



A kép illusztráció / Picture is for illustration only  
Fotó/Photo: Shutterstock

# Előrelépések a gluténkimutatási és mennyiségi meghatározási módszerek fejlesztésében

**Kulcsszavak:** cöliákia, glutén, ELISA, PCR,  $\omega$ -gliadin ellenanyag, R5 ellenanyag, monoklonális G12 ellenanyag

## 1. Összefoglalás

A glutén élelmiszerekből történő kimutatása a cöliakiás betegek védelme érdekében elengedhetetlen, rendkívül fontos vizsgálat. Szükséges, hogy nagy figyelmet szenteljenek a biztonságos gluténmentes diétára, a gluténmentes élelmiszerek ellenőrzésére, és mindehhez egy megbízható mérési módszer álljon rendelkezésre.

A glutén és a glutén tartalmú gabonalisztek élelmiszeripari felhasználása széleskörű. Több olyan élelmiszer-készítményben is megjelenhet, ahol a laikus fogyasztó nem is várná. Különböző élelmiszeripari termékekben (pl. húsokban, édességekben) íz- és állományjavító anyag lehet, másrészt a gluténmentes élelmiszer véletlenszerűen kontaminálódhat cöliákia-aktív cereáliával betakarítás, szállítás, tárolás vagy feldolgozás során.

A glutén vizsgálatára és kimutatására többfajta módszer létezik (többek között mikroszkópos, elektroforetikus, kromatográfiai, immunológiai illetve DNS-alapú, stb.). A glutén kvantitatív kimutatásának azonban elsősorban fehérje-alapúnak, tehát immunológiai módszernek kell lennie (R5-ELISA) a CODEX STAN 118-1979 szerint [1]. Ha létezik az immunológiai módszerrel azonos érzékenységgű és specificitású módszer a nyers és feldolgozott, hőkezelt élelmiszerek kvantitatív mérésére, akkor az is megengedett vizsgálati lehetőség lehet.

A témában érdekelt szakemberek folyamatosan arra törekednek, hogy a jelenlegieknél még érzékenyebb, még specifikusabb kimutatási módszereket fejlesszenek ki. Kezdetben a gliadint felismerő ellenanyagok kidolgozása volt a fókuszban, majd a gliadin T-sejt-stimuláló (cöliakiát kiváltó) epitópjait felismerő ellenanyagok fejlesztése került előtérbe. Alternatív és egyben kiegészítő módszerként a legelfogadottabb a DNS-alapú PCR technikával történő kimutatás, mely az expresszálandó fehérjehiányt kockázatát tudja előrejelezni.

A cikk a glutén kimutatási és mennyiségi meghatározási módszereinek fejlesztésében történt előrelépéseket, a módszerekben rejlő nehézségeket, valamint az ezen analitikai vizsgálatokkal kapcsolatos jogszabályozásokat mutatja be.

## 2. Bevezetés

Az ember táplálkozásában a gabonafélék ősidőktől fogva fontos szerepet töltenek be. A cereália fogyasztása összes energiabevételünk közel felét fedezi, emellett tápanyagtartalmuk is rendkívül fontos: szénhidrát- vitamin-, ásványi anyag-, élelmi rost- és

fehérjeszükségletünk legfontosabb forrása. Közülük a búza, rozs, árpa, zab, rizs és a kukorica a leggyakrabban fogyasztott gabonaféle.

A gabonafélék között azonban a búza, rozs, árpa, zab glutén fehérjei az arra érzékeny egyéneknél adverz, káros reakciókat válthatnak ki: egyrészt gabona-

<sup>1</sup> Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet, Biológia Osztály,

allergiát, másrészt pedig cöliakiát. A kétféle rendelkezés hátterében alapvetően más immunológiai folyamatok húzódnak. A cöliákia (más néven lisztérzékenység vagy gluténérzékenység) egy genetikai alapon kialakuló autoimmun betegség (mechanizmusa szerint T-sejt által immunmediált folyamat), míg a gabonaallergia IgE ellenanyag által immunmediált folyamat. Élelemiszer-allergia a népesség 0,2-0,5%-át érinti, míg a cöliákia gyakorisága 0,1%-1,6%. Egyes szerzők szerint a gyakoriság ennél az értéknél is több lehet [2].

A cöliákia esetében kizárólag a búza, rozs, árpa, zab, és azok keresztezett változatainak (pl. tritikálé) glutén fehérjéi (prolaminok és glutelinek) játszanak szerepet a betegség kiváltásában, addig a gabonaallergia esetében a gluténen kívül főleg az albumin, globulin frakciók fehérjéi a felelősek ( $\alpha$ -amiláz inhibitorok (CM3, 0.53), nem-specifikus lipid transzfer fehérjék) [3]. A zab a cöliakiások leg többjénél nem váltja ki az autoimmun reakciót, így a gluténnel egyébként nem szennyezett zab azok számára fogyasztható, akik megbizonyosodtak affelől, hogy szervezetük jól tolerálja a zabot [4], [5], [6].

Cöliákia esetében a megfelelő kezelés (vagyis a gluténmentes diéta betartása) nélkül a vékonybél bolyhainak pusztulása következik be, ezen kívül pedig több, a gyomor-bélrendszeren kívüli tünet és társbetegség (szövődmény) is jelentkezhet. A lisztérzékenység nem gyógyítható, a beteg egész életét végigkíséri, azonban a kórfolyamatot kiváltó tényező kerülésével, diétázással tökéletesen kezelhető (a kóros folyamat leáll, és a bélrendszer regenerálódik, valamint a tünetek megszűnnek).

Az allergiás tünetek széles skálán mozognak: kialakulhat búzafüggő, mozgás által indukált anafilaxia (Wheat Dependent, Exercise Induced Anaphylaxis, WDEIA), orális allergia szindróma (Oral Allergy Syndrome, OAS), bőrpír, viszketés. Az érzékenyítés történhet légzőrendszeren („pékek asztmája”), vagy tápcsatornán keresztül. Az allergia ideiglenes állapot is lehet, idővel megszűnhet. Étkezéskor a tüneteket kiváltó gabonafélét (pl. búzaallergia esetén a búzát) kell kerülni.

Meg kell említenünk azt is, hogy létezik egy új gluténfüggő körkép: a nem-cöliakiás glutén szenzitivitás (NCGS, Non Coeliac Gluten Sensitivity), ahol a glutén-tartalmú gabonák fogyasztásakor hasonló klinikai tünetek lépnek fel, mint a cöliákia esetében. A tüneteket okozó ártalmas élelmiszer komponenseket még nem azonosították, de feltételezik, hogy a betegség kialakulásában más gliadin szekvenciák vesznek részt, mint cöliakiában, ezen kívül nem-glutén fehérjék (pl.  $\alpha$ -amiláz/tripszin inhibitorok, búzacsíra agglutinin), valamint a fermentálható oligo-, di-, monoszacharidok és poliok is szerepet játszanak a kóros folyamatokban (pl. puffadás, hasmenés) [7], [8], [9].

### 3. A glutén definíciója

A glutén búzából, rozsból, árpából, zabból és ezek keresztezett változataiból áll, valamint a származékaiból származó fehérjefrakcióból, amellyel szemben bizonyos személyek intoleranciát mutatnak, és vízben és 0,5 M NaCl oldatban egyaránt oldhatatlan. A glutén alkoholban oldható prolaminokból (monomer) és savban/lúgban oldható (alkoholban redukáló kondíciók alatt is oldható) glutelinekből (polimer) áll, megközelítőleg 1:1 arányban. A gluténehérjék a magban a teljes fehérjetartalom 80%-át képezik. A maradék fehérje: albuminok 12%, globulinok 8%. A prolamin fehérjéket búza esetén gliadinoknak, rozs esetén szekalinoknak, árpa esetén hordeineknek, zab esetén pedig avenineknek nevezzük [1]. A glutén fogalma többszáz fehérjét ölel fel.

A gliadinok heterogén fehérjekeverékek, főleg monomer fehérjék, kb. 40 komponenst tartalmaznak. Elektromobilitásuk alapján savas pH mellett  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  és  $\omega$ -gliadinokra, vagy N-terminális aminosav-szekvenciájuk alapján  $\alpha/\beta$  (44-60%, 28-35 kDa),  $\gamma$  (31-46%, 31-35 kDa), és  $\omega$  (10-20%,  $\omega$ 1,2-gliadinok: 39-44 kDa,  $\omega$ 5-gliadinok: 49-55 kDa) típusúakra csoportosíthatók. Az adott típusok szekvenciáiban csak kis különbségek vannak. Az  $\alpha/\beta$ - és  $\gamma$ -típusú gliadinok kénben gazdagok, míg az  $\omega$ -típusúak kénben szegények, és nem tartalmaznak ciszteint, sem diszulfid-kötést. Az  $\alpha$ -gliadinok 6 konzervatív cisztein maradékot, és 3 láncon belüli kereszt-kötést tartalmaznak. A  $\gamma$ -gliadinok 8 konzervatív cisztein maradékot és 4 láncon belüli kötést tartalmaznak.

A gluteninek nagyméretű, 600-800 aminosavból álló, glicint, glutamint és prolint nagy mennyiségben tartalmazó aggregált fehérjék. Szerkezetüket intermolekuláris diszulfid-hidakkal stabilizálják. Emellett létrejöhetnek intramolekuláris kötések is. A gluteninek molekulatömegük alapján LMW és HMW-GS alegységekre oszthatók (Low/High Molecular Weight - Glutenin Subunit). Az LMW-GS fehérjék elektromobilitásuk alapján (30-70 kDa [17]) B, C (többnyire az  $\alpha$ ,  $\gamma$ -gliadinokhoz hasonlítanak) és D (többnyire az  $\omega$ -gliadinokhoz hasonlítanak) típusokra csoportosíthatók. Éppen a gliadinokhoz való hasonlóságuk miatt az LMW-gluteninokat számos, a gliadin ellen termelt ellenanyag felismeri [12]. A HMW-GS fehérjék (67-88 kDa [17], 90-120 kDa [16]) a búza tartalék fehérjék 10%-át teszik ki; és x- és y- típusait különböztetik meg [13].

### 4. A cöliákia és a cöliakiában résztvevő gluténpeptidek ismerete a gluténkimutatás szempontjából

A cöliákia patogenezisében több tényező játszik szerepet:

- Környezeti hatások (vírusok),
- Baktériumok (Proteobacteria/Firmicutes),
- Anyatejes táplálás,

- Genetikai hajlam (autoimmunitás gének, immunrendszer működését szabályozó gének: HLA DQ2 – a betegek 90%-ánál – és HLA DQ8 – a betegek 10%-ánál – haplotípus hordozók), és az immunológiai faktorok (veleszületett és adaptív immunválasz) zavara [7], [10].

A gluténfehérjék aránylag nehezen emészthetők, lebontásuk nem teljes: a gasztrointesztinális enzimek által hosszú glutén-peptidekre – minimálisan 9 aminosav hosszúságúra – degradálódnak (gyomorban endopeptidázok: pepszin, tripszin, kimotripszin, elasztáz, karbopeptidázok, vékonybélben: kefeszegély exopeptidázok).

A gluténfehérjéknek hasonló az aminosav-szekvenciájuk, és gyakran tartalmaznak ismétlődő részeket, amelyekben prolin- (kb. 15%) és glutamin- (kb. 35%) maradékok vannak. Ez a magas prolin-glutamin-tartalom teszi rezisztenssé a proteolízissel szemben, így a hosszú glutén fragmentek túlélnek a vékonybél felső szakaszában, és T-sejt választ kiváltó immunogén peptidekké válnak [11].

Az immunogénné vált gluténpeptideket a HLA DQ2 és HLA DQ8 molekulákkal rendelkező antigén prezentáló sejtek mutatják be a T-limfocitáknak. Ez T-sejt választ stimulál, és a vékonybélben szöveti mukózális károsodást eredményező kóros immunreakciókat indít el (toxikus gluténpeptid) [10], [11], [12].

A betegség kialakulásában több mint 50 féle glutén-peptid vesz részt (immunogének - olyan anyagok, amelyek immunválaszt képesek kiváltani és toxikusak, bélhámkárosodást okoznak). Az  $\alpha$ - és  $\omega$ -gliadinok a felnőtteknél -, míg az LMW-gluteninek és a  $\gamma$ -gliadinok a gyerekeknél immundominánsak (utóbbi kettő felnőtteknél ritkábban). Publikációjukban Ciccocioppo és munkatársai 9 db peptidszakaszt mutattak be toxikusnak, valamint az  $\alpha$ ,  $\gamma$ -gliadin és glutenin egyes peptidszakaszai között talált 36 db immunogén epitópot, amelyek közül 10 db immundomináns (azaz erősen immunogén) [12]. Amióta a T-sejt felismerésében az aminosav-tartalom, a prolin maradék-elrendeződés és a tTG specifikus deaminá-

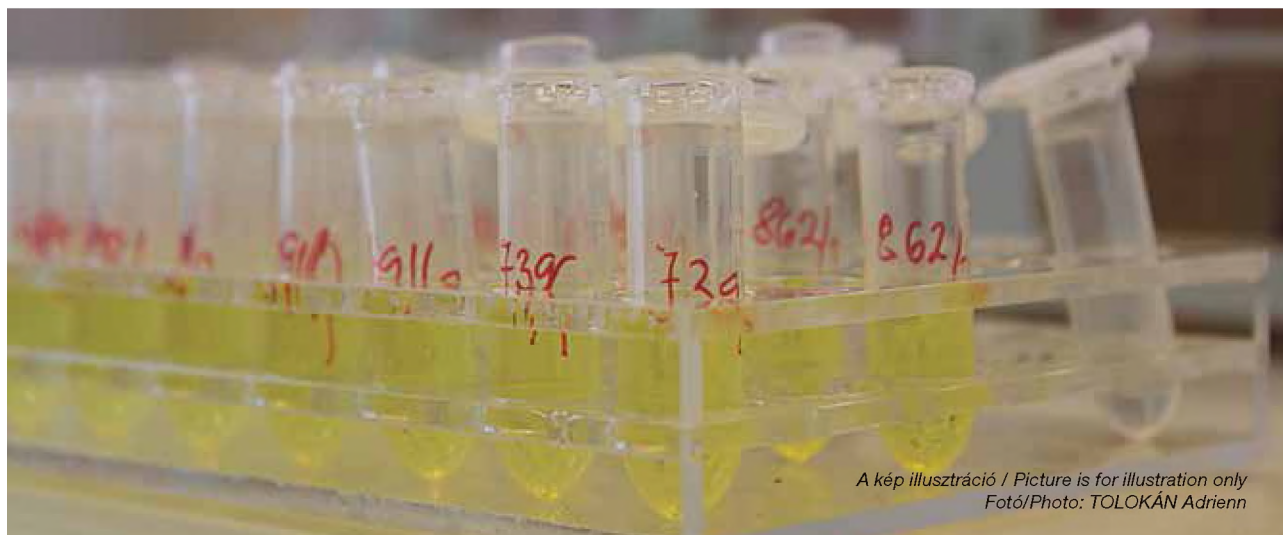
lása a fontos. Az ártalmas szekvenciák feltérképezésére bioinformatikai komputeres módszereket lehet alkalmazni [13].

A cikkünk megírásáig listába vett (bejelentett) összes cöliákia aktív gluténfragmentet [15] az Allergen Online adatbázis [14] tartalmazza, de a szakemberek továbbra is kutatják az új toxikus peptideket/szekvenciákat [16].

### 5. Taxonómia – gabonák közötti rokonság – gabonafehérjék közötti keresztreakciók

A rozs (*Secale cereale* fajok), árpa (*Hordeum vulgare* fajok), tritikálé taxonómiailag a búzához (*Triticum aestivum* fajok) hasonló pázsitfűfélék (Poaceae család/Pooideae alcsalád/Triticeae törzs tagjai mind), így egymáshoz hasonló szerkezetű, a cöliákiasokra nézve toxikus peptideket (glutén fehérjéket) expresszálnak. Keresztreakció ugyanis nagy valószínűséggel a közeli rokonságban lévő gabonafajok fehérjéi között jöhet létre. Bár a rokonsági fokokat tekintve az egymástól távolabbi gabonák, mint pl. a zab (Poaceae család/Pooideae alcsalád/Avenae törzs/Avena sativa fajok), kukorica (Poaceae család/Panicoideae alcsalád/Andropogoneae törzs/Zea mays fajok), és rizs (Poaceae család/Bambusoideae alcsalád/Oryzae törzs/ Oryza sativa fajok) fehérjéi között is kialakulhatnak keresztreakciók [18].

Immunológia keresztreaktivitás a cöliakiát okozó gabonák és ezen említett gabonák prolaminfehérjéi (pl. zab avenin, sorghum kafirin, rizs oryzenin) között esetleg kimutatható, de a T-sejt által felismert toxicitást nem igazolták [19]. A kukorica fogyasztásának biztonságossága is megkérdőjeleződik, ugyanis tanulmányok kimutatták, hogy a zeinek (a kukorica-prolaminok) egyes cöliákias betegeknél a nyálkahártyával való érintkezés közben képesek gyulladást kiváltani. A zeinek és a cöliakiát okozó peptidek között valóban nagyfokú azonosság áll fenn, de gasztrointesztinális proteolízis utáni integritásuk ismeretlen. A cöliákias betegek kukorica prolaminre adott patológiás válaszreakciója ritkán ugyan, de előfordulhat [18], [20], [21].



A kép illusztráció / Picture is for illustration only  
Fotó/Photo: TOLOKÁN Adrienn

## 6. Glutén, mint jelöléskötelezett élelmiszer-alkotó

A táplálékallergének jelölése és nyomonkövethetősége az EU-s szabályozásnak megfelelően az élelmiszerek címkéjén kötelező. A jelöléskötelezett allergén-összetevők listáját a 2000/13/EK rendelet [22] módosítására kiadott 2003/89/EK rendelet [23] és a 2006/142/EK rendelet Annex IIIa [24] tartalmazza, amelyek között a gluténtartalmú gabonák és az azokból készült termékek is szerepelnek. A jelöléskötelezettség alól kivételt képeznek:

- a) a búzából készült glükózsirup, beleértve a dextrózt;
- b) a búzából készült maltodextrin;
- c) az árpából készült glükózsirup;
- d) az alkoholpárlatok – így például mezőgazdasági eredetű etil-alkohol – készítéséhez használt gabonafélék is.

A kötelezően előírt megelőző intézkedések jelenleg az ártalmas élelmiszer abszolút és állandó elkerülésén alapulnak, jelölésükről és a fogyasztók felé az allergénkockázat tájékoztatásával kapcsolatban a következő rendeletek szólnak:

- 19/2004 (II. 26.) FVM-ESzCsM-GKM együttes rendelet [25] módosítására: 167/2004 (XI. 29.) FVM-EüM-GKM [26], 38/2005 (IV. 27) FVM-EüM-GKM [27], 86/2007 (VIII.17) FVM-EüM-SZMM [28].
- 1169/2011/EU rendelet (X.25.), 2. számú melléklet (2014. dec. 13-tól kötelező) [29].
- 62/2011 (VI. 30.) VM rendelet [30].
- 36/2014 (XII.17.) FM rendelet (2015. július 1-től kötelező) [31].

Az Európai Unióban a 828/2014/EU rendelet [32] előírásai szerint kell eljárni. A lisztérzékenységben szenvedőknek szánt élelmiszerek címkézéséről szóló, kötelezően alkalmazandó jogszabály, a 609/2013/EU rendelet [33] szerint 2016. július 20-tól megszűnt a különleges táplálkozási célú élelmiszerek kategóriája, így ez a gluténérzékenyeknek szánt termékek esetében változást eredményezett. Ennek értelmében 2016. július 20-tól a gyártóknak és forgalmazóknak nem kell bejelenteniük a hatóság – Magyarországon az OGYÉI – felé, ha gluténérzékenyeknek szánt élelmiszert („gluténmentes”, illetve a „nagyon alacsony glutén tartalmú” élelmiszerek) kívánják forgalmazni. Ezzel párhuzamosan egy új szabály is életbe lép a gluténmentességre és a csökkentett gluténtartalomra vonatkozó állításokról a 828/2014/EU rendelet alapján [32]. Az új szabály néhány ponttal kiegészítve fenntartja a korábbi szabályozás, a 41/2009/EK rendelet [34] lényeges elemeit.

A 2016. július 20-án életbe lépett 828/2014/EU rendelet az alábbi összetételi és címkézési szabályokat írja elő:

1. *„Gluténmentes”* élelmiszer: ha legfeljebb 20 mg/kg glutént tartalmaz az értékesített élelmiszer. Ez a minősítés alkalmazható a természetes módon gluténmentes termékek esetében is.
2. A *„nagyon alacsony gluténtartalmú”* élelmiszer: legfeljebb 100 mg/kg glutént tartalmaz, és a termék egy vagy több, búzából, rozsból, árpából, zabból vagy ezek keresztezett változataiból származó összetevőből áll, vagy olyan összetevőt tartalmaz, amelyet különleges eljárással úgy állítottak elő, hogy a gluténtartalmat csökkentsék.
3. Az élelmiszerral kapcsolatos tájékoztatást kísérheti a *„gluténérzékenyek is fogyaszthatják”* vagy *„cöliákiában szenvedők is fogyaszthatják”* kijelentések.



A kép illusztráció / Picture is for illustration only  
Fotó/Photo: Shutterstock

4. Amennyiben az élelmiszert kifejezetten úgy gyártották, hogy az élelmiszer glutént tartalmazó összetevőjének gluténtartalmát csökkentették, vagy a glutént tartalmazó összetevőt más, természetes módon gluténmentes összetevővel helyettesítették, akkor a címkén a „*kifejezetten gluténérzékenyek számára készült*” vagy „*kifejezetten cöliákiában szenvedők számára készült*” kijelentések is feltüntethetők.
5. A gluténérzékeny egyének többségének az étrendje tartalmazhat zabot, anélkül, hogy a zab fehérjei az egészségükre kedvezőtlen hatást fejtenének ki (megjegyezzük, hogy a gluténérzékeny populáció kisebbik hányada zabot sem fogyaszthat). Komoly veszélyt jelent a zab gluténnal való szennyeződése, ezért a jogalkotó a „*gluténmentes*”, vagy „*nagyon alacsony glutén tartalmú*” termékekben levő zab gluténtartalmát is szabályozta. A gluténmentesként vagy nagyon alacsony gluténtartalmúként megjelölt élelmiszerekben csak olyan zab használható, amelynek termesztése, előkészítése és/vagy feldolgozása során kifejezetten kerülték a búzával, rozssal, árpával vagy ezek keresztezett változataival való szennyeződést, és amelynek gluténtartalma legfeljebb 20 mg/kg.

A „*gluténmentes*” vagy a „*nagyon alacsony glutén tartalmú*” felirattal ellátott termékeket egyéni tolerancia-szinttől függően a gluténintoleranciában szenvedők fogyaszthatják – függetlenül az azt esetleg kiegészítő „*gluténérzékenyek is fogyaszthatják*” vagy „*cöliákiában szenvedők is fogyaszthatják*” kijelentésektől. Fontos, hogy a „*kifejezetten gluténérzékenyek számára készült*” vagy „*kifejezetten cöliákiában szenvedők számára készült*” jelölések a maximálisan 20 mg/kg és 100 mg/kg glutén tartalmú termékek jelölésén is feltüntethetők.

Az előrecsomagolt élelmiszerek címkéjén kötelező a glutént tartalmazó gabonafélék, azaz a búza, rozs, árpa, zab, tönkölybúza, kamut, illetve hibridizált fajták nevét az összetevők felsorolásában olyan szedéssel – például betűtípussal, stílussal vagy háttérszínnel – kiemelni, amely azt egyértelműen elkülöníti a többi összetevőtől.

A nem előrecsomagolt élelmiszerek esetében is kötelező valamilyen formában a gluténtartalomra vonatkozó tájékoztatást a fogyasztók rendelkezésére bocsájtani, ugyanakkor a diagnosztizált gluténérzékenyeknek az esetleges utólagos szennyeződés előfordulása miatt csak kellő óvatosság mellett ajánlható a nem előrecsomagolt élelmiszerek fogyasztása.

## 7. Gluténmeghatározás

### 7.1. Fehérje alapon történő gluténmeghatározás fejlődése

A Codex Standard 118-1979 [1] szerint az élelmiszerekben és élelmiszeralkotókban lévő glutén

kvantitatív meghatározásának immunológiai módszeren kell alapulnia, (jelenleg a legérzékenyebb módszer), vagy más olyan vizsgálati eljárást kell alkalmazni, amely az előbb említett módszerhez képest legalább azonos érzékenységgel és specifitással jellemezhető. Az immunológiai elven működő módszerek azon alapulnak, hogy különböző prolamin reakciók vagy prolaminban található specifikus szekvenciák felismerésére termeltetett ellenanyagokat használnak fel.

Az immunológiai alapokon működő módszerek előnye, hogy nyers (natív) és feldolgozott (pl. hőkezelt) élelmiszerekből a gliadin kvantitatív megbízható mérésére alkalmasak az időigényes és többnyire drága műszerezettségű igényelő egyéb kimutatásra korlátozódó módszerekkel szemben (mikroszkópos, elektroforetikus, immunblot, HPLC, MS, MALDI-TOF MS, LC-MS/MS, immunszenzor, kvantitatív real-time PCR).

A CODEX STAN 118-1979 [1] szerint a használt ellenanyagoknak detektálnia kell azokat a gabonafehérje frakciókat, amelyek a gluténre intoleráns emberek számára toxikusak, valamint nem keresztreakálhatnak más gabonafehérjékkel és egyéb élelmiszer-, valamint élelmiszeralkotó komponenseivel. A megbízható gluténkimutatás követelményei a megfelelő érzékenység, a specifitás, a reprodukálhatóság, a robusztusság, és a validált státusz. A vizsgálati módszerek több független laboratórium bevonásával kell ellenőrizni és – ha lehetséges – standarddal szemben kell kalibrálni. A detektálási határnak 10 mg glutén/kg-nak, vagy annál kevesebbnek kell lenni. A glutén jelenlét és egyben mennyiségének meghatározásában prioritást kapott a monoklonális R5 ellenanyag bázisú ELISA-módszer.

#### 7.1.1. A glutén meghatározás nehézségei

Az immunológiai alapú kimutatást széles körben használják, azonban számos nehézséggel kell szembenézni a módszerrel kapcsolatban [2]:

- A törvénykezés a meghatározással kapcsolatban nem egyértelmű: a gluténtartalom mérése általában gliadin-meghatározáson alapszik, pedig a glutén meghatározásában a gluteninből származó toxikus komponensek is beleérthetők.
- A glutén jónéhány komponensből áll, rendkívüli komplexitásuk jellemzi (pl. a búzafajták génjei több mint 50-150 gliadint kódolnak). Ez a változatosság és az aminosav szekvenciákról való ismereteink hiányossága okoz nehézséget az epitópok feltérképezésében [35].
- Nehéz olyan ellenanyagot találni, illetve fejleszteni, amely egyforma mértékben ismeri fel a búza, rozs, árpa glutén fehérjeit (ez a fehérje-szekvenciákban való különbségeknek, így a különböző immunreaktív epitópoknak köszönhető) [36].

- A gliadinok, szekalinok, hordeinek kimutatására több immunmérési eljárás alapuló kit is kapható kereskedelmi forgalomban, amelyek eltérő ellenanyaggal működnek (monoklonális vagy poliklonális ellenanyag alapúak), így eltérő specificitással, eltérő érzékenységgel működnek. Ezáltal detektálhatók lehetnek az említett prolaminfehérjék, vagy egy adott frakciójuk, vagy egy gliadin, szekalin, hordein alegység, vagy annak egy szekvencia szakasza (epitópja) [37], [38].
- A cöliakiában jelentős prolaminek kioldási módját sem határozták meg pontosan. A gyakorlatban különböző extrakciós módszereket ajánlanak, amelyek eltérő hatékonysággal oldják ki a prolamint. A különböző ajánlásokban az alkalmazni kívánt etanolkoncentráció is különböző (40%-60%). Az sem ismert pontosan, hogy az alkohol koncentráció milyen hatással van az analitikai jelet szolgáltató immunkémiai és enzimes reakciók kimenetelére. A prolaminek kioldását nehezítik a molekulatömeg, heterogén felületi tulajdonságok, a láncon belüli/kívüli kovalens kötések, valamint a hőre, kemikáliára való érzékenység.
- A gliadin kalibrációs egyenesének reprodukálhatósága is nehezen biztosítható. Elnézve a standard antigének állnak rendelkezésre: az ausztrál Timgalen búzafajta eredetű gliadin; RM8418 (egy kanadai búza eredetű gliadin), Sigma gliadin (12 különböző német búzafajtából származó gliadin frakció), PWG gliadin (28 leggyakoribb természetű európai (főleg francia, német, angliai) búzafajtából származó gliadin frakció, más néven „európai búza gliadin” vagy „IRMM-480”). Ez a négyféle standard nagyon hasonló mintákat mutat a 2D elektroforézisben. A PWG gliadin volt a legmagasabb gliadin tartalmú; az RM8418 több glutenint, albumint és globulint tartalmazott, de az analitikai vizsgálatok során kapott különbségek a standardok viselkedésére vonatkozóan nem voltak megmagyarázhatók. Az bizonyos, hogy ha csak egy búzafajta szerepel a szabványban, akkor nem veszi figyelembe a különbségeket a fajták között, amelyek az eredményben pontatlanságot okozhatnak. Jelenleg a PWG gliadin a hivatalosan javasolt referenciaanyag.
  - o Ezekon kívül léteznek szintetikus peptid standardok is. Az R-Biopharm kompetitív R5 ELISA-nál pl. a (QQFPF) szintetikus peptidet használják a kalibrációhoz. Azonban hátránya az, hogy a peptid-standardok alkalmazásával kapott eredmények peptid-koncentrációkra utalnak a kívánt fehérje koncentrációk helyett. Mivel a gluténmentes termékek határértékei a teljes gluténtartalomra vonatkoznak, és nem a peptid-tartalomra, nehéz öss-

zehasonlítani a peptid-koncentrációit a mintában található teljes glutén-tartalommal. Gessendorfer és munkatársai egy másik peptid szakaszt fejlesztettek ki standardnak, búza, árpa és rozs prolamint keverékének hidrolízisével [39]. Ez jobban közelítette a teljes gluténtartalom meghatározást. Azonban a fehérjék hidrolízisét nehéz úgy optimalizálni, hogy a tételek között ne legyen különbség [13]. Valójában a kalibrációhoz használt referenciaanyag (RM), amely elfogadottan standardizált, hiányzik [40].

- A fehérjék módosítása/módosulása (részleges vagy teljes hidrolízis, deamidáció, transzamináció (mikrobiális transzglutamináz által katalizált), degradáció, fragmentálódás, denaturáció, aggregáció (oldhatatlan mátrix kialakulása) csökkenti az ellenanyaghoz való kötődési affinitást, így nehezíti a glutén kimutatást. Ez történhet technológiai kezeléssel (a glutén funkcionalitásának, különböző termékekben való felhasználhatóságának javítására: pl. hő, enzimatiszta degradáció, extrudálás), vagy természetes úton a gabonamagvakban lévő enzimek által.
- Az élelmiszer-mátrix (szilárd, folyadék) hatása a glutén szerkezet változására sem ismert teljesen, ellenanyaggal való kölcsönhatása miatt keresztreaktivitás léphet fel [40]. A mérőkitésekben élelmiszer-mátrix-kontrol sincs forgalomban.

Jól látható tehát, hogy számos nehézség mutat rá arra, hogy továbbra is szükséges foglalkozni a kimutathatóság problémájával, a glutén kimutatási módszer fejlesztésével.

Ezzel a területtel Magyarországon több kutatócsoport is aktívan foglalkozik:

- a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet, Biológia osztálya (korábbi nevén: Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet, Budapest) immunanalitikai és DNS-alapú módszerek alkalmazhatóságát vizsgálta glutén kimutatás szempontjából nyers és feldolgozott élelmiszerek modellvizsgálatában (Dr. Gelencsér Éva vezetésével) [41], [42], [43], [44], [45], [46], [47],
- A Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék, Gabonatudományi és Élelmiszer-minőség Kutatócsoportja, Budapest (Dr. Tömösközi Sándor vezetésével) az ELISA módszertan alkalmazhatóságának, validálásának elősegítése végett reális élelmiszer-mátrixot modellező referencia anyagok (glutén fehérjéit tartalmazó) fejlesztésével foglalkozott. Ezek segítség-

gével a kereskedelmi forgalomban kapható ELISA módszerek teljesítményjellemzőinek meghatározása, összehasonlító elemzése és az eredmények mögött álló jelenségek értelmezése megvalósulhatott. A Tanszék kutatócsoportja részt vett az Európai Unió 6. Keretprogramja által támogatott MoniQA (Monitoring and Quality Assurance in the Food Supply Chain) Kiválóság-hálózat Allergén Munkacsoportjának tagjaként a témához kapcsolódóan [48], [49], [50], [51] [52], [53].

- MTA ATK Mezőgazdasági Intézete, Alkalmazott Genomikai Osztály, Martonvásár (Dr. Juhász Angéla vezetésével) a cöliakiát okozó gabonafehérjék analíziseit bioinformatikai vizsgálatokkal is kiegészítette [54], [55].

Az itt felsorolt irodalmi hivatkozásokban a mérési eredmények megtalálhatók.

### 7.1.2. A gliadint felismerő ellenanyagok fejlesztése

Az élelmiszerek gluténtartalmának analízisében az elmúlt években nagy előrelépés történt. Kezdetben poliklonális ellenanyagot használtak a gliadin altípusok kimutatására, azonban ez nem volt megfelelően specifikus, pl. keresztreakciót adott nem-toxikus kukoricával.

Később egy érzékenyebb, egérben termeltetett monoklonális  $\omega$ -gliadin ellenanyag (401.21 mAb) alapú módszer (Skerrit-féle módszer [37]) látott napvilágot, amely specifikusan a hőstabil  $\omega$ -gliadin frakció felismerésére irányult, kisebb mértékben azonban felismeri az  $\alpha$ ,  $\gamma$ -gliadinokat, illetve az LMW és HMW gluteninokat is. Az  $\omega$ -gliadinok ciszteinben hiányosak, lizin tartalmuk alacsony, ami hőstabilizálja őket. Ezen ellenanyag kifejlesztése nagy átörést jelentett a glutén-analitikában, hiszen – ahol a frakció változatlan marad az élelmiszer feldolgozása során – elfogadható specifitással és érzékenységgel első ízben ilyen ellenanyaggal volt mérhető a glutén. A hivatalos Analitikai Kémikusok Egyesülete (Association of Official Analytical Chemists, AOAC) 991.19

jelzetű ajánlásában ezt az  $\omega$ -gliadin ellenanyag (401.21 mAb) használatát feltételező, szendvics rendszerű analitikai eljárást javasolja, amely nyers és hőkezelt élelmiszerek kimutatására alkalmas. Standardként a Timgalen búzafajtából (Ausztrália) származó gliadint használtak. A gliadinok kioldása 40% etanollal történt [13]. Az ellenanyag által felismert fő építő aminosav-szekvenciája: PQQPFPQE/PQQPPFEE (ahol: P=Prolin, Q=Glutamin, F=Fenilalanin, L=Leucin, E=Glutaminsav) [56].

A módszer hibája az volt, hogy redukáló ágensek nélkül a 40%-os etanolban a gliadinok kinyerése csak részleges volt, mert a gluteninek nem oldódtak ki. A vizsgálati metodika eredetileg így a mintában található összes gliadin valós mennyiségét tévesen jellemezte. A módszer gyengeségének számított az is, hogy mivel az  $\omega$ -frakció az összes prolamintartalomnak egy aránylag kis részét teszi ki (5-20%), és a különböző gabonafajtákban az  $\omega$ -prolamin frakció mennyisége eltérő (ami ez a gabona fejlődése közben is változhat), a vizsgálati eredmény a relatív  $\omega$ -gliadin tartalomtól függően változott, így nem volt kellően megbízható. A módszer további hátránya abból is adódott, hogy az ellenanyag az árpa prolaminjaihoz gyengén kötődött (nem volt megfelelő a szenzitivitás), ezáltal a hordeineknek csak kevesebb, mint 10%-a volt mérhető. Gyakran alábecsülte a prolamintartalmat, vagy egyszerűen fals negatív eredményt adott. A durum búzából származó gliadinokat alulmérte. A tritikáléban és rozsban pedig felülmérte a prolaminoikat, valamint számos keresztreakciót mutatott különböző gluténtartalmú gabonákkal. Mivel nem egyforma mértékben ismeri fel az árpa és a rozs prolaminjait, a mérések gyakran nem voltak reprodukálhatók. Az  $\omega$ -gliadin módszer ismételtetősége 16-22% volt, reprodukálhatósága pedig 24-33%. A módszer feldolgozott hústermékeknel szemikvantitatív, gabonák vizsgálata esetén pedig kvantitatívként eljárásként használható. Hidrolizált glutén mérésére nem alkalmas [57]. A  $\omega$ -gliadin ellenanyag (401.21 mAb) használatán alapú módszer még hozzáférhető ugyan, de gyakorlati alkalmazását a szendvics R5-ELISA váltotta fel [13].



A kép illusztráció / Picture is for illustration only  
Fotó/Photo: TOLÓKÁN Adrienn



Az  $\omega$ -gliadin ellenanyag használatán alapuló vizsgálati eljárás után további előrelépést jelentett a monoklonális R5-ellenanyag alapú, Mendez-féle módszer kidolgozása [38]. Az ellenanyag specifikusan felismeri az 5 aminosavból álló, hőre rezisztens (QQPFP) pep-tid szekvenciát, valamint a homológ szekvenciákat is azonosítja. Ilyen módon kisebb reaktivitással ugyan, de a (QQPFP)-vel erősen homológ (QQQFP), (LQPFP), (QLPFP), (QLPYP), (QLPTF), (QQSFP), (QQTFP), (PQPFP), (QQPYP), (PQPFP) szekvenciákat is érzékeli. A szekvenciák jelölésében Q=Glutamin, P=Prolin, F=Fenilalanin, L=Leucin, S=Szerin, T=Treonin, Y=Tirozin [58]. A (QQPFP) peptid a prolaminok (gliadinok, hordeinek, szekalinok) ismétlődő doménjeiben fordul elő. Legtöbbször az  $\omega$ -típusúakban található meg. Éppen ezért a prolaminok kimutatására ez az antitest használata különösen alkalmas [59].

Az  $\omega$ -szekalin (rozs prolamin) etanolos extraktuma ellen termeltetett R5 ellenanyaggal főleg az  $\alpha$ -,  $\gamma$ -típusú toxikus gliadin epitópokat (pepscan) tudjuk kellő érzékenységgel kimutatni. Az  $\omega$ -gliadinokat, a 75 kDa feletti fehérjéket gyengén detektálja, a glutenineket pedig limitáltan ismeri fel. A módszer előnye, hogy az R5 ellenanyag a búza gliadinok, az árpa hordeinek, és a rozs szekalinok összes frakcióját azonos mértékben és azonos pepsan epitóp-részekeken keresztül ismeri fel. Az R5 nem méri a cöliakiásokra nézve nem toxikus kukorica, rizs, zab glutén-tartalmát és természeténél fogva nem képez keresztreakciót gluténmentes gabonákkal.

Az  $\omega$ -gliadin szendvics ELISA-t, tehát a szendvics rendszerű R5-ELISA módszer alkalmazása váltotta

fel, mivel ez utóbbi már képes volt mérni az árpa prolaminokat (hordeineket), és alkalmazásakor a különböző gabonafajták különbözőségével már ez esetben nem kellett számolni. Az R5-ELISA a Codex Alimentarius Commission által nemzetközileg elfogadott I. típusú módszer lett, mely a nyers és hőkezelt gluténmentes élelmiszerek gluténtartalmának ellenőrzésére szolgál. A módszer ismételtetősége 20% (Ingenasa), illetve 18% (R-Biopharm), reprodukálhatósága pedig 32% (Ingenasa), illetve 30% (R-Biopharm) volt.

A szendvics R5 ELISA módszer esetében ún. koktél-oldatot használnak a 80%-os etanolos extrakció előtt a prolaminok redukciójának elősegítésére. Erre különösen az élelmiszerek gyártási technológiája miatt előálló fehérje szerkezetváltozás miatt van szükség. Szendvics R5-ELISA esetén a koktél-oldat 250 mM 2-merkaptó-etanol (redukáló ágens) tartalmaz, amely később PBS pufferben (Phosphate Buffered Saline) oldott 2 M guanidin hidrokloriddal (diszaggregáló ágens) egészült ki. A koktél-oldattal 70-98%-os volt a gluténviszanyerés, míg a 60%-os etanollal csak 30-50% [13], [60].

A legújabban kifejlesztett reagens-kombináció az UPEX-oldat (Universal Prolamin and glutelin EXtractant solution), amely az összes glutén-analízis módszerrel kompatibilis. Redukáló ágense a trisz (2-karboxietil) foszfin (Tris (2-carboxyethyl)-phosphine) (TCEP), ami specifikusan bontja a diszulfid hidakat, és kevésbé toxikus, mint más egyéb redukáló ágens; diszaggregátor ágense: N-lauroil-szarkozin (N-lauroylsarcosine) PBS-ben. Egy másik reagens-kombinációban is létezik az UPEX-oldat. Ez utóbbi redukáló ágensei: 2-merkaptó-



A kép illusztráció / Picture is for illustration only  
Fotó/Photo: Shutterstock

to-etanol, TCEP és diszaggregáló ágense: guanidin). SDS is használható diszaggregátor ágensként.

Egy másik koktél-oldat fejlesztés az UGES (Universal Gluten Extraction Solution), mely egy redukáló ágens, szolubizáló ágens (arginin) és egy alkoholos antiszeptikus ágens tartalmaz [2], [61].

Az élelmiszer-mátrixtól függ, hogy az extrakció hatékonnyabbá tételéhez egyéb kiegészítő lépés szükséges-e, vagy sem. PI a 10% zsírt tartalmazó élelmiszerek esetében n-hexánnal történő zsírtalanítás ajánlott. A magas polifenol-tartalmú élelmiszerek esetében szükséges lehet halzselatin és/vagy polivinilpirrolidon, vagy sovány tejpor hozzáadása, hogy megakadályozzuk a glutén fehérjék polifenollokkal lezajló interakcióját [62].

A különböző minőségű gliadin standardok használatát azzal küszöbölték ki, hogy a kitekhez a Prolamin-Analízis és Toxicitás Munkacsoport (Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity) 28 európai búzafajta gliadinkomponensét tartalmazó, ún. Európai Referencia Gliadin Standardot (IRMM-480, PWG-gliadin ahol az IRMM, The Methodology Institute of the European Commission for Reference Materials and Measurements) készített (lásd R5 ellenanyag alapú rendszerek). Ez a referencia standard az összehasonlító analízisekhez, valamint a kalibrációhoz, belső standardként használható [63]. Ezzel kapcsolatban felmerül az a kérdés, hogy az IRMM-480 vajon megfelelő módon reprezentálja-e a Földön termesztett valamennyi búzafajtát, így globálisan alkalmazható lesz-e a standardban, vagy csak a Codex szabványtervezet elfogadását követően az európai vonatkozó szabályozásban fog szerepet játszani.

A szendvics R5-ELISA módszer gyengeségei:

- Az R5 ellenanyag más élelmiszerfehérjét is felismer (nemcsak a káros prolamintokat: szója, csillagfűrt). Főleg az  $\omega$ - és  $\gamma$ -típusú prolamintokban a kimutathatósági követelmény: az epitópokban megtalálható FP dipeptid jelenléte. Ezen dipeptid felismerése fals eredményekhez is vezethet, mivel FP dipeptid sok más fehérjében/peptidben (pl. gluténmentes szójában) is jelen van [58]
- A szendvics R5-ELISA túlbecsüli, azaz fals pozitív eredményt ad a hordeinekre PWG-gliadin standard használata esetén [13], illetve az árpával szennyezett zabokban, annak ellenére, hogy hordein standardot használ [16].
- Hátránya továbbá, hogy nem alkalmas fermentált és hidrolizált élelmiszerekből történő glutén kimutatására.

Fermentált-hidrolizált élelmiszerben (sör, szója szószok, ecetek, kovászos kenyerek) a glutént sem az

$\omega$ -gliadin ellenanyag alapú, sem a szendvics R5-ELISA nem tudta mérni szendvics rendszerben. A hidrolizáció során a kis peptidekről hiányzik a két ellenanyagkötő epitóprész, amelynek jelenléte a szendvicsrendszerben történő méréshez elengedhetetlen.

A fragmentált (hidrolizált) glutén kimutatása érdekében a Codex Bizottság (Codex Alimentarius Commission) javaslatot tett az egyelőre még nem validált kompetitív R5 ELISA módszerre való áttérésre [16]. A kompetitív rendszerű ELISA-t azon fehérjefragmensek mérésére használják, ahol csak egy epitóp (immunpatogén rész) áll rendelkezésre [36].

Az extrakció ez esetben etanollal történik, a kompetitív R5 ELISA ugyanis a koktélos extrakcióval nem kompatibilis. Ennek magyarázata az, hogy a prolamintokat etanollal csak a natív fehérjéket tartalmazó élelmiszerekből lehetséges közel maradéktalanul kivonni. Hőkezelés után, amikor is a fehérjék denaturálódtak, az etanol már nem képes minden prolaminfrafrációt kivonni. Ideális esetben a hőkezelt élelmiszerek esetében a koktéloldatot kell a prolamint extrakcióhoz alkalmazni, így tehát a kompetitív R5-ELISA teszt esetében 60% - 80% etanosol extrakciót alkalmazva nem lehetséges kellő pontossággal meghatározni a hőkezelt és egyben hidrolizált élelmiszerek gluténtartalmát. A módszerrel csak a hidrolizált, de nem, vagy csak kismértékben hőkezelt glutén mennyiségét lehet megmérni.

Hidrolizált élelmiszer, pl. sör vizsgálata esetében kompetitív R5-ELISA-val 1,9-17-szer nagyobb glutén-értékeket kaptak, mint a szendvics R5-ELISA-technikával mérve. Ezzel szemben reggelihez fogyasztandó gabonapelyhek vizsgálatánál szendvics R5-ELISA-val nagyobb gluténtartalom-értékeket kaptak, mint kompetitív R5-ELISA-módszerrel mérve. A különbség az élelmiszerminták hőkezelésének hatásával magyarázható [13]. A kompetitív R5-ELISA teszttel több glutén mérhető búzában (26%-al), rozsban (49%-al), árpában (82%-al), mint a szendvics R5-ELISA-technikával [40].

A kompetitív R5 ELISA-hoz a korábbiakhoz képest új extrakciós megoldás az UPEX-oldat használata, amely a hidrolizált és hőkezelt élelmiszerek esetében egyaránt alkalmazható. Rossel és munkatársai standardként pepszinnel, tripszinnel, illetve kimotripsinnel emésztett PWG gliadint alkalmaztak [2].

### 7.1.3. A gliadin T-sejt stimuláló (cöliakiát kiváltó) epitópjait felismerő ellenanyagok fejlesztése

Az  $\omega$ -gliadin és az R5 monoklonális ellenanyag alapú vizsgálati technikák klinikailag nem validált módszerek, ezért csak az élelmiszerek toxicitásának indikátorként használhatók a cöliakiás egyének számára. Ugyanakkor a kutatók célja az, hogy a tervezett (előállított) ellenanyagok az immundomináns gliadin T-sejtet stimuláló (cöliakiát kiváltó) epitópjait ismerjék fel a gliadin fehérje-szekvenciák közül [64].

Az elmúlt években jó néhány különböző cöliakiás T-sejt stimuláló gliadin epitópot azonosítottak, amelyek a fehérje prolin-gazdag régiójában csoportosultak. Az azonosítottak közül különösen jelentősek az  $\alpha$ -gliadin azon epitópjai, amelyeket – a cöliakiás betegek többségénél – a vékonybél T-sejtjei felismernek.

A monoklonális PN3 ellenanyag [65], [66] az *in vivo* toxikus  $\alpha$ -gliadin 19 aminosav-szakasza, 19-mer, 31-49 pozícióban lévő epitóp, az (LGQQQPFPPQ-PYPQPQPF) szekvencia felismerésére termelt ellenanyag. A specifikusan a fő felismerő (QQQPF) epitóp-szekvenciára előállított szintetikus peptid-specifikus ellenanyag, az  $\alpha$ - és  $\gamma$ -gliadinokkal erősen, míg az  $\omega$ -gliadinokkal csak gyengén reagál. Ezenkívül reagál az LMW-gluteninokkal, a rozs szekalinokkal, az árpa hordeinekkal, de nem reagál a HMW-gluteninokkal, a zab aveninekkal, illetve a kukorica zeinokkal. Bermundo Redondo és munkatársai feltételezik azonban, hogy az ellenanyagnak reagálnia kell a zab aveninekkel, hisz azok tartalmazzák a QQQPF peptidszakaszokat [67]. Az Ellis és munkatársai által kifejlesztett PN3-ellenanyag alapú szendvics ELISA hátránya az, hogy az ellenanyag nem egyformán detektálja a toxikus prolaminokat (rozs, árpa, zab) [66], valamint a módszer szendvics rendszerű volta miatt a hidrolizált formákat sem ismeri fel.

A monoklonális  $\alpha$ -20 ellenanyag egy T-sejt-stimuláló  $\alpha$ -gliadin epitóp felismerésére fejlesztett antitest. A specifikus peptidszakasz, azaz a minimál felismerő epitóp szekvenciája a következő: (PFRPQQPYPQP), (ahol P=Prolin, F=Fenilalanin, R=Arginin, Q=Glutamin, Y=Tirozin). Gliadinok, szekalinok, hordeinek felismerésére alkalmas, de limitált az ismeretünk a reaktivitásukkal kapcsolatban, különösen a glutelinfrakció esetében.

Az EuroProxima cég termékében, a Gluten-Tec ELISA kompetitív rendszerben használja fel az  $\alpha$ -20 ellenanyagot. Az extrakcióra 60% etanolos kioldást, vagy ditiotreitolt (DTT) redukáló ágenszt és jódcetamid tartalmú 60% etanolos kioldást ajánl. A meghatározott, LOQ-nak (Limit Of Quantification) megfelelő 89  $\mu\text{g}/\text{kg}$  peptid-ekvivalens értékét egy 100-as konverziós faktorról és a duplikáció 2-es faktorával (a minta gliadin-mennyiségéből következtetnek a glutén mennyiségére) szorozva 17,8, ami kerekítve mintegy 18  $\text{mg}/\text{kg}$  gluténnek felel meg.

Scherf és munkatársainak kísérletei szerint a szintetikus peptid-szekvenciával (GPFRPQQPYPQPB) szemben felvett kalibráció reprodukálható volt, de a peptidből fehérjére-váltás konverziós faktorával számítva az eredményeik nem voltak egyöntetűen elfogadhatók [62].

Különösen érdekes a gasztrointesztinális emésztés után az  $\alpha$ -gliadin egy 33-mer szakasza (56-88). Ezt a fragmentet magas prolintartalmának köszönhetően (33 db aminosavból 13 db prolin) rendkívül

rezisztensnek találták a luminális proteázokkal és a vékonybél kefeszegély enzimeivel szemben [10], de e fragment ellenálló képessége nem ad teljesen kielégítő magyarázatot a cöliákia teljes patogenezisének megértéséhez. Ezek a peptidok intaktak maradnak, túljutnak a nyálkahártya határon, és cöliakiás tüneteket váltanak ki. A vizelettel és a széklettel választódnak ki. Megjegyezzük, hogy a kereskedelemben kaphatók a vizeletben és fekáliás eredetű mintákban található gluténtartalom meghatározására szolgáló kitek. Később számos, T-sejtet aktiváló peptidet térképeztek fel, de ennek ellenére az  $\alpha$ -gliadin 33-mer szakaszát használják leggyakrabban immunogén peptid modellként [13].

Az  $\alpha$ -gliadin 56-88 AS szekvenciája (33-mer: (LQLQP-FP-QPQLPY-P-QPQLPY-P-QPQLPY-PQPQPF), ahol L=Leucin, Q=Glutamin, P=Prolin, F=Fenilalanin, Y=Tirozin) 6 T-sejt-stimuláló immuntoxikus epitópot tartalmaz, ezért ez az egyik legfőbb, cöliakiát indukáló peptidszakasz. Ezen 33 mer-ből álló toxikus peptidszakasz felismerésére két ellenanyagot fejlesztettek ki [68], [69]. A monoklonális G12 ellenanyag ebben a szakaszban a specifikusan a búzában megtalálható (QPQLPY) hexapeptid-szekvenciára előállított ellenanyag. A (QPQLPY) peptidszakasz háromszor ismétlődik meg ebben a 33 mer-peptidszakaszban. Ez az ellenanyag a (QPQLPY) szekvencián kívül felismeri a hozzá hasonló szerkezetű (QPQ(L/Q)P(Y/F/Q), (QPQLPL), (QPELPY) peptideket is a búzában, valamint rozsban, árpában és néhány zabfajtában egyaránt. A rozsban például jellemző a (QPQQPY), az árpában pedig a (QPQLPF) szekvencia. Ezen túlmenően e szekvenciákat nemcsak az  $\alpha$ -, hanem az  $\omega$ -,  $\gamma$ -,  $\beta$ -prolaminokban, valamint a gluteninokban egyaránt képes detektálni. Előnye, hogy az avenineket detektálja, de a zabhoz való affinitása limitált és ez a reaktivitás arányos a különböző zabfajták potenciális immunotoxicitásával. Hidrolizált élelmiszerek esetében  $>0,5$   $\text{mg}/\text{kg}$  koncentrációjú gliadin mérésére alkalmas. Az ellenanyaggal természetesen nem detektálható az összes immunogén glutén-peptid (számuk meghaladja az 1000-et), de azok mintegy 80-95%-ával képes reakcióba lépni. Az R5 ELISA-rendszerrel az immunogén glutén-peptideknek mindössze csak a 25%-a mutatható ki [13].

Az eddigi glutén kimutatására készült tesztek a gliadin fehérjék illetve azok epitópjainak felismerésére fókuszáltak, és nem a gliadin-specifikusan T-sejt-stimuláló epitópjainak felismerésére. Tehát sem az  $\omega$ -gliadin ellenanyag, sem az R5-ellenanyag nem ismeri fel teljes mértékben az immundomináns gliadin T-sejt stimuláló epitópjait [64]. A glutén kimutatásban mérőföldkönek számít az új generációs monoklonális G12 antitest kifejlesztése, amely szelektíven a gliadin molekula patogén (immuntoxikus) szakaszát, azaz a cöliakiás betegek esetében az autoimmun válasz kiváltásáért felelős 33-mer peptidszekvenciát ismeri fel [68]. Míg a korábbi kimutatási rendszerek zab gluténtartalmának kimutatására nem voltak specifikusak, addig a G12-antitest a zabban is megtalálható lehet-

séges toxikus aminosav szekvenciára specifikus. Ez egy sokkal szelektívebb és  $6 \cdot 10^4$ -szer érzékenyebb vizsgálati módszer összehasonlítva az egyéb alkalmazható technikákkal. Egyelőre még kevés információ áll rendelkezésünkre a G12-ellenanyag alapú módszer gyakorlati használhatóságával, megbízhatóságával kapcsolatban, de mindenesetre ígéretesnek mondható. Török és munkatársai kutatásai során az R5- és G12-ellenanyag alapú módszerek párhuzamos alkalmazásával tesztelték a két ellenanyag alapú módszer érzékenységét, megbízhatóságát [51].

A monoklonális A1-ellenanyag szintén az  $\alpha$ -gliadin 56-88-aminosav szekvencia-szakaszában specifikusan a búza egyik heptamer (QLPYPQP) szekvencia felismerésére alkalmas ellenanyag, valamint felismer más homológ szekvenciát is ((Q(L/Q)P(F/Y)P(Q/L)P(Q)). Szintén a búza, rozs, árpa, és néhány zabfajta kimutatására alkalmas. Az A1 ellenanyag szenzitívebb a glutén kimutatásra, mint a G12-ellenanyag,

bár a G12-nek jobb az affinitása a 33-mer aminosav-szakaszhoz [13], [69].

A GlutenTox ELISA kitek kompetitív ELISA rendszerben monoklonális G12-, vagy A1-ellenanyagot használnak, szendvics rendszerben pedig anti-gliadin (A1)/anti-gliadin (G12), HRP-ellenanyagokat alkalmaznak.

A monoklonális CD5-ellenanyag az  $\alpha$ -gliadin 51-75 pozícióban lévő toxikus (T-sejt-stimuláló) szakaszával ekvivalens szintetikus peptid ellenanyag [70].

#### 7.1.4. A glutén immunológiai alapokon nyugvó kimutatásának módjai

A jelenleg piacon kapható immun-alapú mérő kitek, a méréshez szükséges vegyszerek és anyagok együttesét az **1. táblázatban** foglaltuk össze.

1. táblázat. Glutén kimutatására szolgáló immunológiai alapokon működő, kereskedelmi forgalomban kapható mérőrendszerek összefoglalása [52], [62], [63]

Table 1 Summary of commercially available immunological measurement systems for the detection of gluten [52], [62], [63]

Forgalmazó cég / Distributor	ELISA kit / ELISA kit	Elv / Principle	Ellenanyag Antibody
Abnova	Gluten/Gliadin ELISA Kit	szendvics sandwich	pAb
Astori Tecnica	Gluten ELISA Kit	kompetitív competitive	pAb
Biomedal Diagnostics	GlutenTox ELISA Sandwich	szendvics sandwich	A1/G12 mAb
	GlutenTox ELISA Competitive (A1)	kompetitív competitive	A1 mAb
	GlutenTox ELISA Competitive (G12)	kompetitív competitive	G12
	GlutenTox Sticks	LFD LFD	G12 mAb
Biocontrol	Transia Plate Prolamins	szendvics sandwich	R5 mAb
BioCheck (UK)	Gluten-Check ELISA kit	szendvics sandwich	$\omega$ -gliadin mAb
Crystal Chem Inc.	Gluten (gliadin) ELISA kit	szendvics sandwich	pAb
	Gluten (Gliadin) Lateral Flow Kit	LFD LFD	
Diagnostic Automation	AccuDiag Gliadin/Gluten ELISA	szendvics sandwich	pAb
Diffchamb (Svéd)	Transia Plate-Gluten	szendvics sandwich	$\omega$ -gliadin mAb
	Transia-Plate-Prolamins	szendvics sandwich	R5 mAb
ELISA Systems (Ausztrália)	ELISA Sxstems Gliadin assay	szendvics sandwich	$\omega$ -gliadin mAb
	Gliadin ESGLISS-48		
ELISA Technologies (USA)	ALLER-TEK Gluten ELISA	szendvics sandwich	$\omega$ -gliadin mAb
	EZ gluten	LFD LFD	$\omega$ -gliadin mAb
EuroClone (Olaszország)	Gliadin/Gluten Enzyme Immunoassay (EAE006096)		
Elution Technologies	Gluten Rapid Kit	LFD LFD	pAb

Forgalmazó cég / Distributor	ELISA kit / ELISA kit	Elv / Principle	Ellenanyag Antibody
EuroProxima	Gluten-Tec ELISA	kompetitív <i>competitive</i>	alpha-20 mAb
Gen-Probe (korábban: Tepnel)	BIOKITS Gluten Assay Kit	szendvics <i>sandwich</i>	ω-gliadin mAb
Hallmark (U.K.)	HAVen Gluten AOAC 991.19	szendvics <i>sandwich</i>	ω-gliadin mAb
	High Sensitivity	szendvics <i>sandwich</i>	ω-gliadin mAb
	Gluten Flowthrough		ω-gliadin mAb
Immunolab Diagnostics and Immunoalalytics (Német)	Gliadin/Gluten ELISA Test	szendvics <i>sandwich</i>	pAb
Imutest	Gluten-Check ELISA kit	szendvics <i>sandwich</i>	ω-gliadin mAb
	Gluten-in-Food Test	Screening test <i>screening test</i>	ω-gliadin mAb
InCura	GlutenAlert ELISA	kompetitív <i>competitive</i>	pAb
Ingenasa (Spanyol)	Ingezim Gluten (3.0.GLU.K.2)	szendvics <i>sandwich</i>	R5 mAb
	Ingezim Gluten SemiQ	szendvics <i>sandwich</i>	R5 mAb
	Ingezim Gluten Hidrolizado	direkt <i>direct</i>	R5 mAb
Morinaga Instiute (Japán)	Wheat/Gluten (gliadin) ELISA kit	szendvics <i>sandwich</i>	pAb
Nima	Nima Starter Kit-Gluten (Gluten Sensor+12 Test Capsules)	LFD <i>LFD</i>	Nima 13F6 és 14G11
Neogen (USA)	Alert for Gliadin	screening test <i>screening test</i>	ω-gliadin mAb
	Alert for Gliadin R5	screening test <i>screening test</i>	R5 mAb
	Veratox for Gliadin	szendvics <i>sandwich</i>	ω-gliadin mAb
	Veratox for Gliadin R5	szendvics <i>sandwich</i>	R5 mAb
	Reveal 3-D Gluten	LFD <i>LFD</i>	ω-gliadin mAb
Noack	Tepnel Biosystems (UK): Biokits Gluten Assay Kit	szendvics <i>sandwich</i>	ω-gliadin mAb
	Tepnel Biosystems (UK): Gluten Rapid Kit	LFD <i>LFD</i>	ω-gliadin mAb
Operon (Spanyol)	Stick Gluten	LFD <i>LFD</i>	R5 mAb
Pi Bioscientific Inc.	Microbiologique Gluten Sandwich		2D4 mAb
R-Biopharm (Német)	Ridascreen Gliadin (R7001)	szendvics <i>sandwich</i>	R5 mAb
	Ridascreen Fast Gliadin	szendvics, 48 lyuk, rövidebb idejű inkubáció <i>sandwich</i> , 48 lyuk, rövidebb idejű inkubáció	R5 mAb
	Ridascreen Gliadin Sensitive	szendvics, alacsonyabb detektálási határ <i>sandwich</i> , alacsonyabb detektálási határ	R5 mAb
	Ridascreen Gliadin Competitive (2nd generation)	kompetitív <i>competitive</i>	R5 mAb
	RidaQuick Gliadin	LFD <i>LFD</i>	R5 mAb

Forgalmazó cég / Distributor	ELISA kit / ELISA kit	Elv / Principle	Ellenanyag Antibody
Romer Labs (Ausztria)	AgraQuant ELISA Gluten G12	szendvics sandwich	G12 mAb
	AgraQuant ELISA Gluten	szendvics sandwich	pAb
	AgraStrip LFD Gluten G12	LFD LFD	G12 mAb
	AgraStrip LFD Gluten	LFD LFD	pAb
Tecna (Olasz)	Gluten ELISA kit R5	szendvics sandwich	R5 mAb
Zeulab	Proteon Gluten Express	LFD LFD	G12 mAb

Megjegyzések, rövidítések / Notes, abbreviations::

- LFD: lateral flow device (kromatográfias immun gyorseszteszt);
- mAb: monoklonális ellenanyag; pAb: poliklonális ellenanyag (az  $\omega$ -gliadint 401.21 mAb-ként is említik a kiték kísérőirataiban);
- \*AOAC, Association of Analytical Commision által validált módszer:  $\omega$ -gliadin ellen termelt ellenanyag alapú immunkémiai rendszer;
- \*\*Codex Alimentarius Commission által validált módszer: jelenleg az R5 alapú rendszer élvez prioritást, kizárólag ezzel a módszerrel kapott eredmények vehetők elfogadottnak a Codex Bizottság ajánlása alapján.
- LFD: lateral flow device (chromatographic immunoassay);
- mAb: monoclonal antibody; pAb: polyclonal antibody ( $\omega$ -gliadin is also referred to as 401.21 mAb in the kit accompanying documents);
- \*AOAC, method validated by the Association of Analytical Communities: immunochemical system based on antibodies produced against  $\omega$ -gliadin;
- \*\*Method validated by the Codex Alimentarius Commission: currently, the R5-based system enjoys priority, only results obtained by this method can be accepted according to the recommendation of the Codex Commission.



A kép illusztráció / Picture is for illustration only  
Fotó/Photo: TOLOKÁN Adrienn

### 7.1.4.1. ELISA mikrotiter lemezen történő kivitelezés

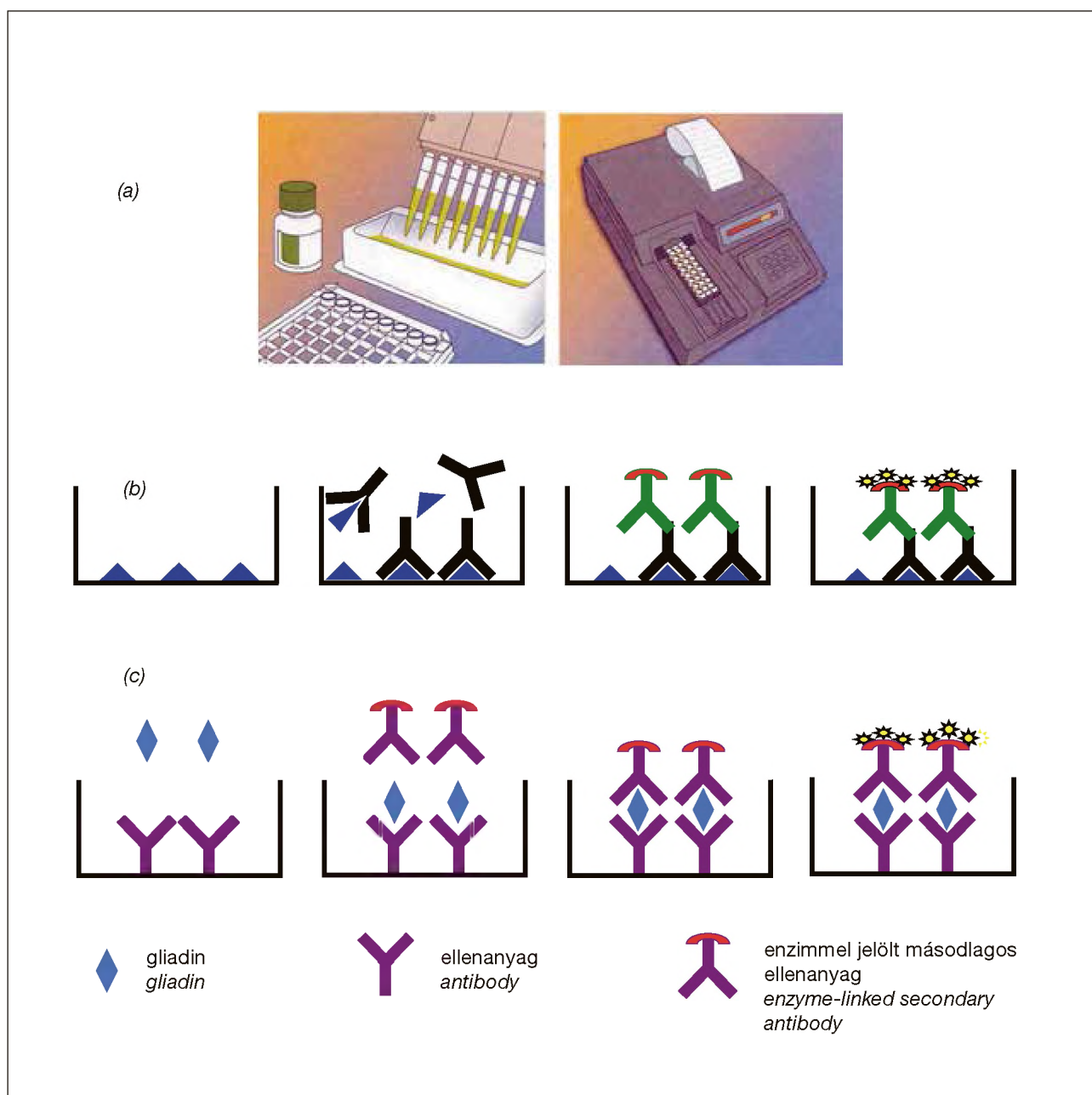
Az ELISA mikrotiter lemez kvantitatív és kvalitatív mérést egyaránt lehetővé tesz. Kompetitív indirekt vagy szendvics direkt ELISA elven működik, monoklonális vagy poliklonális ellenanyag felhasználásával. Működésének vázlatát az **1. ábra** mutatja be.

### 7.1.4.2. Immunkromatográf tesztmembránon történő kivitelezés

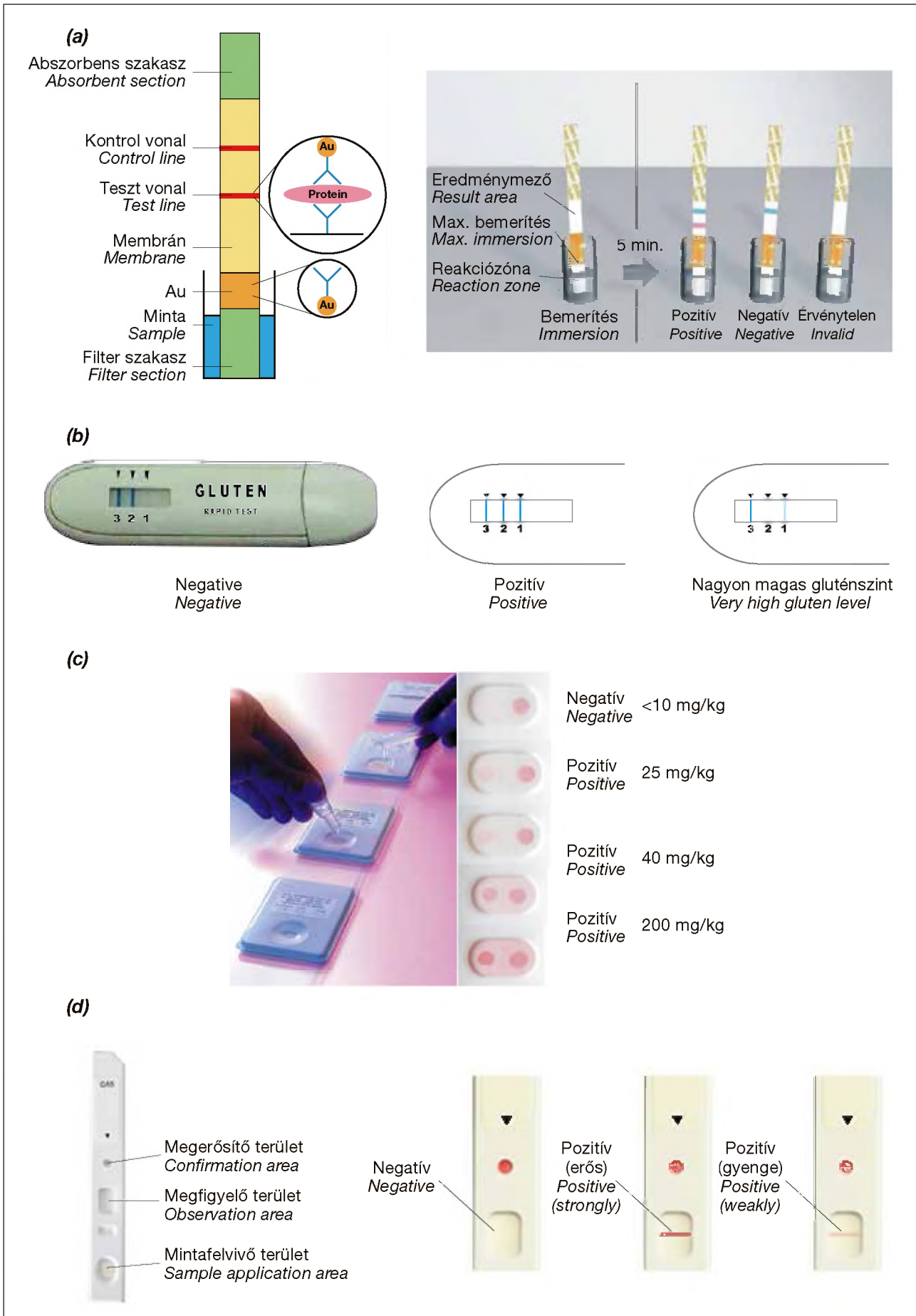
Kvalitatív és fél-quantitatív mérésre szolgál. Immunkromatográfia elven működő, gyors szűrő módszer, amely megmutatja, hogy a minta gluténkoncentrációja a megengedett értékhatár fölött vagy alatt van-e (**2. ábra**). Szendvics direkt elven, és csak mono-

klonális ellenanyaggal működik. Főleg az élelmiszer-gyártás különböző technológiai lépéseinél, minőség-ellenőrzési feladatoknál, vagy vendéglátó egységekben alkalmazzák. A membránok elhelyezését különböző formációban oldják meg [71].

A membránt a vizsgálandó fehérje-extraktumba kell mártani. A membrán adszorbens zónáján antigén-specifikus ellenanyaggal fedett, színezett (szubsztrát) mikroszemcsék találhatók. Ezek hozzákapszolódnak a mintában lévő célfehérjéhez (gliadin), komplexet alkotnak és így együtt haladnak a reakciózóna felé. Itt egy bizonyos ponton a létrejött immunkomplex a membrán mobilizált enzimmel jelölt antigén-specifikus ellenanyaghoz kapcsolódik, amit a mikroszemcse elszíneződése jelez. A teszt működését kontroll mikroszemcse biztosítja.



1. ábra. (a) ELISA mikrotiter lemez és leolvasó (b) Kompetitív indirekt ELISA és (c) szendvics ELISA működési elve  
Figure 1 (a) ELISA microtiter plate and reader; Operating principle of (b) Competitive indirect ELISA and (c) sandwich ELISA



2. ábra. Immunkromagráf membrán glutén detektálására (Példák: a, R-Biopharm RidaQuick Gliadin R7004, b, Tepnel: BioKits RAPID 3-D™ Gluten Test, c, Hallmark GLuten Flow Trough (GFT) Test, d, Crystal Chem Inc.-Glutén (gliadin) lateral flow kit  
Figure 2 Immunochromatographic membrane for the detection of gluten (Examples: a, R-Biopharm RidaQuick Gliadin R7004, b, Tepnel: BioKits RAPID 3-D™ Gluten Test, c, Hallmark Gluten Flow Trough (GFT) Test, d, Crystal Chem Inc.-Gluten (gliadin) lateral flow kit



## 7.2. Egyéb, nem immunológiai alapokon nyugvó glutén kimutatási módszerek fejlesztése

### 7.2.1. Polimeráz-láncreakción (PCR) alapuló gluténkimutatási eljárás

A Táplálkozástudományi és Különleges Táplálkozási Célú Élelmiszerek Codex Bizottsága (Codex Committee On Nutrition And Foods For Special Dietary Uses – CX/NFSDU) állásfoglalása szerint az immunológiai alapokon nyugvó mérési módszerek mellett alternatív és kiegészítő módszerek a DNS-alapú kvalitatív meghatározására is szükség van.

A DNS kimutatásán alapuló PCR-módszerek közvetettségük miatt nehéz kifejleszteni egy, allergén összetevő, pl. a glutén kimutatásra szolgáló, sok optimalizálást igénylő rutinmódszert. A PCR-elven alapuló technikákat elsősorban azokban az esetekben használják, ahol jelöletlen az adalékanyag, illetőleg további vizsgálati terület az ipari berendezések tisztaságának ellenőrzése szükséges. A módszer pontosságára, specifikusságára és jó reprodukálhatóságára azonban egyre nagyobb az igény. A DNS-alapú eljárások előnye, hogy a DNS nagy hőstabilitással jellemezhető, akár egyedi fajok vagy a módszer flexibilitásának köszönhetően hasonló allergéneket hordozó faji-csoportok is kimutathatók, attól függően, hogy a reakcióban résztvevő kulcsfontosságú primerek bázis-szekvenciáit hogyan tervezik meg. A vizsgálati technika akár terepen is alkalmazható, csupán egy termosztátot igénylő, szemmel is értékelhető vizsgálati lehetőséget is biztosít.

A PCR diagnosztikán alapuló glutén-analitikai módszerek korlátai:

- A vizsgálandó mintában megtalálható DNS kis mennyisége, a DNS töredezettsége miatt a szekvencia nem elégséges hossza;
- Technológiai kezelések és élelmiszer-mátrix (részleges vagy teljes hidrolizáció, enzimatikus degradáció, összetett nagy szénhidrát vagy zsírtartalmú minták) hatása;
- Esetlegesen szennyezett minták inhomogenitása;
- A fehérje-DNS konverzió értéke.

A gluténtartalom DNS-alapon történő meghatározása közvetett módszer, hiszen nem magát a patológiás reakciókat kiváltó okozó fehérje – a glutén – érzékelésén alapul, hanem vagy az azt kódoló DNS-részletet, vagy a vékonybél nyálkahártyát károsító fehérjét tartalmazó gabonafélék valamelyik másik jellemző DNS-részletét detektálja. Ezért a DNS alapú módszerek kvantitatív mérésre csak abban az esetben használhatók, ha bizonyítható, hogy a DNS és a hozzá tartozó fehérje vagy gabonarészlet jelenléte egymással arányos, mennyiségük a mintában korrelál egymáshoz. DNS-alapú eljárást elsősorban gluténmentesség igazolására, valamint olyan esetek-

ben célszerű alkalmazni, amikor a fehérjevizsgálatok alkalmazása valamilyen korlátba ütközik, pl. az élelmiszer-előállítás során a fehérjék denaturálódhatnak, kémiaiag oldhatatlanná válhatnak [74].

Az allergének DNS-alapú kimutatását számos genetikai kutatás támasztja alá, hiszen az allergének keresztreakciói, a genetikai rokonságok megállapítása, illetve a konzervatívabb és variábilisabb szekvenciák meghatározása a megfelelő primer kiválasztása előtt a megfelelő genetikai alapok feltérképezésére volt szükség.

Ko és munkatársai [75] olyan PCR szensz-antiszensz primerpárokat terveztek, amelyek alkalmasak a különböző gabonafajok egymástól való elkülönítésére. Ehhez 5S riboszómális RNS gének közti spacer szekvenciára terveztek primerpárt, illetve ezen kívül RAPD primereket (Random Amplified Polymorphic DNA) használtak. Vizsgálataik során a gabonafélék keverékei esetében a spacer szekvenciára tervezett primer bizonyult hatékonyak.

Az Allmann és munkatársai [76] által kifejlesztett módszer során TR01/TR02 primer-párt használt, amely egy 109 bp (bázispár) hosszúságú fragmen-tumot sokszoroz a búza riboszómális RNS-génjének 25S és 18S lokusza között lévő intergenikus régió egy sűrűn ismétlődő szakaszán. Ezt a módszert alkalmazták a későbbiekben emulgeátorok, lisztek keményítők, instant levesporok, polenta, curry és más élelmiszerekből történő glutén kimutatására [77]. Köppel és munkatársai [78] ezt a primerpárt használták különböző országokból származó müzli minták gluténmentességének ellenőrzésére.

A Dahinden és munkatársai [79] által tervezett primer pár lehetővé tette a búza, rozs és árpa egyidejű kimutatását élelmiszerekből. Az általuk tervezett primer csak a búza, árpa és a rozs kloroplaszt DNS *trnL*-génjének egy nem kódoló szakaszát amplifikálja specifikusan. Kísérleteik során ezzel a primerpárral vizsgáltak különböző gabonaféléket és keményítőtartalmú magvakat, valamint hőkezelt élelmiszereket is (kenyereket, tésztákat és bébiételeket), amelyeknél a primerpárt a toxikus gabonafélékkel való szennyezettség kimutatására szintén sikerrel tudták alkalmazni. Kuchta [80] az általa alkalmazott RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analízissel kibővített módszerrel laboratóriumok közötti körvizsgálatot indított. A körvizsgálat során instant bébitápszereket szűrték ennek a technikának a felhasználásával. A körvizsgálat során bebizonyosodott, hogy a módszer kielégítően érzékeny, megbízható és gyors, rutin módszerként való alkalmazás céljára megfelelő [81]. Az eredményekből kiindulva Mujico és Méndez [82] real-time PCR-módszert fejlesztettek, amelyhez referencia módszerként R5 ELISA-vizsgálatot végeztek. A kísérlet lineáris korrelációt mutattak ki a mérések során használt minták prolamin-tartalma és a DNS mennyisége között.

Delano és Schmidt [83] kloroplaszt *trnS* gén *trnL* (UAA) régiójára tervezett primerpárt használtak.

A tRNS-gének jellemzője, hogy sokkal konzervatívabbak, mint a fehérjéket kódoló vagy riboszomális gének, ezért minimális eltérések miatt alkalmasabbak több faj együttes jellemzésére. Ezáltal egyetlen primerpár használata lehetővé tette különböző növényi DNS (pl. repce, kukorica, burgonya, szója, rizs, mogyoró, búza) kimutatását, ugyanis a primerpár használata során a különböző növényi DNS-ek különböző hosszúságú fragmentumokat eredményeztek. Az első, real-time PCR-módszert rozs detektálására nyersanyagokból és késztermékekből 2004-ben fejlesztették ki [84]. Ezt követően Hernandéz és munkatársai [85] négy, egymástól független real-time PCR mérésből álló eljárást fejlesztettek. Ennek során az árpa hordein-jének DNS szekvenciájára, a rizs a gos9 DNS szekvenciájára, a napraforgó heliantin-jének DNS szekvenciájára, illetve a búza acetyl-CoA karboxiláz DNS szekvenciájára terveztek primereket és Taq-Man próbákat. A módszert hőkezelt élelmiszereken (kekszek, kenyerek) és kevés DNS tartalmú élelmiszer-mintákon (olaj, sör) is tesztelték.

Terzi és munkatársai számos módszert alkalmaztak és hasonlítottak össze nyomokban előforduló gabonafélék szűrésére [86]. Vizsgálataikból kiderült, hogy valamennyi módszernek voltak hátrányai is, amelyek elsősorban a komplex minták vizsgálata során jelentkeztek. Ez a tény tette indokolttá a további módszerfejlesztést, amelyek során real-time PCR készülékre kidolgozott kítjüket fejlesztették ki (SureFood® ALLERGEN Gluten real-time PCR). A módszer alsó méréshatára 5 DNS kópia, illetve 5 mg/kg glutén (R-Biopharm).

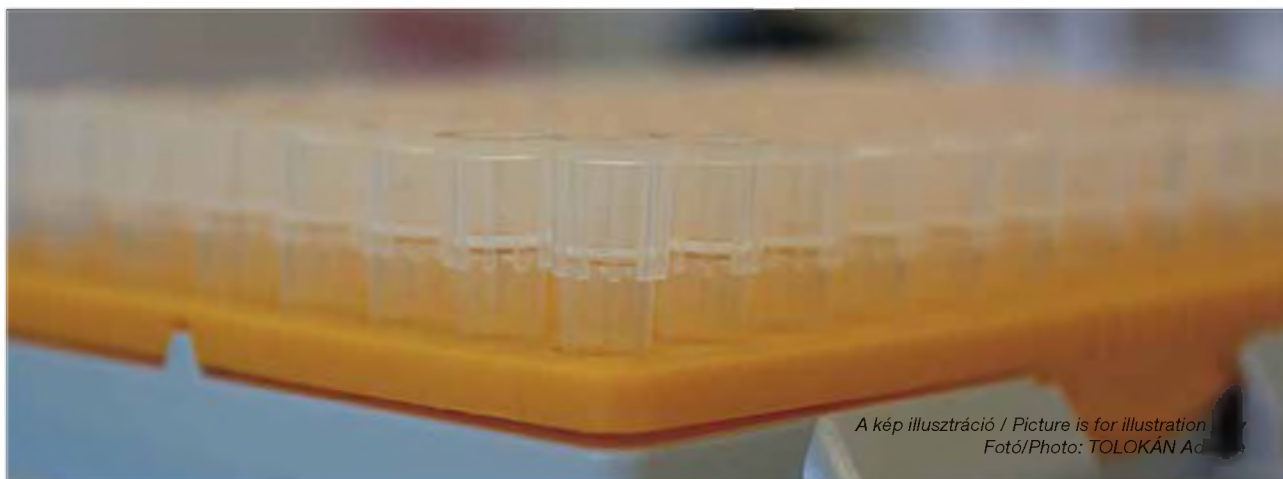
A PCR-módszerek új iránya lehet az ún. izotermális PCR módszer, amely gyors, akár az élelmiszer-előállító üzemek gyártósorain is elvégezhető vizsgálatot tesz lehetővé (3. ábra). A vizsgálatokhoz többek között az ún. TwistAmp® kit (TwistDx Ltd, UK) használható, amely többféle változatban létezik (pl. basic, exo, exoRt, nfo). A módszert jelenleg elsősorban mikrobiológiai, virológiai vizsgálatokra használják, de könnyen adaptálható különböző élelmiszer-allergének, így glutén vizsgálatára is [87], [88].

A különböző változatokban az a közös jellemző, hogy a PCR reakcióhoz DNS-rekombináz enzimet hasz-

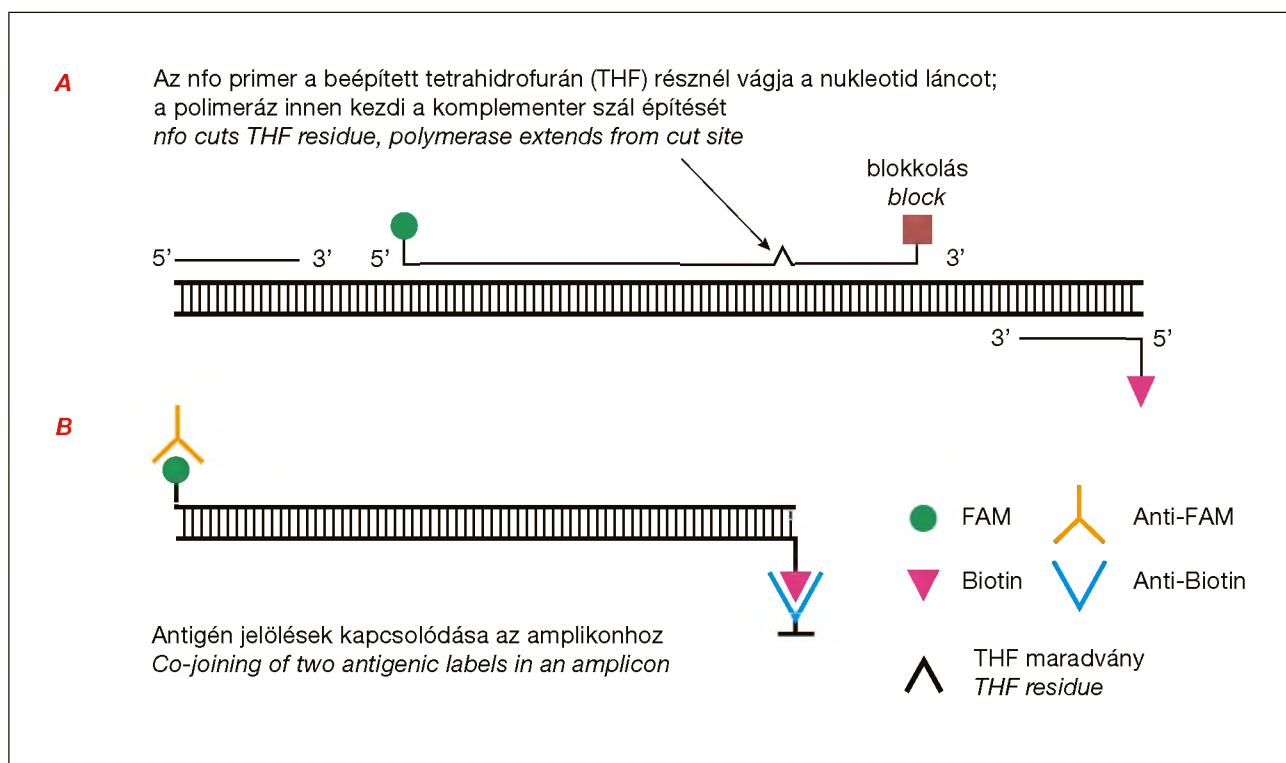
nálnak, ellentétben a hagyományos PCR módszerrel, amely DNS-polimeráz enzimmel működik. A DNS-rekombináz-enzim révén a DNS sokszorozás 37-40°C-on történik, ezért a reakciósorozat 30-40 perc alatt végbemegy. A TwistAmp® kitékhez speciális primerek szükségesek, amelyeknek legalább 30-35 bp hosszúaknak kell lenniük. A forward primer esetében szükséges az 5'-végen biotin jelölés is (kivéve basic módszer), ez PCR-ELISA-módszerhez hasonlóan lehetővé teszi a tesztcsík segítségével történő detektálást (nfo kit). A vizsgálathoz ezen felül egy 50-55 bp hosszúságú próba szekvencia használata is szükséges, amelynek tervezésekor figyelemmel kell lenni arra, hogy a próba 5' végétől 29-30 bp távolságra egy timin bázis helyett tetrahydrofuran legyen bekötődve, a rekombináz enzim ugyanis ezen a helyen tud kötődni és megkezdeni a komplementer szakasz sokszorozását. Mindezek mellett ügyelni kell arra, hogy úgy a primerek, mint a próba szekvenciáinak GC-aránya (guanin-citozin-arány) közel hasonló legyen.

Az nfo-kit segítségével történő DNS-sokszorozás után az egyszerű kiértékelés MileniaHybridetect (MileniaBiotec, Germany) strip segítségével történik. A tesztcsíkot a vizsgált minta sokszorozott DNS-ét tartalmazó csőbe mártva kapjuk meg a kvalitatív eredményt. Amennyiben a strippen nem jelenik meg egyetlen csík sem, a sokszorozást nem megfelelő módon végeztük, amennyiben 1 csík látható, a vizsgált minta nem tartalmaz kimutatható mennyiségű glutént. Két csík megjelenése esetén a mintában kimutatható mennyiségű glutén található. A hagyományos PCR-módszerekkel ellentétben ez a módszer nem DNS-polimeráz, hanem rekombináz enzimet használ a sokszorozáshoz, és a vizsgálathoz nem elegendő a két, 10-20 bp hosszú primer.

A basic kit alkalmazása hasonló a hagyományos PCR-hez, csak a reakció gyorsabban megy végbe. A kiértékelés ebben az esetben gélelektroforézissel történik. Az exo és exoRT tesztek a real-time PCR módszerekhez hasonlóan mennyiségi DNS- illetve RNS-vizsgálatot tesznek lehetővé. A TwistAmp® kit-hez egy hordozható termosztát is tartozik, amely megkönnyíti a terepen történő munkát, és biztosítja a reakcióhoz szükséges hőmérsékletet [72], [73].



A kép illusztráció / Picture is for illustration  
Fotó/Photo: TOLOKÁN Ad



3. ábra. A Captured TwistAmp® nfo kit működési elve [87], [88]  
 Figure 3 Operating principle of the Captured TwistAmp® nfo kit [87], [88]

### 7.2.2. Egyéb új és innovatív gluténkimutatói lehetőségek

A glutén kimutatására irányuló fejlesztések a mai napig kihívást jelentenek, és folyamatosan egyre több új, innovatív módszer lát napvilágot, amelyek célja a glutén mennyiségének illetve hiányának minél gyorsabb és pontosabb kimutatása. Ilyenek: aptamerek, anti-gliadin poliklonális ellenanyaggal bevont immunmágneses gyöngyök (IMBs, immunomagnetic beads), fehérje vagy peptid mikroarray-ek (multiplex lab-on-a-chip eszközök) használata, multianalitikai jellemzés (multianalyte profiling, xMAP) fluoreszcens festéket tartalmazó mágneses részecskékkel [62].

### 8. Következtetések és nyilatkozat

Századunk emberi populációjában aggasztó gyakorisággal fordulnak elő különböző allergiás, illetve túlérzékenységen alapuló anyagcsere-rendellenességek. Az érintett egyének biztonságos napi életviteléhez feltétlenül szükséges, hogy az élelmiszereket gyártó, forgalmazó, illetve az ágazatot ellenőrző szolgáltatók, hatósági szervezetek olyan analitikai eszközökkel rendelkezzenek, amelyek birtokában nagy biztonsággal ellenőrizhető az allergiás, intoleranciával küzdő fogyasztók táplálkozását szolgáló élelmiszerek összetétele.

Mivel a túlérzékenységi reakciókat (cöliákia, allergia) esetenként igen kis mennyiségű, nem-kívánatos élelmiszer-összetevők is kiválthatják, fontos az ilyen anyagok kimutathatóságát, mennyiségi mérését kellő

precizitással biztosító, gyorsan eredményt adó módszerek fejlesztése.

Áttekintő jellegű dolgozatunkban e gondolatok jegyében gyűjtöttük össze a gluténfehérjék vizsgálatára vonatkozó, a hozzáférhető irodalmi anyagból általunk fontosnak ítélt ismereteket. Mivel a gluténfehérjék vizsgálati módszereiként szolgáló analitikai csomagok – kitek – immunkémiai jellemzői az egyes cégek által kifejlesztett termékekben egymástól számottevően különböznek, kéziratunkból nem hagyhatuk ki az egyes kitek fantázianeveit, esetenként a kitek gyártó vállalkozások megjelölését sem. Ezúton jelezzük, hogy munkánkkal egyetlen, a gluténfehérjék analitikájában érdekelt gyártócéggel sem állunk olyan üzleti kapcsolatban, amely a tudományos eredmények publikálásán túl bármely cég gazdasági érdekeit szolgálná. Az **1. táblázatban** összefoglalt adatok közlésével szándékunk az, hogy a vizsgálati tervek készítése során kinek-kinek segítséget nyújtsunk az éppen aktuális vizsgálati célnak leginkább megfelelő mérési elv és mérési módszer kiválasztásában.

### 9. Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönettel tartoznak az NKFI Hivatal által támogatott magyar-izraeli tudományos és technológiai együttműködésben született TÉT\_15\_IL-1-2016-0019 regisztrációs számú, „Gluténmentes, tojás-helyettesítő és azzal azonos textúrát biztosító adalékanyagok, illetve azok alkalmazására épülő növényi alapú termékek” című projektnek.