



## RESOLUCIÓN OIV/OENO 427/2010

### CRITERIOS PARA LOS MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE LOS RESIDUOS, POTENCIALMENTE ALERGÉNICOS, DE PROTEÍNAS USADAS EN LA CLARIFICACIÓN DE LOS VINOS

La ASAMBLEA GENERAL,

De conformidad con el párrafo 2 (iv) del artículo 2 del acuerdo sobre la creación de la Organización Internacional de la Viña y el Vino,

Y a petición de la Subcomisión de Métodos de Análisis de los Vinos,

Considerando que las actividades de la OIV deben contribuir a la protección de la salud del consumidor y a la seguridad alimentaria,

SUBRAYA: Que estos criterios deben revisarse a la luz de las decisiones de otros organismos internacionales,

Reconoce que no se recomiendan métodos específicos para la determinación cuantitativa de las proteínas usadas en la clarificación por encolado del vino. Varios métodos ELISA ya están disponibles y pueden emplearse.

DECIDE: Aprobar los criterios descritos más abajo para los métodos de cuantificación de los residuos, potencialmente alergénicos de las proteínas usadas en la clarificación de los vinos.

### CRITERIOS PARA LOS MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE LOS RESIDUOS POTENCIALMENTE ALERGÉNICOS DE LAS PROTEÍNAS USADAS EN LA CLARIFICACIÓN DE LOS VINOS

#### 1 Definiciones de los criterios metodológicos

Veracidad                      Grado de concordancia existente entre el valor medio obtenido de una serie grande de resultados de pruebas y un valor de referencia aceptado.

r =                                Límite de repetibilidad: valor por debajo del cual puede esperarse que se sitúe la diferencia absoluta entre los resultados de dos pruebas particulares, obtenidos en condiciones de repetibilidad (es decir, con la misma muestra,

*Certificado conforme  
Tbilisi, 25 de junio de 2010  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

el mismo operario, el mismo instrumental, en el mismo laboratorio y en un breve intervalo de tiempo) dentro de los límites de una probabilidad específica (típicamente, el 95%); de donde:  $r = 2,8 \times s_r$ .

- $S_r =$  Desviación típica calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de repetibilidad.
- $RSD_r =$  Desviación típica relativa calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de repetibilidad  $[(S_r/\bar{x}) \times 100]$ , donde  $\bar{x}$  representa la media de los resultados de todos los laboratorios y muestras.
- $R =$  Límite de reproducibilidad: valor por debajo del cual puede esperarse que se sitúe la diferencia absoluta entre los resultados de pruebas particulares, obtenidos en condiciones de reproducibilidad (es decir, con el mismo material obtenido por operarios en distintos laboratorios, mediante el método de análisis normalizado) dentro de los límites de una probabilidad específica (típicamente, el 95%); de donde:  $R = 2,8 \times s_r$ .
- $S_R =$  Desviación típica calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad.
- $RSD_R =$  Desviación típica relativa calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad  $[(S_R/\bar{x}) \times 100]$ .
- $H_{OR} =$  HORRAT: cociente entre la desviación típica relativa de la reproducibilidad observada y la calculada mediante la ecuación de Horwitz.
- $B_0 =$  Valor medio del blanco
- $LOD =$  Límite de detección, calculado como  $LOD = B_0 + 3 \times S_r(B_0)$
- $LOQ =$  Límite de cuantificación, calculado como  $LOQ = B_0 + 10 \times S_r(B_0)$

*Certificado conforme  
Tbilisi, 25 de junio de 2010  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

## 2. Aspectos generales

### Requisitos

El método de análisis debe estar relacionado con prácticas enológicas definidas.

### Aditivos o coadyuvantes tecnológicos

Hay que caracterizar desde el punto de vista químico cada producto; el control de calidad es obligatorio.

### Tipo de métodos analíticos

En términos generales, los métodos inmunoenzimáticos son los más adecuados y sencillos para los controles sistemáticos de alérgenos.

**Para determinar cuantitativamente las proteínas usadas en la clarificación por encolado de los vinos hay que emplear los métodos de ELISA tipo Sándwich, Competitivo, Directo o Indirecto.**

**Si no hay ningún anticuerpo marcado enzimáticamente, puede usarse un anticuerpo biotinilado y conjugado con avidina-HRP para la detección.**

### Anticuerpos

- Caracterización de anticuerpos (alérgenos reconocidos con mayor o menor afinidad)
- Gran especificidad por los coadyuvantes tecnológicos comerciales (caracterizados según se describe más arriba)
- Caracterización de la reactividad cruzada que tenga en cuenta las proteínas que se usan habitualmente en las prácticas enológicas
- Capacidad para detectar derivados de alérgenos debidos a los tratamientos enológicos (proteólisis o cambios moleculares)

### Método

- Los anticuerpos deberían tener capacidad de unión óptimas del anticuerpo en las muestras de vino
- Los métodos deben tener funcionamiento óptimo en las muestras de vino con diferentes características químicas (pH y extracto seco, tintos y blancos, etc.)
- Los resultados con vinos procedentes de zonas geográficas distintas (aunque las prácticas enológicas sean distintas) deben ser comparables
- La capacidad de unión de los anticuerpos debe ser óptima en relación con las diferentes condiciones de la maduración del vino (tiempo, temperatura, cambios de color...)

*Certificado conforme  
Tbilisi, 25 de junio de 2010  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

### **3. Tipo de métodos**

No se recomiendan métodos específicos para la determinación cuantitativa de las proteínas usadas en la clarificación por encolado del vino. Varios métodos ELISA ya están disponibles y pueden emplearse.

Los laboratorios deberán utilizar métodos válidos de acuerdo con los requisitos de la OIV y que cumplan con los criterios de eficacia que figuran en la tabla 1. Siempre que sea posible, en el estudio en colaboración se incluirá un material de referencia certificado para las validaciones. En caso de que no estén disponibles, se debe utilizar un método alternativo para estimar la veracidad.

#### **Protocolo general para el método de ELISA Directo e Indirecto**

El método directo en un paso utiliza sólo un anticuerpo marcado. Este anticuerpo marcado se incuba con el antígeno de la muestra/estándar unido al pocillo.

El método indirecto en dos pasos utiliza un anticuerpo secundario marcado para la detección. Primero se incuba un anticuerpo primario con el antígeno de la muestra/estándar unido al pocillo. A continuación se incuba con un anticuerpo secundario marcado que reconoce el anticuerpo primario.

#### **Directo:**

1. Preparar una superficie a la que se ha unido el antígeno de la muestra.
2. Bloquear para evitar las uniones inespecíficas en la superficie.
3. Añadir los anticuerpos ligados a enzimas que se unen específicamente al antígeno.
4. Lavar la placa para eliminar el exceso de anticuerpos (que no se hayan unido con el antígeno).
5. Añadir un sustrato que la enzima pueda transformar en un producto coloreado, fluorescente o que produzca una señal electroquímica.
6. Medir la absorbancia, la fluorescencia o la señal electroquímica (por ejemplo, eléctrica) de los pocillos de la placa para determinar si el antígeno está presente en la muestra y en qué cantidad.

Antes del análisis hay que purificar las dos preparaciones de anticuerpos y marcar cada una de ellas.

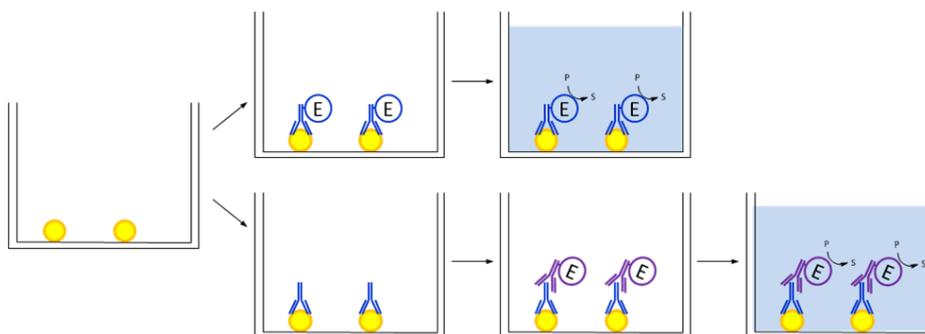
#### **Indirecto:**

1. Preparar una superficie a la que se ha unido el antígeno de la muestra.
2. Bloquear para evitar las uniones inespecíficas.

*Certificado conforme  
Tbilisi, 25 de junio de 2010  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

3. Añadir los anticuerpos primarios que se unen específicamente al antígeno.
4. Lavar la placa para eliminar el exceso de los anticuerpos primarios (que no se hayan unido con el antígeno).
5. Añadir los anticuerpos secundarios ligados a enzimas que son específicos de los anticuerpos primarios.
6. Lavar la placa para eliminar el exceso de los conjugados enzima-anticuerpo (que no se hayan unido).
7. Añadir un sustrato que la enzima pueda transformar en un producto coloreado, fluorescente o que produzca una señal electroquímica.
8. Medir la absorbancia, la fluorescencia o la señal electroquímica (por ejemplo, eléctrica) de los pocillos de la placa para determinar si el antígeno está presente en la muestra y en qué cantidad.

Antes del análisis hay que purificar las dos preparaciones de anticuerpos y marcar cada una de ellas.



**Figura 1:** ELISA directo e indirecto

En la mayoría de los casos, la mejor opción es utilizar una microplaca de poliestireno de alta capacidad de unión, pero les recomendamos que consulten la guía del fabricante para decidir qué tipo de placa es el más adecuado para la unión del antígeno dado.

La ventaja principal de la técnica de ELISA directo e indirecto es la alta sensibilidad, lograda mediante un sistema sencillo con pocas posibilidades de uniones inespecíficas. Sin embargo, sólo puede emplearse con muestras que contengan bajas cantidades de proteína no-antigénica.

*Certificado conforme  
Tbilisi, 25 de junio de 2010  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

## **Protocolo general para el método de ELISA competitivo**

El término “competitivo” describe ensayos en los que la medición implica la cuantificación de una sustancia según su habilidad de interferir con un sistema establecido. La detección puede hacerse directamente, método de un paso, o indirectamente, método de dos pasos.

### **Directo:**

1. Preparar una superficie a la que se ha unido una cantidad conocida de antígenos.
2. Bloquear la superficie para evitar uniones inespecíficas.
3. Poner la muestra o estándar (antígeno) y los anticuerpos específicos ligados a enzimas en la microplaca. Los antígenos inmovilizados en la superficie y los antígenos en solución “compiten” por los anticuerpos. Por consiguiente, cuanto mayor sea la cantidad de antígenos en la muestra, menor será la cantidad de anticuerpos que se unirán a los antígenos inmovilizados.
4. Lavar la placa para eliminar el exceso de los anticuerpos (que no se hayan unido) y los complejos antígeno-anticuerpo que no se hayan unido.
5. Añadir un sustrato que la enzima pueda transformar en un producto coloreado, fluorescente o que produzca una señal electroquímica.
6. Medir la absorbancia, la fluorescencia o la señal electroquímica (por ejemplo, eléctrica) de los pocillos de la placa para determinar si el antígeno está presente en la muestra y en qué cantidad.

Antes del análisis hay que purificar las dos preparaciones de anticuerpos y marcar cada una de ellas.

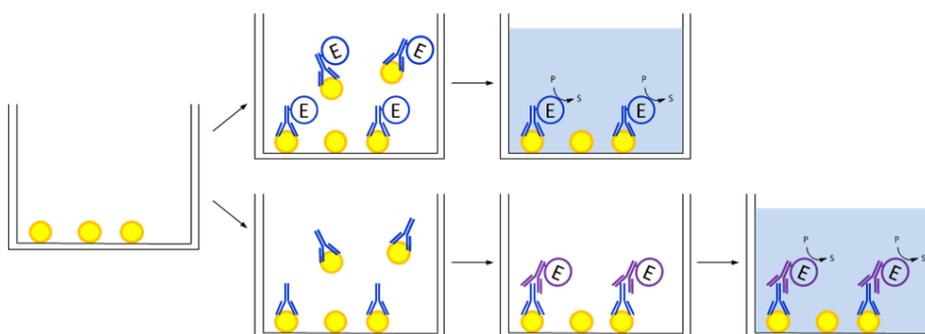
### **Indirecto:**

1. Preparar una superficie a la que se ha unido una cantidad conocida de antígenos.
2. Bloquear para evitar uniones inespecíficas.
3. Poner la muestra o estándar (antígeno) y el anticuerpo primario específico en una placa cubierta (los antígenos inmovilizados en la superficie y los antígenos en solución “compiten” por los anticuerpos. Por consiguiente, a mayor cantidad de antígeno en la muestra, menor cantidad de anticuerpos se unirá a los antígenos inmovilizados).
4. Lavar la placa para eliminar el exceso de los anticuerpos (que no se hayan unido) y los complejos antígeno-anticuerpo que no se hayan unido.
5. Añadir un anticuerpo secundario específico conjugado con una enzima que son específicos de los anticuerpos primarios.

*Certificado conforme  
Tbilisi, 25 de junio de 2010  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

6. Lavar la placa para eliminar el exceso de los conjugados enzima-anticuerpo (que no se hayan unido).
7. Añadir un sustrato que la enzima pueda transformar en un producto coloreado, fluorescente o que produzca una señal electroquímica.
8. Medir la absorbancia, la fluorescencia o la señal electroquímica (por ejemplo, eléctrica) de los pocillos de la placa para determinar si el antígeno está presente en la muestra y en qué cantidad.

Antes del análisis hay que purificar las dos preparaciones de anticuerpos y marcar cada una de ellas.



**Figura 2:** ELISA competitivo directo e indirecto

En el ELISA competitivo, cuanto mayor es la concentración inicial de antígeno, más débil es la señal.

En la mayoría de los casos, la mejor opción es utilizar una microplaca de poliestireno de alta capacidad de unión, pero les recomendamos que consulten la guía del fabricante para decidir qué tipo de placa es el más adecuado para la unión del antígeno dado.

### **Protocolo general para el método ELISA tipo sándwich**

El ELISA sándwich mide la cantidad de antígeno entre dos capas de anticuerpos (es decir, anticuerpos de captura y detección). El antígeno a medir debe contener al menos dos sitios antigénicos diferentes (epitopos) para la unión al anticuerpo, ya que al menos dos anticuerpos actúan en el sándwich. Tanto los anticuerpos monoclonales como los policlonales pueden usarse como anticuerpos de captura y detección en los sistemas de ELISA sándwich.

*Certificado conforme  
Tbilisi, 25 de junio de 2010  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

### **Directo:**

1. Preparar una superficie a la que esté unida los anticuerpos (captura).
2. Bloquear para evitar uniones inespecíficas.
3. Poner la muestra o estándar que contiene el antígeno en la placa.
4. Lavar la placa para eliminar las moléculas no reconocido por el anticuerpo de captura.
5. Añadir anticuerpos específicos ligados a enzimas (anticuerpos de detección). Estos anticuerpos reaccionarán con el antígeno.
6. Lavar la placa para eliminar el exceso de los anticuerpos ligados a enzimas (que no se hayan unido).
7. Añadir un sustrato que la enzima pueda transformar en un producto coloreado, fluorescente o que produzca una señal electroquímica.
8. Medir la absorbancia, la fluorescencia o la señal electroquímica (por ejemplo, eléctrica) de los pocillos de la placa para determinar si el antígeno está presente en la muestra y en qué cantidad.

Antes del análisis hay que purificar las dos preparaciones de anticuerpos y marcar cada una de ellas.

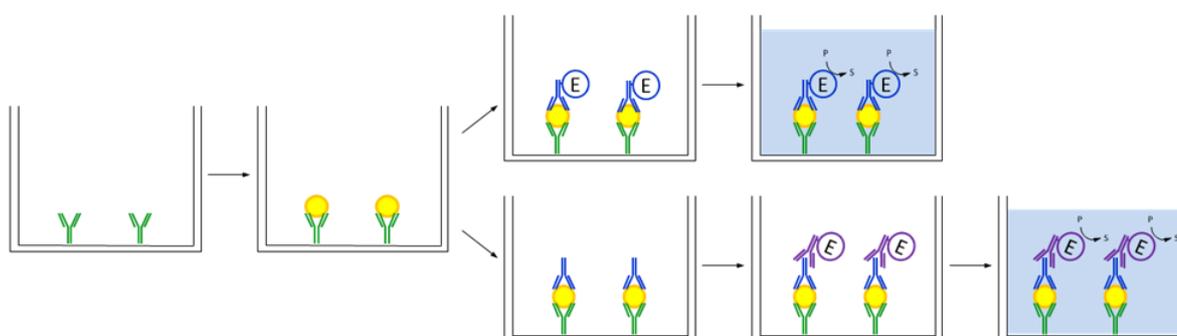
### **Indirecto:**

1. Preparar una superficie a la que esté unida los anticuerpos (captura).
2. Bloquear para evitar uniones inespecíficas.
3. Poner la muestra o estándar que contiene el antígeno en la placa.
4. Lavar la placa para eliminar las moléculas no reconocido por el anticuerpo de captura.
5. Añadir los anticuerpos de detección (anticuerpos primeros), que se unirán específicamente al antígeno.
6. Lavar la placa para eliminar el exceso de los anticuerpos (que no se haya unido).

*Certificado conforme  
Tbilisi, 25 de junio de 2010  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

7. Añadir los anticuerpos específicos ligados a enzimas (anticuerpos secundarios). Estos anticuerpos se unirán específicamente al anticuerpo de detección.
8. Lavar la placa para eliminar el exceso de los anticuerpos ligados a enzimas (que no se hayan unido).
9. Añadir un sustrato que la enzima pueda transformar en un producto coloreado, fluorescente o que produzca una señal electroquímica.
10. Medir la absorbancia, la fluorescencia o la señal electroquímica (por ejemplo, eléctrica) de los pocillos de la placa para determinar si el antígeno está presente en la muestra y en qué cantidad.

Antes del análisis hay que purificar las dos preparaciones de anticuerpos y marcar cada una de ellas.



**Figura 3:** ELISA sándwich directo e indirecto

En el ELISA tipo sándwich, para la captura y la detección de anticuerpos es necesario que éstos hayan sido generados en diferentes especies (por ejemplo, ratón y conejo) para que los anticuerpos secundarios específicos ligados a enzimas utilizados en la detección no se unan también a los anticuerpos de captura.

En la mayoría de los casos, la mejor opción es utilizar una microplaca de poliestireno de alta capacidad de unión, pero les recomendamos que consulten la guía del fabricante para decidir qué tipo de placa es el más adecuado para la unión del antígeno dado.

Para el ELISA tipo sándwich la medida es proporcional a la cantidad de antígeno en las muestras.

La ventaja del ELISA tipo sándwich es que incluso las muestras crudas no tienen que ser purificadas antes del análisis y el ensayo puede ser muy sensible.

*Certificado conforme  
Tbilisi, 25 de junio de 2010  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

**Tabla 1. Criterios de eficacia para los métodos de análisis de los residuos, potencialmente alergénicos, de las proteínas usadas en la clarificación de los vinos**

Parámetros	Valores y comentarios
Aplicabilidad	Válido para determinar cuantitativamente (a efectos oficiales) las proteínas usadas en la clarificación por encolado de vinos.
Límite de detección	(en mg/l) Caseína: al menos 0,5 Clara de huevo: al menos 0,5 Cola de pescado: al menos 0,5 Lisozima: al menos 0,5
Límite de cuantificación	(en mg/L) Caseína: <u>al menos</u> 1 mg/L Cola de pescado: al menos 1 mg/L Lisozima: al menos 1 mg/L Clara de huevo: al menos 1 mg/L
Precisión	HORRAT inferiores o iguales a 2 en el estudio de validación en colaboración
Recuperación	80% - 105% (según lo señalado en el estudio en colaboración)
Especificidad	Sin interferencias de la matriz o del espectro
Veracidad	$ \bar{x} - m  < 1,96 * \sqrt{S_{R(lab)}^2 - S_{r(lab)}^2 * (1 - 1/n)}$ <p>donde <math>m</math> es el valor certificado del material vínico de referencia y <math>\bar{x}</math> es la media de las <math>n</math> medidas de compuesto para este vino realizadas en el mismo laboratorio.</p> <p><math>S_r(lab)</math> son desviaciones típicas; se calculan a partir de los resultados obtenidos en el mismo laboratorio en condiciones de repetibilidad.</p> <p><math>S_R(lab)</math> son desviaciones típicas; se calculan a partir de los resultados obtenidos en diferentes laboratorios en condiciones de reproducibilidad.</p>

*Certificado conforme  
Tbilisi, 25 de junio de 2010  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*