

Detección de alérgenos de huevo en fideos secos por método de elisa

Detection of egg allergens in dried pasta using elisa method

BINAGHI MARÍA JULIETA¹, LÓPEZ LAURA BEATRIZ²

¹Bioquímica . ²Doctora de la Universidad de Buenos Aires, área Bromatología

^{1 2} Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Catedra de Bromatología.

Correspondencia: laulop@ffyb.uba.ar - **Recibido:** 20/03/2012. Aceptado en su versión corregida:28/04/2012.

Resúmen

Debido a la inminente incorporación al Código Alimentario Argentino del artículo 235 séptimo que contempla la rotulación de alérgenos en alimentos, resulta necesario realizar el control de productos comerciales para detectar la posible presencia de proteínas alergénicas. En la elaboración de fideos secos y de productos a base de harina de trigo pan y/o sémola de trigo candeal es probable la presencia de alérgenos de huevo por contaminación cruzada. El objetivo del presente trabajo fue determinar por un método de ELISA la posible contaminación con proteínas de huevo en productos elaborados con harina de trigo pan y/o sémola de trigo candeal provistos por una industria para verificar una posible contaminación con proteínas de huevo y analizar muestras comerciales con leyendas precautorias. Se analizaron diecinueve productos a base de harina de trigo pan y/o sémola de trigo candeal provistos por una industria y nueve muestras de fideos secos comerciales. El alérgeno huevo se analizó con kit de huevo de la marca r-biopharm. Las muestras se analizaron por duplicado siguiendo el protocolo de trabajo del kit. Entre las muestras provistas por la industria había: productos elaborados en línea cercana a elaboración de pastas con huevo en los que se obtuvieron valores por debajo del límite de cuantificación del kit; productos elaborados con bajo porcentaje de productos molidos que pudieron elaborarse con huevo, en los que se obtuvieron cantidades muy bajas de alérgeno huevo (menores a 5 ppm) y productos elaborados con alto porcentaje de productos molidos que pudieron haberse elaborado con huevo en los que se obtuvieron concentraciones mayores de huevo (mayores a 5 ppm de huevo en polvo). En las muestras comerciales hubo cinco que presentaron concentraciones por debajo o igual al límite de cuantificación mientras que en las otras cuatro se obtuvieron concentraciones entre 5 y 12 ppm de huevo en polvo con el kit de r-biopharm. De acuerdo con los resultados obtenidos el método ELISA permitió la detección de alérgenos de huevo en varias de las muestras provistas por la industria y también en algunas muestras comerciales con leyendas precautorias. Para una correcta rotulación de estos productos resultaría necesario contar con valores umbrales establecidos por la Autoridad Sanitaria Nacional.

Palabras clave: Huevo, fideos secos, ELISA, alérgenos.

Abstrac

As the mandatory declaration of allergens will be soon included in the Argentine Food Code (article 235, section seven), it is necessary to implement control methodologies to detect the possible existence of allergens in commercial products. The presence of egg allergens in pasta and in products with common wheat flour and /or durum wheat semolina is possible as a result of cross contamination. The objective of this work was to evaluate, using ELISA method, the possible contamination with egg proteins in products made with common wheat flour and /or durum wheat semolina provided by a manufacturer to verify a possible contamination with egg proteins and to analyse commercial products with precautionary labels. Nineteen products made with common wheat flour and /or durum wheat semolina provided by a manufacturer and nine commercial products (dry pasta) were analysed. The egg allergen was analyzed using the r-biopharm kit - ELISA. The samples were analysed in duplicates following the kit protocol. Among the samples provided by manufacturers there were products produced in line with the production of pasta with egg, with values below the quantification limit of the kit; products produced with a low percentage of milled products that could be made with egg, in which very low quantities of egg allergens were found (lower than 5 ppm), and products produced with a high percentage of milled products that could be made with egg and in which higher concentrations were obtained (higher than 5 ppm; whole dried egg). Five of the commercial samples presented concentrations that were below or similar to the quantification limit while in the other four concentrations between 5 and 12 ppm of whole dried egg were obtained using the r-biopharm kit. Following the results obtained, the ELISA method allowed the detection of egg allergens in several samples provided by the industry as well as in some commercial samples with precautionary labels. For proper labelling of these products it would be necessary to count on threshold limit values (TLV) established by the National Health Authority.

Keywords: Eggs, dried pasta, ELISA, allergens.

Introducción

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

Si bien en nuestro país no existen estudios que permitan determinar la prevalencia de las alergias alimentarias se calcula que no difiere de los valores que se conocen a nivel internacional. Aproximadamente entre el 4 y el 6% de los niños y entre el 1 y el 3% de los adultos padece una verdadera alergia alimentaria. Existen 8 grupos de alimentos que son responsables del 90% de las alergias alimentarias. Estos alimentos son: leche, huevo, soja, trigo, maní, frutos secos, pescado y mariscos (2, 3, 4).

El 17 de septiembre de 2010 fue publicada en el Boletín Oficial la Resolución Conjunta 57/2010 y 548/2010 de la Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca que establecía la incorporación del artículo 235 séptimo al Código Alimentario Argentino (CAA) sobre la rotulación de alérgenos en alimentos. De acuerdo con esta Resolución pasarían a ser de declaración obligatoria los alérgenos y sustancias capaces de producir reacciones adversas en individuos susceptibles. Los mismos deberían ser declarados a continuación de la lista de ingredientes del rótulo siempre que ellos o derivados de ellos estén presentes en los productos alimenticios envasados, ya sean añadidos como ingredientes o como parte de otros ingredientes. Los alérgenos contemplados comprenderían: Cereales que contienen gluten: trigo, centeno, cebada, avena y sus variedades híbridas y productos de éstos; Crustáceos y productos derivados; Huevos y productos de los huevos; Pescado y productos de la pesca; Maní y productos derivados; Soja y productos derivados; Leche y productos lácteos (incluida lactosa), Frutas secas (almendras, avellanas, castañas, nueces, piñones, pistacho) y productos derivados; Dióxido de azufre y sulfitos y Tartrazina (5). De acuerdo con la Resolución Conjunta N° 106-2011 y N° 297-2011

desde el 6 de junio de 2011 la aplicación de la Resolución Conjunta N° 57 y 548/2010 se encuentra suspendida hasta tanto la Comisión Nacional de Alimentos elabore una propuesta de adecuación del artículo 235 séptimo del Código Alimentario Argentino (6)

Debido a la inminente incorporación al CAA del artículo 235 séptimo que contempla la rotulación de alérgenos en alimentos, resulta necesario realizar el control de productos comerciales para detectar la posible presencia de proteínas alérgicas. En la elaboración de fideos secos y de productos a base de harina de trigo pan y/o sémola de trigo candeal es probable la presencia de alérgenos de huevo por contaminación cruzada, ya sea porque comparten líneas de producción con fideos elaborados con huevo, por la presencia de líneas cercanas de producción de fideos con huevo o porque directamente contienen otros productos molidos que pudieron haberse elaborado con huevo (fideos con huevo que se vuelven a procesar por diferentes motivos). El objetivo del presente trabajo fue determinar por método de ELISA la posible contaminación con proteínas de huevo en productos elaborados con harina de trigo pan y/o sémola de trigo candeal provistos por una industria para verificar una posible contaminación con proteínas de huevo. Además se seleccionaron y analizaron 9 muestras comerciales de fideos secos con leyendas precautorias relacionadas con la posible presencia de alérgeno huevo a los fines de determinar la presencia o no de dicho alérgeno.

Materiales y métodos

Muestras

Se analizaron 19 productos a base de harina de trigo pan y/o sémola de trigo candeal provistos por una industria. Estas muestras correspondían a 6 lotes de fideos de harina de trigo pan (Lotes 1 a 6), 4 lotes de fideos elaborados con sémola de trigo candeal (lotes 7 a 10), 1 lote de Producto 1 elaborado con productos molidos que contienen harina y sémola (Lote 11), 2 lotes de Producto 2 elaborado con productos molidos que contienen harina y sémola (Lotes 12 y 13), 2 lotes de Producto

3 elaborado con productos molidos que contienen harina y sémola (Lotes 14 y 15) y 4 lotes de Producto 4 elaborado productos molidos que contienen harina y sémola (Lotes 16 a 19). La composición de cada producto se detalla en la Tabla 1. De acuerdo con lo declarado por el fabricante en los lotes 11 a 19 parte de su receta corresponde a productos molidos que pudieron haberse elaborado con huevo. Los lotes restantes (1 a 10) podrían estar contaminados con trazas de huevo provenientes de polvillo ambiental, ya que las líneas de producción de estos productos no están aisladas de las líneas de producción de pastas con huevo.

Se seleccionaron y analizaron además 9 muestras comerciales correspondientes a fideos secos (muestras 1c a 9c) que presentan en sus respectivos rótulos leyendas precautorias sobre la posible presencia de huevo en su composición. Las muestras 1c, 5c y 8c correspondían a una misma fábrica de pastas secas (M1), las muestras 2c, 4c, 6c y 9c, correspondían a una segunda fábrica de pastas secas (M2) y las muestras 3c y 7c correspondían a una tercera fábrica de pastas secas (M3). La denominación de venta, la lista de ingredientes y las leyendas precautorias de declaración de alérgeno huevo se presentan en la Tabla 2. La fábrica M1 utiliza la leyenda precautoria: Este producto se elabora en un equipo que procesa pasta al huevo, la fábrica M2 emplea la leyenda: Este producto se elabora en un equipo que procesa huevo y la fábrica M3 presenta la leyenda: Puede contener vestigios de huevo.

Determinaciones analíticas

La determinación de la presencia de proteínas alergénicas de huevo se realizó con un kit ELISA sándwich comercial correspondiente a kit ELISA-Huevo de R-biopharm (Art N° R 6402). Todas las muestras se analizaron por duplicado siguiendo el protocolo de trabajo del kit (7). Los resultados finales se expresan en partes por millón (ppm) de huevo entero en polvo (mg de huevo entero en polvo/kg de alimento). El límite de detección del kit es 0,27 ppm de huevo en polvo, el límite de cuantificación es 0,5 ppm de huevo en polvo y el rango de cuantificación es 0,5–13,5 ppm de huevo en polvo.

Valores umbrales

En Argentina la Resolución Conjunta 57/2010 y 548/2010 no contempla valores umbrales para los ocho alérgenos considerados (5). A nivel internacional no existe consenso en cuanto a la mínima concentración por debajo de la cual un alimento puede ser considerado libre de alérgeno. Sólo Japón establece en su legislación un límite de 10 ppm para alérgenos (10 mg de proteínas/g de alimento) considerando que si el alérgeno se encuentra en una concentración >10 ppm se debe declarar como ingrediente y que si es <10 ppm no se declara (8). Esto lo establece para los alérgenos de mayor importancia en ese país que son huevo, leche, trigo, maní y trigo sarraceno.

En Australia y Nueva Zelanda en el año 2007 el sistema VITAL (Voluntary Incidental Trace Allergen Labelling) fijó tres niveles de acción para la declaración de la presencia de alérgenos en los rótulos de los alimentos considerando mg de sustancia alergénica/kg de alimento (ppm). En el nivel más bajo (nivel 1) considera que no es necesario declarar la presencia del alérgeno, en el nivel intermedio (nivel 2) se debe rotular puede estar presente y en el nivel más alto (nivel 3) al alérgeno se lo debe rotular como ingrediente. En el caso particular de alérgeno huevo los valores establecidos por VITAL son 2 ppm para el nivel 1, entre 2 y 20 ppm para el nivel 2 y mayor a 20 ppm para el nivel 3 (9, 10). Este sistema es de aplicación voluntaria por parte de la industria y en este momento se encuentra en revisión (11).

Resultados

Los resultados obtenidos del análisis de las 19 muestras provistas por la industria se presentan en la Tabla 1.

Los resultados obtenidos del análisis de las 9 muestras comerciales de fideos secos con leyendas precautorias se presentan en la Tabla 2.

Tanto en la Tabla 1 como en la Tabla 2 se presenta la posible declaración de alérgeno huevo considerando la legislación de Japón y el sistema VITAL teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el análisis de cada muestra.

Tabla 1: Productos provistos por la industria: tipo de muestras, ingredientes, lotes, contenido de huevo en polvo en ppm determinado por método de ELISA y posible declaración de alérgeno huevo de acuerdo con legislación japonesa y con VITAL.

Muestras	Ingredientes	Lotes	Contenido de huevo en polvo ppm (Valor promedio)	Declaración según legislación de Japón Por debajo de 10 ppm de proteína de huevo no se declara	Declaración según VITAL No se declara: < 2 ppm de huevo Puede estar presente: 2 – 20 ppm de huevo Se debe declarar: → 20 ppm de huevo
Fideos de harina de trigo pan	Harina de trigo, sulfato ferroso, cúrcuma.	1	< 0,5 a	No se declara	No se declara
		2	1,25 b	No se declara	No se declara
		3	< 0,5 a	No se declara	No se declara
		4	< 0,5 a	No se declara	No se declara
		5	< 0,5 a	No se declara	No se declara
		6	2,64 b	No se declara	Puede estar presente
Fideos elaborados con sémola de trigo candeal	Sémola de trigo candeal, espinaca	7	< 0,5 a	No se declara	No se declara
		8	< 0,5 a	No se declara	No se declara
		9	< 0,5 a	No se declara	No se declara
		10	1,05 b	No se declara	No se declara
Producto 1 con harina y sémola	Harina enriquecida, sémola, espinaca deshidratada, carbonato de calcio, niacina, hierro, óxido de zinc, pantotenato de calcio, vitaminas B6, B2, B1 y B12, ácido fólico y cúrcuma	11	→ 13,5 c	Posible declaración*	Posible declaración**
Producto 2 con harina y sémola	Harina enriquecida, sémola, zapallo deshidratado, azúcar, zanahoria deshidratada, carbonato de calcio, espinaca deshidratada, niacina, hierro, óxido de zinc, pantotenato de calcio, vitaminas B6, B2, B1 y B12, ácido fólico, cúrcuma, rocú y clorofila.	12	4,43 c	No se declara	Puede estar presente
		13	6,18 c	No se declara	Puede estar presente
Producto 3 con harina y sémola	Harina enriquecida, sémola, zapallo deshidratado, carbonato de calcio, niacina, hierro, óxido de zinc, pantotenato de calcio, vitaminas B6, B2, B1 y B12, ácido fólico y cúrcuma	14	6,92 c	No se declara	Puede estar presente
		15	6,92 c	No se declara	Puede estar presente
Producto 4 con harina y sémola	Harina enriquecida, sémola, carbonato de calcio, inciña, hierro, óxido de zinc, pantotenato de calcio, vitaminas B6, B2, B1 y B12, ácido fólico y cúrcuma.	16	5,89 c	No se declara	Puede estar presente
		17	7,61 c	No se declara	Puede estar presente
		18	11,8 c	No se declara	Puede estar presente
		19	10,72 c	No se declara	Puede estar presente

a: Producto elaborado en línea cercana a elaboración de pastas con huevo.

b: Producto elaborado con bajo porcentaje de productos molidos que pudieron haberse elaborado con huevo.

c: Producto elaborado con alto porcentaje de productos molidos que pudieron haberse elaborado con huevo.

* si tuviera mas de 10 ppm de proteína de huevo se debería declarar la presencia de huevo como ingrediente.

** si tuviera mas de 20 ppm de huevo en polvo se debería declarar la presencia de huevo como ingrediente.

Discusión

De acuerdo con los resultados obtenidos (tabla 1) los productos provistos por una industria elaborados en línea cercana a elaboración de pastas con huevo (a) presentan concentraciones por debajo del límite de detección del kit (<0,5 ppm de huevo en polvo). Los productos provistos por una industria elaborados con bajo porcentaje de productos molidos que pudieron haberse elaborado con huevo (b) presentan muy bajas concentración de huevo en polvo (entre 1,05 y 2,64 ppm

de huevo en polvo). Los productos provistos por una industria elaborados con alto porcentaje de productos molidos que pudieron haberse elaborado con huevo (c) presentan mayores concentraciones de huevo en polvo (4,43 y mayor a 13,5 ppm de huevo en polvo).

Entre las muestras comerciales analizadas (Tabla N° 2) cinco de ellas presentaron concentraciones por debajo o igual al límite de cuantificación del kit mientras que en las otras cuatro se obtuvieron concentraciones entre 5,4 y 12,1 ppm de huevo en polvo.

Tabla 2: Fideos secos comerciales: denominación de venta, ingredientes declarados, declaración de leyendas precautorias, contenido de huevo en polvo en ppm determinado por método de ELISA y posible declaración de alérgeno huevo de acuerdo con legislación japonesa y con VITAL.

Muestras – Denominación de venta	Ingredientes	Declaración de leyendas precautorias	Contenido e huevo en polvo ppm (Valor promedio)	Declaración según legislación de Japón Por debajo de 10 ppm de proteína de huevo no se declara	Declaración según VITAL No se declara: < 2 ppm de huevo Puede estar presente: 2 – 20 ppm de huevo Se debe declarar: → 20 ppm de huevo
1c- Fideos de sémola de trigo candeal, spaghetti M1	Sémola de trigo candeal	Este producto se elabora en un equipo que procesa pasta al huevo. Contiene gluten.	< 0,5	No se declara	No se declara
5c- Fideos secos fortificados con hierro, vitamina b1 y ácido fólico. Spaghetti. M1	Harina de trigo, sulfato ferroso, hierro, niacina, vitamina B1, Vitamina B2, ácido fólico, colorante cúrcuma.	Este producto se elabora en un equipo que procesa pasta al huevo. Contiene gluten.	< 0,5	No se declara	No se declara
8c- Fideos semolados fortificados con hierro, moños. M1	Sémola, harina enriquecida Ley 25630 (harina, hierro 30 mg/kg; ácido fólico 2,2 mg/kg; vitamina B1 6,3 mg/kg; vitamina B2 1,3 mg/kg niacina 13 mg/kg), Hierro.	Este producto se elabora en un equipo que procesa pasta al huevo. Contiene gluten.	< 0,5	No se declara	No se declara
2c- Fideos de sémola de trigo candeal y sémola de trigo pan, Foratini. M2	Sémola de trigo candeal, sémola de trigo pan.	Contiene gluten. Contiene derivados de trigo. Este producto se elabora en un equipo que procesa huevo.	12,1	No se declara	Puede estar presente
9 c- Fideos Cellentani M2	Harina de trigo enriquecida Ley 25630 (harina, hierro 30 mg/kg; ácido fólico 2,2 mg/kg; vitamina B1 6,3 mg/kg; vitamina B2 1,3 mg/kg niacina 13 mg/kg), Hierro.	Contiene gluten. Contiene derivados de trigo. Este producto se elabora en un equipo que procesa huevo.	0,5	No se declara	No se declara
4c- Fideos Bavettas M2	Harina de trigo enriquecida [*] [*]Ley 25630 (harina, hierro 30 mg/kg; ácido fólico 2,2 mg/kg; vitamina B1 6,3 mg/kg; vitamina B2 1,3 mg/kg niacina 13 mg/kg)	Contiene gluten. Contiene derivados de trigo. Este producto se elabora en un equipo que procesa huevo.	5,4	No se declara	Puede estar presente
6c- Fideos de sémola de trigo candeal y sémola de trigo pan, spaghetti. M2	Sémola de trigo candeal, sémola de trigo pan.	Contiene gluten. Contiene derivados de trigo. Este producto se elabora en un equipo que procesa huevo	6,5	No se declara	Puede estar presente
7c – Fideos secos coditos M3	Semolín de trigo pan, semolín de trigo candeal, agua, colorante natural cúrcuma.	Contiene gluten. Puede contener vestigios de huevo.	8,5	No se declara	Puede estar presente
3c- Fideos secos, spaghetti.	Semolín de trigo pan, semolín de trigo candeal, agua, colorante natural cúrcuma	Contiene gluten. Puede contener vestigios de huevo.	< 0,5	No se declara	No se declara

Con respecto a los resultados obtenidos en el presente trabajo según la legislación o el sistema internacional que consideremos algunas de las muestras pueden ser consideradas libres de alérgenos en un caso y en otro no. Por ejemplo según la legislación japonesa casi todas las muestras serían libres de alérgeno huevo ya que tendrían menos de 10 ppm de proteínas de huevo. Sólo el Producto 1 con harina y sémola, lote 11, podría sobrepasar este valor. Este producto contiene más de 13,5 ppm de huevo en polvo. De acuerdo con las especificaciones del kit el contenido de proteínas de huevo en polvo es 49% de manera que el Producto 1 con harina y sémola, lote 11, tendría un contenido superior a 6,6 ppm de proteína de huevo.

Mientras que para el Sistema VITAL catorce de las muestras analizadas deberían tener la leyenda "Puede estar presente", ya que contienen entre 2 y 20 ppm de huevo. Solo en la muestra Producto 1 con harina y sémola lote 11, se debería rotular la presencia de alérgeno huevo si el contenido de huevo en polvo superara las 20 ppm.

En la muestra Producto 1 con harina y sémola, lote 11, que supera 13,5 ppm de huevo en polvo se debería realizar un nuevo análisis realizando una dilución del extracto de manera de poder cuantificar el contenido real de huevo en polvo, si este superara 10 ppm de proteína de huevo (de acuerdo con la legislación japonesa) o 20 ppm de

huevo en polvo (de acuerdo con VITAL) entonces se debería declarar la presencia de huevo en el rótulo correspondiente.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo consideramos que es necesaria una declaración responsable de los ingredientes alergénicos utilizados en la formulación de alimentos. El uso de productos molidos que pudieron haberse elaborado con huevo sólo se debería destinar a la elaboración de productos en los que se declare la presencia del alérgeno huevo.

Por otra parte consideramos que es necesario que a nivel industrial se implemente un plan eficaz de control de alérgenos a los fines de evitar contaminaciones cruzadas.

Para una correcta rotulación de estos productos resultaría necesario que las autoridades nacionales establezcan valores umbrales para cada uno de los alérgenos de declaración obligatoria de manera que la industria y los organismos de control puedan recurrir a ellos a los fines de determinar si en el rótulo del alimento debe declararse o no un determinado alérgeno.

Agradecimiento

Este trabajo fue parcialmente financiado por UBACyT 20020090100184

Referencias bibliográficas

- 1- Besler M. Determination of allergens in foods. Trends in analytical chemistry. 2001; 20 (11): 662-672.
- 2- Poms RE, Klein CL, Anklam E. Methods for allergen analysis in food: a review. Food Additives and Contaminants. 2004; 21 (1): 1-31.
- 3- Tsuji H, Kimoto M, Natori Y. Allergens in major crops. Nutrition Research. 2001; 21: 925-934.
- 4- Lehrer SB, Ayuso R, Reese G. Current Understanding of Food Allergens. Annals of the New York Academy of Science. 2002; 964: 69-85.
- 5- Boletín Oficial, Resolución Conjunta 57/2010 y 548/2010 de la Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. [Acceso febrero 2012]. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/Legislacion/Alimentos/Resolucion_Conjunta_57-2010-548-2010.pdf
- 6- Boletín Oficial, Resolución Conjunta Nº 106-2011 y Nº 297-2011 de la Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. [Acceso febrero 2012]. Disponible en: http://www.llave.connmed.com.ar/portalanoticias_vernoticia.php?codigonoticia=22153
- 7- Ridascreen® FAST EI/egg protein. Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of egg white proteins. [Acceso febrero 2012]. Disponible en: http://www.r-biopharm.com/product_site.php?product_id=369&product_class_one=QWxsZXJnZW5z&product_class_two=RWdn&product_class_three=&product_class_four=&product_range=Food%20and%20Feed%20Analysis&PHPSESSID=e3c7a7c36404842c89ee30064e1b882a.
- 8- Consumer Affairs Agency, Government of Japan. [Acceso febrero 2012]. Disponible en: <http://www.caa.go.jp/foods/pdf/syokuhin26.pdf>.
- 9- Allergen Bureau informing the food industry. VITAL Allergen Risk Assessment. 23/9/2008 Fiona Fleming. [Acceso febrero de 2012]. Disponible en: <http://www.docstoc.com/docs/28914325/VITAL-Allergen-Risk-Assessment>.
- 10- Allergen Bureau, informing the food industry. VITAL. [Acceso febrero 2012]. Disponible en: <http://www.allergenbureau.net/vital/vital-downloads>
- 11- Vital review & VITAL 2.0 [Acceso febrero 2012]. Disponible en: <http://www.allergenbureau.net/vital/vital-review-a-vital-20>