. Departamento de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España.
- Pegels, N., González, I., Martín, I., Rojas, M., García, T., y Martín, R. (2011). Applicability assessment of a real-time PCR assay for the specific detection of bovine, ovine and caprine material in feedstuffs. *Food Control*, 22, 1189–1196.
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.01.015>
- Pegels, N., González, I., García, T., y Martín, R. (2015). Authenticity testing of wheat, barley, rye and oats in food and feed market samples by real-time PCR assays. *LWT - Food Science and Technology*, 60, 867–875.
<http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.049>
- Peipp, M., Saul, D., Barbin, K., Bruenke, J., Zunino, S. J., Niederweis, M., y Fey, G. H. (2004). Efficient eukaryotic expression of fluorescent scFv fusion proteins directed against CD antigens for FACS applications. *Journal of Immunological Methods*, 285(2), 265–280.
<http://doi.org/10.1016/j.jim.2003.12.001>
- Picariello, G., Mamone, G., Addeo, F., y Ferranti, P. (2011). The frontiers of mass spectrometry-based techniques in food allergenomics. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7386–7398.
<http://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.033>
- Piknová, L., Brežná, B., y Kuchta, T. (2008). Detection of gluten-containing cereals in food by 5'-nuclease real-time polymerase chain reaction. *Journal of Food and Nutrition Research*, 47(3), 114–119. Disponible online en (último acceso 10 de julio de 2019):
<http://www.vup.sk/en/download.php?bulID=72>
- Pinto-Sánchez, M. I., Causada-Calo, N., Bercik, P., Ford, A. C., Murray, J. A., Armstrong, D., Semrad, C., Kupfer, S. S., Alaedini, A., Moayyedi, P., Leffler, D. A., Verdú, E. F., y Green, P. (2017). Safety of adding oats to a gluten-free diet for patients with celiac disease: systematic review and meta-analysis of clinical and observational studies. *Gastroenterology*, 153(2), 395–409.
<http://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.009>
- Planque, M., Arnould, T., Dieu, M., Delahaut, P., Renard, P., y Gillard, N. (2017). Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for detecting ten allergens in complex and incurred foodstuffs. *Journal of Chromatography A*, 1530, 138–151.
<http://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.11.039>
- Platteau, C., De Loose, M., De Meulenaer, B., y Taverniers, I. (2011a). Detection of allergenic ingredients using real-time PCR: a case study on hazelnut (*Corylus avellana*) and soy (*Glycine max*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 10803–10814.
<http://doi.org/10.1021/jf202110f>
- Platteau, C., De Loose, M., De Meulenaer, B., y Taverniers, I. (2011b). Quantitative detection of hazelnut (*Corylus avellana*) in cookies: ELISA versus real-time PCR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11395–11402.
<http://doi.org/10.1021/jf202167b>
- Poczai, P., y Hyvönen, J. (2010). Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects. *Molecular Biology Reports*, 37(4), 1897–1912.
<http://doi.org/10.1007/s11033-009-9630-3>
- Polanco-Allué, I., y Martínez-Ojinaga, E. (2014). Sensibilidad al gluten no celíaca: realidad o ficción. *Anales de Pediatría Continuada*, 12(6), 289–293.
[http://doi.org/10.1016/s1696-2818\(14\)70206-9](http://doi.org/10.1016/s1696-2818(14)70206-9)

- Poms, R. E., Klein, C. L., y Anklam, E. (2004a). Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants*, 21(1), 1-31. <http://doi.org/10.1080/02652030310001620423>
- Poms, Roland Ernest, Anklam, E., y Kuhn, M. (2004b). Polymerase chain reaction techniques for food allergen detection. *Journal of AOAC International*, 87(6), 1391-1397. Disponible online en (último acceso 10 de julio de 2019): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15675451>
- Prado, M., Ortea, I., Vial, S., Rivas, J., Calo-Mata, P., y Barros-Velázquez, J. (2016). Advanced DNA- and protein-based methods for the detection and investigation of food allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(15), 2511-2542. <http://doi.org/10.1080/10408398.2013.873767>
- Puglisi, G., y Frieri, M. (2007). Update on hidden food allergens and food labeling. *Allergy and Asthma Proceedings*, 28(6), 634-639. <http://doi.org/10.2500/aap.2007.6.3066>
- Pulido, O. M., Gillespie, Z., Zarkadas, M., Dubois, S., Vavasour, E., Rashid, M., Switzer, C., y Godefroy, S. B. (2009). Introduction of oats in the diet of individuals with celiac disease. A systematic review. *Advances in Food and Nutrition Research*, 57, 235-285. [http://doi.org/10.1016/S1043-4526\(09\)57006-4](http://doi.org/10.1016/S1043-4526(09)57006-4)
- ## Q
- Qin, X., y Jin-Ming, L. (2015). Advances and applications of chemiluminescence immunoassay in clinical diagnosis and foods safety. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 43(6), 929-938. [http://doi.org/10.1016/S1872-2040\(15\)60831-3](http://doi.org/10.1016/S1872-2040(15)60831-3)
- ## R
- Rajput, R., Khanna, M., y Pradhan, H. K. (2014). Phage-display technology for the production of recombinant monoclonal antibodies. *Materials and Methods*, 4, artículo número 873, pp. 1-11. <http://doi.org/10.13070/mm.en.4.873>
- Rami, A., Behdani, M., Yardehnavi, N., Habibi-Anbouhi, M., y Kazemi-Lomedasht, F. (2017). An overview on application of phage display technique in immunological studies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(7), 599-602. <http://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.06.001>
- RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed), European Commission (2017). Annual Report. Publications Office of the European Union, Luxemburgo. Disponible online en (último acceso 10 de julio de 2019): http://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2017.pdf
- Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, del Ministerio de la Presidencia, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *BOE* 34, 11370-11421.
- Real Decreto 126/2015, de 27 de febrero, por el que se aprueba la norma general relativa a la información alimentaria de los alimentos que se presenten sin envasar para la venta al consumidor final y a las colectividades, de los envasados en los lugares de venta a petición del comprador, y de los envasados por los titulares del comercio al por menor. *BOE* 54, 20059- 20066.
- Rebe Raz, S., Liu, H., Norde, W., y Bremer, M. G. E. G. (2010). Food allergens profiling with an imaging surface plasmon resonance-based biosensor. *Analytical Chemistry*, 82(20), 8485-8491. <http://doi.org/10.1021/ac101819g>
- Regulation (EC) 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Official Journal of the European Communities*, L31, 1-24.
- Regulation (EC) No 41/2009 of the Commission of the European Communities of 20 January 2009 concerning the composition and labelling of foodstuffs suitable for people intolerant to gluten. *Official Journal of the European Union*, L16, 3-5.
- Regulation (EU) 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) 1924/2006 and (EC) 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) 608/2004. *Official Journal of the European Union*, L304, 18-63.
- Regulation (EU) No 828/2014 of the European Commission of 30 July 2014 on the requirements for the provision of information to consumers on the absence or reduced presence of gluten in food. *Official Journal of the European Union*, L228, 5-8.
- Remington, B. (2013). Risk assessment of trace and undeclared allergens in processed foods. Tesis Doctoral, Department of Food Science and Technology. University of Nebraska-Lincoln, Estados Unidos.
- Renz, H., Allen, K. J., Sicherer, S. H., Sampson, H. A., Lack, G., Beyer, K., y Oettgen, H. C. (2017). Food allergy. *Nature Reviews. Disease Primers*, 4, artículo número 17098, 1-20. <http://doi.org/10.1038/nrdp.2017.98>
- Rice, J.A., Lupo, A.J., (2014). Immunodiagnosics in food allergen testing. En: *Food Allergen Testing* (pp. 13-

- 28), Siragakis, G., Kizis, D. (Eds.). John Wiley & Sons, Ltd, Media, PA, Estados Unidos.
<http://doi.org/10.1002/9781118519219.ch02>
- Röckendorf, N., Meckelein, B., Scherf, K. A., Schalk, K., Koehler, P., y Frey, A. (2017). Identification of novel antibody-reactive detection sites for comprehensive gluten monitoring. *PLoS ONE*, 12(7), artículo número e0181566, pp. 1–17.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0181566>
- Rodrigues, F., Van Hemert, M., Steensma, H. Y., Côté-Real, M., y Leão, C. (2001). Red fluorescent protein (DsRed) as a reporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 183(12), 3791–3794.
<http://doi.org/10.1128/JB.183.12.3791>
- Rombouts, I., Lagrain, B., Brijs, K., y Delcour, J. A. (2010). β -Elimination reactions and formation of covalent cross-links in gliadin during heating at alkaline pH. *Journal of Cereal Science*, 52(3), 362–367.
<http://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.06.006>
- Rona, R. J., Keil, T., Summers, C., Gislason, D., Zuidmeer, L., Sodergren, E., Sigurdardottir, S. T., Lindner, T., Goldhahn, K., Dahlstrom, J., McBride, D., y Madsen, C. (2007). The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(3), 638–646.
<http://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.05.026>
- Rosas, M. R. (2006). Alergia e intolerancia alimentaria. *Offarm*, 25(7), 52–59. Disponible online en (último acceso 10 de julio de 2019):
<http://www.elsevier.es/index.php?p=revista&pRevista=pdf-simple&pii=13090873>
- Rosell, C. M., Barro, F., Sousa, C., y Mena, M. C. (2014). Cereals for developing gluten-free products and analytical tools for gluten detection. *Journal of Cereal Science*, 59(3), 354–364.
<http://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.10.001>
- Ross, G. M. S., Bremer, M. G. E. G., y Nielen, M. W. F. (2018). Consumer-friendly food allergen detection: moving towards smartphone-based immunoassays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(22), 5353–5371.
<http://doi.org/10.1007/s00216-018-0989-7>
- Rowley, M. J., O'Connor, K., y Wijeyewickrema, L. (2004). Phage display for epitope determination: a paradigm for identifying receptor-ligand interactions. *Biotechnology Annual Review*, 10, 151–188.
[http://doi.org/10.1016/S1387-2656\(04\)10006-9](http://doi.org/10.1016/S1387-2656(04)10006-9)
- Ruiz-Sánchez, J. G., Milla, S. P., Cortés, B. P., Plaza, B. L., López, L. M. B., y Gómez-Candela, C. (2018). Una visión global de las reacciones adversas a alimentos: alergia e intolerancia alimentaria. *Nutricion Hospitalaria*, 35(4), 102–108.
<http://doi.org/10.20960/nh.2134>
- Rumbo, M., Chirido, F. G., Fossati, C. A., y Añón, M. C. (2001). Analysis of the effects of heat treatment on gliadin immunochemical quantification using a panel of anti-prolamin antibodies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(12), 5719–5726.
<http://doi.org/10.1021/jf010180b>
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. The principles of humane experimental techniques. Johns Hopkins Bloom. Sch. Public Health, Baltimore, MD, Estados Unidos.
- Rzychon, M., Brohée, M., Cordeiro, F., Haraszi, R., Ulberth, F., y O'Connor, G. (2017). The feasibility of harmonizing gluten ELISA measurements. *Food Chemistry*, 234, 144–154.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.092>
- ## S
- Saerens, D., Huang, L., Bonroy, K., y Muyldermans, S. (2008). Antibody fragments as probe in biosensor development. *Sensors*, 8(8), 4669–4686.
<http://doi.org/10.3390/s8084669>
- Safi, H., Wangorsch, A., Lidholm, J., Brini, F., Spiric, J., Rihs, H. P., Vieths, S., Armentia, A., Farioli, L., Diaz-Perales, A., Pastorello, E. A., y Scheurer, S. (2019). Identification and molecular characterization of allergenic non-specific lipid-transfer protein from durum wheat (*Triticum turgidum*). *Clinical and Experimental Allergy*, 49(1), 120–129.
<http://doi.org/10.1111/cea.13271>
- Sajic, N., Oplatowska-Stachowiak, M., Streppel, L., Drijfhout, J. W., Salden, M., y Koning, F. (2017). Development and in-house validation of a competitive ELISA for the quantitative detection of gluten in food. *Food Control*, 80, 401–410.
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.05.021>
- Sakai, S., Adachi, R., Akiyama, H., y Teshima, R. (2013). Validation of quantitative and qualitative methods for detecting allergenic ingredients in processed foods in Japan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(24), 5675–5680.
<http://doi.org/10.1021/jf3033396>
- Sakamoto, S., Taura, F., Pongkitwitoon, B., Putalun, W., Tsuchihashi, R., Kinjo, J., Tanaka, H., y Morimoto, S. (2010). Development of sensitivity-improved fluorescence-linked immunosorbent assay using a fluorescent single-domain antibody against the bioactive naphthoquinone, plumbagin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(8), 2955–2963.
<http://doi.org/10.1007/s00216-010-3535-9>
- Sakamoto, S., Pongkitwitoon, B., Sasaki-Tabata, K., Putalun, W., Maenaka, K., Tanaka, H., y Morimoto, S. (2011). A fluorescent single domain antibody against plumbagin expressed in silkworm larvae for fluorescence-linked immunosorbent assay (FLISA). *Analyst*, 136(10), 2056–2063.
<http://doi.org/10.1039/c1an15027h>
- Salihah, N. T., Hossain, M. M., Lubis, H., y Ahmed, M. U. (2016). Trends and advances in food analysis by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Food Science and Technology*, 53(5), 2196–2209.

- <http://doi.org/10.1007/s13197-016-2205-0>
- Sampson, H. A., Aceves, S., Bock, S. A., James, J., Jones, S., Lang, D., Nadeau, K., Nowak-Wegrzyn, A., Oppenheimer, J., Perry, T. T., Randolph, C., Sicherer, S. H., Simon, R. A., Vickery, B. P., y Wood, R. (2014). Food allergy: a practice parameter update - 2014. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(5), 1016-1025.e43. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.05.013>
- Sancho, A. I., y Mills, E. N. C. (2010). Proteomic approaches for qualitative and quantitative characterisation of food allergens. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 58, S42-S46. <http://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.08.026>
- Sapone, A., Bai, J. C., Ciacci, C., Dolinsek, J., Green, P. H. R., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Rostami, K., Sanders, D. S., Schumann, M., Ullrich, R., Villalta, D., Volta, U., Catassi, C., y Fasano, A. (2012). Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Medicine*, 10(1), artículo número 13, pp. 1-12. <http://doi.org/10.1186/1741-7015-10-13>
- Sathe, S. K., Teuber, S. S., y Roux, K. H. (2005). Effects of food processing on the stability of food allergens. *Biotechnology Advances*, 23, 423-429. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.05.008>
- Savage, J., y Johns, C. B. (2015). Food allergy: epidemiology and natural history. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 35(1), 45-59. <http://doi.org/10.1016/j.iac.2014.09.004>
- Schalk, K., Lexhaller, B., Koehler, P., y Scherf, K. A. (2017). Isolation and characterization of gluten protein types from wheat, rye, barley and oats for use as reference materials. *PLoS ONE*, 12(2), artículo número e0172819, pp. 1-20. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0172819>
- Scherf, K. A., Brockow, K., Biedermann, T., Koehler, P., y Wieser, H. (2015). Wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Clinical and Experimental Allergy*, 46, 10-20. <http://doi.org/10.1111/cea.12640>
- Scherf, K. A., y Poms, R. E. (2016). Recent developments in analytical methods for tracing gluten. *Journal of Cereal Science*, 67, 112-122. <http://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.08.006>
- Scherf, K. A. (2017). Gluten analysis of wheat starches with seven commercial ELISA test kits. Up to six different values. *Food Analytical Methods*, 10(1), 234-246. <http://doi.org/10.1007/s12161-016-0573-8>
- Schouten, J. P., Mcelgunn, C. J., Waaijer, R., Zwiijnenburg, D., Diepvens, F., y Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, 30(12), e57, pp. 1-13. <http://doi.org/10.1093/nar/gnf056>
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., y Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 1014-1026. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- 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(1), 69-81. <http://doi.org/10.1007/s00216-009-2715-y>
- Scott, D. J., Gunn, N. J., Yong, K. J., Wimmer, V. C., Veldhuis, N. A., Challis, L. M., Haidar, M., Petrou, S., Bathgate, R. A. D., y Griffin, M. D. W. (2018). A novel ultra-stable, monomeric green fluorescent protein for direct volumetric imaging of whole organs using CLARITY. *Scientific Reports*, 8(1), artículo número 667, pp. 1-15. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-18045-y>
- Seoane-Rodríguez, M., Caralli, M. E., Morales-Cabeza, C., Micozzi, S., de Barrio-Fernández, M., y Rojas Pérez-Ezquerro, P. (2016). Cereal-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Revista Alergia México*, 63(1), 104-107. Disponible online en (último acceso 10 de julio de 2019): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26943835>
- Sergeeva, A., Kolonin, M. G., Molldrem, J. J., Pasqualini, R., y Arap, W. (2006). Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), 1622-1654. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.018>
- Serrano-Rivero, Y., Marrero-Domínguez, K., y Fando-calzada, R. (2016). *Pichia pastoris*: una plataforma para la producción de proteínas heterólogas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 47(2), 67-77. Disponible online en (último acceso 11 de julio de 2019): <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181245821001>
- Shan, L., Molberg, Ø., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G. M., Sollid, L. M., y Khosla, C. (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, 297(5590), 2275-2279. <http://doi.org/10.1126/science.1074129>
- Shaner, N. C., Lin, M. Z., McKeown, M. R., Steinbach, P. A., Hazelwood, K. L., Davidson, M. W., y Tsien, R. Y. (2008). Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nature Methods*, 5(6), 545-551. <http://doi.org/10.1038/nmeth.1209>
- Sharma, G. M., Rallabhandi, P., Williams, K. M., y Pahlavan, A. (2016). Characterization of antibodies for grain-specific gluten detection. *Journal of Food Science*, 81(3), 810-816. <http://doi.org/10.1111/1750-3841.13241>
- Sherf, B. A., Navarro, S. L., Hannah, R. R., y Wood, K. V. (1996). Dual-luciferase™ reporter assay: an advanced co-reporter technology integrating Firefly and Renilla luciferase assays. *Promega Notes*

- Magazine*, 57, 2-9. Disponible online en (último acceso 14 de julio de 2019): <http://www.researchgate.net/publication/238747666>
- Shewry, P. R., Halford, N. G., Belton, P. S., y Tatham, A. S. (2002). The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357, 133–142. <http://doi.org/10.1098/rstb.2001.1024>
- Shewry, P. R., Halford, N. G., y Lafiandra, D. (2003). Genetics of wheat gluten proteins. *Advances in Genetics*, 49, 111–184. [http://doi.org/10.1016/S0065-2660\(03\)01003-4](http://doi.org/10.1016/S0065-2660(03)01003-4)
- Shewry, P. R., y Tatham, A. S. (2016). Improving wheat to remove coeliac epitopes but retain functionality. *Journal of Cereal Science*, 67, 12–21. <http://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.06.005>
- Shewry, P. (2019). What is gluten? Why is it special? *Frontiers in Nutrition*, 6, artículo número 101, pp. 1–10. <http://doi.org/10.3389/fnut.2019.00101>
- Shrestha, S., y Deo, S. K. (2006). Anthozoa red fluorescent protein in biosensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(3), 515–524. <http://doi.org/10.1007/s00216-006-0652-6>
- Sicherer, S. H., y Sampson, H. A. (2014). Food allergy: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(2), 291–307. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.11.020>
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.003>
- Sidhu, S. S. (2001). Engineering M13 for phage display. *Biomolecular Engineering*, 18, 57–63. [http://doi.org/10.1016/S1389-0344\(01\)00087-9](http://doi.org/10.1016/S1389-0344(01)00087-9)
- Silano, M., Vincentini, O., y De Vincenzi, M. (2009). Toxic, immunostimulatory and antagonist gluten peptides in celiac disease. *Current Medicinal Chemistry*, 16(12), 1489–1498. <http://doi.org/10.2174/092986709787909613>
- Singh, P., Arora, A., Strand, T. A., Leffler, D. A., Catassi, C., Green, P. H., Kelly, C. K., Ahuja, V., y Makharia, G. K. (2018). Global prevalence of celiac disease: systematic review and meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 16(6), 823–836. <http://doi.org/10.1016/j.cgh.2017.06.037>
- Słowianek, M., y Majak, I. (2011). Methods of allergen detection based on DNA analysis. *Biotechnology and Food Science*, 75(2), 39–44. Disponible online en (último acceso 10 de julio de 2019): <http://core.ac.uk/download/pdf/53096151.pdf>
- Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228(4705), 1315–1317. <http://doi.org/10.1126/science.4001944>
- Smith, G. P., y Petrenko, V. A. (1997). Phage display. *Chemical Reviews*, 97(2), 391–410. <http://doi.org/10.1021/cr960065d>
- Soares-Weiser, K., Takwoingi, Y., Panesar, S. S., Muraro, A., Werfel, T., Hoffmann-Sommergruber, K., Roberts, G., Halken, S., Poulsen, L., van Ree, R., Vlieg-Boerstra, B. J., y Sheikh, A., on behalf of the EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group (2014). The diagnosis of food allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*, 69(1), 76–86. <http://doi.org/10.1111/all.12333>
- Sollid, L. M., Qiao, S. W., Anderson, R. P., Gianfrani, C., y Koning, F. (2012). Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics*, 64(6), 455–460. <http://doi.org/10.1007/s00251-012-0599-z>
- Soon, J. M., y Manning, L. (2017). “May contain” allergen statements: facilitating or frustrating consumers? *Journal of Consumer Policy*, 40(4), 447–472. <http://doi.org/10.1007/s10603-017-9358-8>
- Šotkovský, P., Sklenář, J., Halada, P., Cinová, J., Šetinová, I., Kainarová, A., Goliáš, J., Pavlásková, K., Honzová, S., y Tučková, L. (2011). A new approach to the isolation and characterization of wheat flour allergens. *Clinical and Experimental Allergy*, 41(7), 1031–1043. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2011.03766.x>
- Spanjersberg, M. Q. I., Knulst, A. C., Kruizinga, A. G., van Duijn, G., y Houben, G. F. (2010). Concentrations of undeclared allergens in food products can reach levels that are relevant for public health. *Food Additives and Contaminants*, 27(2), 169–174. <http://doi.org/10.1080/19440040903317513>
- Stadlmann, V., Harant, H., Korschineck, I., Hermann, M., Forster, F., y Missbichler, A. (2015). Novel avian single-chain fragment variable (scFv) targets dietary gluten and related natural grain prolamins, toxic entities of celiac disease. *BMC Biotechnology*, 15(1), 109. <http://doi.org/10.1186/s12896-015-0223-z>
- Strack, R. L., Strongin, D. E., Bhattacharyya, D., Tao, W., Berman, A., Broxmeyer, H. E., Keenan, R. J., y Glick, B. S. (2008). A noncytotoxic DsRed variant for whole-cell labeling. *Nature Methods*, 5(11), 955–957. <http://doi.org/10.1038/nmeth.1264>
- Sue, M. J., Yeap, S. K., Omar, A. R., y Tan, S. W. (2014). Application of PCR-ELISA in molecular diagnosis. *BioMed Research International*, artículo número 653014, pp. 1–6. <http://doi.org/10.1155/2014/653014>
- Szeto, K., Latulippe, D. R., Ozer, A., Pagano, J. M., White, B. S., Shalloway, D., Lis, J. T., y Craighead, H. G. (2013). RAPID-SELEX for RNA aptamers. *PLoS ONE*, 8(12), artículo número e82667, pp. 1–11. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0082667>

T

- Tanner, G. J., Blundell, M. J., Colgrave, M. L., y Howitt, C. A. (2013a). Quantification of hordeins by ELISA: the correct standard makes a magnitude of difference. *PLoS ONE*, 8(2), artículo número e56456, pp. 1-14 <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0056456>
- Tanner, G. J., Colgrave, M. L., Blundell, M. J., Goswami, H. P., y Howitt, C. A. (2013b). Measuring hordein (gluten) in beer. A comparison of ELISA and mass spectrometry. *PLoS ONE*, 8(2), artículo número e56452, pp. 1-13. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0056452>
- Tatham, A. S., Gilbert, S. M., Fido, R. J., y Shewry, P. R. (2000). Extraction, separation, and purification of wheat gluten proteins and related proteins of barley, rye, and oats. En: *Methods in Molecular Medicine*, Vol 41 (Celiac Disease: Methods and Protocols, pp. 55-73) Marsh, M. N. (Ed.). Humana Press Inc., Totowa, NJ, Estados Unidos. <http://doi.org/10.1385/1-59259-082-9:055>
- Taylor-Black, S., y Wang, J. (2012). The prevalence and characteristics of food allergy in urban minority children. *Annals of Allergy, Asthma y Immunology*, 109(6), 431-437. <http://doi.org/10.1016/j.anai.2012.09.012>
- Teixeira, D., y Gonzalez-Pajuelo, M. (2018). Phage display technology for selection of antibody fragments. En: *Biomedical applications of functionalized nanomaterials: concepts, development and clinical translation* (pp. 67-88). Sarmento, B., y das Neves, J. (Ed.), Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-323-50878-0.00003-3>
- Terzi, V., Malnati, M., Barbanera, M., Stanca, A. M., y Faccioli, P. (2003). Development of analytical systems based on real-time PCR for *Triticum* species-specific detection and quantitation of bread wheat contamination in semolina and pasta. *Journal of Cereal Science*, 38, 87-94. [http://doi.org/10.1016/S0733-5210\(02\)00138-8](http://doi.org/10.1016/S0733-5210(02)00138-8)
- Thakur, M. S., y Ragavan, K. V. (2013). Biosensors in food processing. *Journal of Food Science and Technology*, 50(4), 625-641. <http://doi.org/10.1007/s13197-012-0783-z>
- Thompson, E. M., Nagata, S., y Tsuji, F. I. (1989). Cloning and expression of cDNA for the luciferase from the marine ostracod *Vargula hilgendorffii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 6567-6571. <http://doi.org/10.1073/pnas.86.17.6567>
- Thompson, T., y Méndez, E. (2008). Commercial assays to assess gluten content of gluten-free foods: why they are not created equal. *Journal of the American Dietetic Association*, 108(10), 1682-1687. <http://doi.org/10.1016/j.jada.2008.07.012>
- Tuire, I., Marja-Leena, L., Teea, S., Katri, H., Jukka, P., Päivi, S., Heini, H., Markku, M., Pekka, C., y Katri, K. (2012). Persistent duodenal intraepithelial

lymphocytosis despite a long-term strict gluten-free diet in celiac disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 107(10), 1563-1569. <http://doi.org/10.1038/ajg.2012.220>

- Tye-Din, J. A., Galipeau, H. J., y Agardh, D. (2018). Celiac disease: a review of current concepts in pathogenesis, prevention, and novel therapies. *Frontiers in Pediatrics*, 6, artículo número 350 pp. 1-19. <http://doi.org/10.3389/fped.2018.00350>

U

- Uchański, T., Zögg, T., Yin, J., Yuan, D., Wohlkönig, A., Fischer, B., Rosenbaum, D. M., Kobilka, B. K., Pardon, E., y Steyaert, J. (2019). An improved yeast surface display platform for the screening of nanobody immune libraries. *Scientific Reports*, 9(1), artículo número 382, pp.1-12. <http://doi.org/10.1038/s41598-018-37212-3>
- Ujhelyi, G., Van Dijk, J. P., Prins, T. W., Voorhuijzen, M. M., Hoef, A. Van, Beenen, H. G., Morisset, D., Gruden, K., y Kok, E. J. (2012). Comparison and transfer testing of multiplex ligation detection methods for GM plants. *BMC Biotechnology*, 12, artículo número 4 pp. 1-12. <http://doi.org/10.1186/1472-6750-12-4>
- Unterberger, C., Luber, F., Demmel, A., Grünwald, K., Huber, I., Engel, K. H., y Busch, U. (2014). Simultaneous detection of allergenic fish, cephalopods and shellfish in food by multiplex ligation-dependent probe amplification. *European Food Research and Technology*, 239, 559-566. <http://doi.org/10.1007/s00217-014-2251-7>
- Uzzaman, A., y Komarow, H. D. (2013). The immunological basis of non-IgE-mediated reactions. En: *Food Allergy: Adverse Reactions to Foods and Food Additives* (5th ed. pp. 31-46) Metcalfe, D. D., Sampson, H. A., Simon, R. A., y Lack, G. (Ed.) John Wiley & Sons Ltd, Chichester, Reino Unido. <http://doi.org/10.1002/9781118744185.ch3>

V

- Valdés, I., García, E., Llorente, M., y Méndez, E. (2003). Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *European Journal of Gastroenterology y Hepatology*, 15(5), 465-474. <http://doi.org/10.1097/01.meg.0000059119.41030.df>
- Valenti, S., Corica, D., Ricciardi, L., y Romano, C. (2017). Gluten-related disorders: certainties, questions and doubts. *Annals of Medicine*, 49(7), 569-581. <http://doi.org/10.1080/07853890.2017.1325968>
- van der Borgh, A., Goesart, H., Veraverbeke, W. S., y Delcour, J. A. (2005). Fractionation of wheat and

- wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved. *Journal of Cereal Science*, 41(3), 221–237.
<http://doi.org/10.1016/j.jcs.2004.09.008>
- van Eckert, R., Berghofer, E., Ciclitira, P. J., Chirido, F., Denery-Papini, S., Ellis, H. J., Ferranti, P., Goodwin, P., Immer, U., Mamone, G., Méndez, E., Mothes, T., Novalin, S., Osman, A., Rumbo, M., Stern, M., Thorell, L., Whim, A., y Wieser, H. (2006). Towards a new gliadin reference material-isolation and characterisation. *Journal of Cereal Science*, 43(3), 331–341.
<http://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.12.009>
- van Hengel, A. J. (2007). Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(1), 111–118.
<http://doi.org/10.1007/s00216-007-1353-5>
- Vaquero, L., Álvarez-Cuenllas, B., Rodríguez-Martín, L., Aparicio, M., Jorquera, F., Olcoz, J. L., y Vivas, S. (2015). Revisión de las patologías relacionadas con la ingesta de gluten. *Nutricion Hospitalaria*, 31(6), 2359–2371.
<http://doi.org/10.3305/nh.2015.31.6.8984>
- Venisnik, K. M., Olafsen, T., Gambhir, S. S., y Wu, A. M. (2007). Fusion of *Gaussia* luciferase to an engineered anti-carcinoembryonic antigen (CEA) antibody for *in vivo* optical imaging. *Molecular Imaging and Biology*, 9(5), 267–277.
<http://doi.org/10.1007/s11307-007-0101-8>
- Verhaegent, M., y Christopoulos, T. K. (2002). Recombinant *Gaussia* luciferase: overexpression, purification, and analytical application of a bioluminescent reporter for DNA hybridization. *Analytical Chemistry*, 74(17), 4378–4385.
<http://doi.org/10.1021/ac025742k>
- Verma, H. K., Shukla, P., Alfatah, M., Khare, A. K., Upadhyay, U., Ganesan, K., y Singh, J. (2014). High level constitutive expression of luciferase reporter by *lsd90* promoter in fission yeast. *PLoS ONE*, 9(7), artículo número e101201, pp. 1–10.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0101201>
- Villaño, D., García-Parrilla, M. C., Morales, L., Troncoso, A. M., (2012). Alergia alimentaria. En: *Toxicología Alimentaria* (pp. 581-592) Camean, A. M., Repetto, M. (Eds.), Ediciones Díaz de Santos, Madrid, España.
- Vivas, S., y Ruiz, J. M. (2008). Enfermedad celíaca refractaria. *Gastroenterología y Hepatología*, 31(5), 310–316.
<http://doi.org/10.1157/13119885>
- Volta, U., y De Giorgio, R. (2012). New understanding of gluten sensitivity. *Nature Reviews: Gastroenterology and Hepatology*, 9(5), 295–299.
<http://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.15>
- von Büren, M., Stadler, M., y Lüthy, J. (2001). Detection of wheat adulteration of spelt flour and products by PCR. *European Food Research and Technology*, 212, 234–239.
<http://doi.org/10.1007/s002170000230>
- W**
- Wammes, A. E. M., van Delft, F. L., van Hest, J. C. M., y Löwik, D. W. P. M. (2015). Surface plasmon resonance (SPR) sensors for detecting allergens in food. En: *Handbook of Food Allergen Detection and Control* (pp. 229-244), Flanagan, S. (Ed.). Woodhead Publishing, Cambridge, Reino Unido.
<http://doi.org/10.1533/9781782420217.2.229>
- Ward, R., Crevel, R., Bell, I., Khandke, N., Ramsay, C., y Paine, S. (2010). A vision for allergen management best practice in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 619–625.
<http://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.09.004>
- Ward, R. L., Clark, M. A., Lees, J., y Hawkins, N. J. (1996). Retrieval of human antibodies from phage-display libraries using enzymatic cleavage. *Journal of Immunological Methods*, 189(1), 73–82.
[http://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00231-6](http://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00231-6)
- Waserman, S., Bégin, P., y Watson, W. (2018). IgE-mediated food allergy. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 14(s2:55), 71–81.
<http://doi.org/10.1007/s12016-018-8710-3>
- Weisser, N. E., y Hall, J. C. (2009). Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnology Advances*, 27(4), 502–520.
<http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.004>
- Wemmer, S. (2008). Expression and engineering of recombinant antibodies against a heat-shock protein of *Mycobacterium bovis*. Tesis Doctoral. Universidad de Pretoria, Sudáfrica.
- Weng, X., Gaur, G., y Neethirajan, S. (2016). Rapid detection of food allergens by microfluidics ELISA-based optical sensor. *Biosensors*, 6(2), artículo número 24, pp. 1–10.
<http://doi.org/10.3390/bios6020024>
- Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24(2), 115–119.
<http://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.004>
- Wieser, H., y Koehler, P. (2009). Is the calculation of the gluten content by multiplying the prolamin content by a factor of 2 valid? *European Food Research and Technology*, 229(1), 9–13.
<http://doi.org/10.1007/s00217-009-1020-5>
- Wong, Y. P., Othman, S., Lau, Y. L., Radu, S., y Chee, H. Y. (2018). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 124(3), 626–643.
<http://doi.org/10.1111/jam.13647>
- X**
- Xiulan, S., Yinzhi, Z., Jingdong, S., Liyan, S., He, Q., y Weijuan, Z. (2010). A quartz crystal microbalance-based immunosensor for shrimp allergen

determination in food. *European Food Research and Technology*, 231(4), 563–570.
<http://doi.org/10.1007/s00217-010-1305-8>

Y

Yamakawa, H., Akiyama, H., Endo, Y., Miyatake, K., Sakata, K., Sakai, S., ... Urisu, A. (2007). Specific detection of wheat residues in processed foods by polymerase chain reaction. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(10), 2561–2564.
<http://doi.org/10.1271/bbb.70251>

Yamamoto, K. R., Alberts, B. M., Benzinger, R., Lawhorne, L., y Treiber, G. (1970). Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology*, 40(3), 734–744.
[http://doi.org/10.1016/0042-6822\(70\)90218-7](http://doi.org/10.1016/0042-6822(70)90218-7)

Yang, A., Zheng, Y., Long, C., Chen, H., Liu, B., Li, X., Yuan, J., y Cheng, F. (2014). Fluorescent immunosorbent assay for the detection of alpha lactalbumin in dairy products with monoclonal antibody bioconjugated with CdSe/ZnS quantum dots. *Food Chemistry*, 150, 73–79.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.137>

Yasmin, J., Ahmed, M. R., y Cho, B. K. (2016). Biosensors and their applications in food safety: a review. *Journal of Biosystems Engineering*, 41(3), 240–254.
<http://doi.org/10.5307/JBE.2016.41.3.240>

Yin, H. Y., Chu, P. T., Tsai, W. C., y Wen, H. W. (2016). Development of a barcode-style lateral flow immunoassay for the rapid semi-quantification of gliadin in foods. *Food Chemistry*, 192, 934–942.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.112>

Yuan, B., Schulz, P., Liu, R., y Sierks, M. R. (2006). Improved affinity selection using phage display technology and off-rate based selection. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(2), 171–175.
<http://doi.org/10.2225/vol9-issue2-fulltext-6>

Z

Zarei, N., Vaziri, B., Shokrgozar, M. A., Mahdian, R., Fazel, R., y Khalaj, V. (2014). High efficient expression of a functional humanized single-chain variable fragment (scFv) antibody against CD22 in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(24), 10023–10039.
<http://doi.org/10.1007/s00253-014-6071-2>

Zeltner, D., Glomb, M. A., y Maede, D. (2009). Real-time PCR systems for the detection of the gluten-containing cereals wheat, spelt, kamut, rye, barley and oat. *European Food Research and Technology*, 228, 321–330.
<http://doi.org/10.1007/s00217-008-0937-4>

Zeng, Z., Shen, Z., y Ray, M. (2012). Recombinant antibodies and their use in biosensors. *Analytical*

and Bioanalytical Chemistry, 402(10), 3027–3038.
<http://doi.org/10.1007/s00216-011-5569-z>

Zhang, Y., Lai, B. S., y Juhas, M. (2019). Recent advances in aptamer discovery and applications. *Molecules*, 24, Artículo número 941, pp. 1–22.
<http://doi.org/10.3390/molecules24050941>

Zhou, J., Qi, Q., Wang, C., Qian, Y., Liu, G., Wang, Y., y Fu, L. (2019). Surface plasmon resonance (SPR) biosensors for food allergen detection in food matrices. *Biosensors and Bioelectronics*, artículo número 111449
<http://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111449>

Zuidmeer, L., Goldhahn, K., Rona, R. J., Gislason, D., Madsen, C., Summers, C., Sodergren, E., Dahlstrom, J., Lindner, T., Sigurdardottir, S. T., McBride, D., y Keil, T. (2008). The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(5), 1210–1218.
<http://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.02.019>



**ANEXO
OTRAS
PUBLICACIONES**

Chapter 8

Detection of Food Allergens by Taqman Real-Time PCR Methodology

Aina García, Raquel Madrid, Teresa García, Rosario Martín, and Isabel González

Abstract

Real-time PCR (polymerase chain reaction) has shown to be a very effective technology for the detection of food allergens. The protocol described herein consists on a real-time PCR assay targeting the plant ITS (Internal Transcribed Spacer) region, using species-specific primers and hydrolysis probes (Taqman) dual labeled with a reporter fluorophore at the 5' end (6-carboxyfluorescein, FAM) and a quencher fluorophore at the 3' end (Blackberry, BBQ). The species-specific real-time PCR systems (primers/probe) described in this work allowed the detection of different nuts (peanut, hazelnut, pistachio, almond, cashew, macadamia, walnut and pecan), common allergens present in commercial food products, with a detection limit of 0.1 mg/kg.

Key words Real-time polymerase chain reaction, Taqman probe, Nuts, Food allergy

1 Introduction

Within the food industry and official food control agencies, the currently most commonly used methods to assess the presence of allergens in food products are based in protein detection [1]. Particularly, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the interaction of species-specific proteins with specific antibodies either raised in animals [2, 3] or produced by recombinant technologies [4, 5], is the most widespread and commonly used protein-based test for allergen detection. Immunochemical methods can be highly sensitive and specific; however, depending on the epitopes recognized by the antibodies, they may be biased by cross-reactivity with other species. Moreover, the detection of the target proteins can be compromised by the variety of food



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID