

Az élelmiszerallergének mérésének lehetőségei ma – kihívások, megoldások, a fejlesztés irányai

*Török Kitti, Bugyi Zsuzsanna, Hajas Livia, Adonyi Zsanett
és Tömösközi Sándor*

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Alkalmazott
Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék

Érkezett: 2011. április 26.

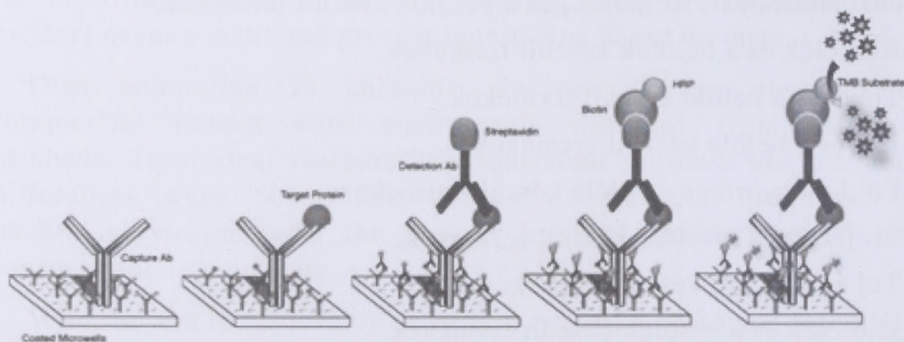
Az emberek többsége képes a különböző ételeket kellemetlen hatások nélkül elfogyasztani, míg mások különböző tüneteket észlelnek. Ezek megnyilvánulhatnak az immunrendszer, valamint az emésztőrendszer abnormális működésében. Az előbbi élelmiszerallergiának, az utóbbit élelmiszer-intoleranciának nevezzük. Az Európai Unió jelenleg 14 olyan élelmiszer alapanyagra vagy összetevőre ír elő jelölési kötelezettséget, melyek az élelmiszerfogyasztással kapcsolatba hozható túlérzékenységi reakciók túlnyomó többségének kiváltásáért felelősek:

- Glutént tartalmazó gabonafélék (búza, rizs, árpa, zab, tönkölybúza vagy hidrolizált formájuk) és a belőlük készült termékek.
- Rákfélék és a belőlük készült termékek.
- Tojás és a belőle készült termékek.
- Hal és a belőle készült termékek.
- Földimogyoró és a belőle készült termékek.
- Szójabab és a belőle készült termékek.
- Tej és a belőle készült termékek.
- Diófélék és a belőlük készült termékek.
- Zeller és a belőle készült termékek.
- Mustár és a belőle készült termékek.
- Szezámag és a belőle készült termékek.
- Kén-dioxid és az SO₂ kifejezett szulfitok.
- Csillagfürt és a belőle készült termékek.
- Puhatestűek és a belőlük készült termékek (40/2008 FVM-SZMM, 2008).

Analitikai módszerek

A törvényi szabályozás betartásának és a betegek biztonságának érdekében az élelmiszerbiztonság és a jó gyártási gyakorlat megvalósításához megfelelő analitikai módszerekre van szükség. Az élelmiszerallergének kimutatására és mennyiségi meghatározására leggyakrabban immunanalitikai módszereket alkalmaznak nagyfokú specifitásuk és érzékenyséjük miatt (Demeulemester, 2006).

Az enzimhez kötött ellenanyag-vizsgálat (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) tesztek alapja, hogy az antitestekhez kapcsolt enzimek használatával detektálják az antigén-antitest komplexet. Az enzim a színtelen szubsztrátot (kromogén) színes termékké alakítva jelzi az antitest-antigén komplex jelenlétét és mennyiségét. A leginkább elterjedt ELISA módszer a szendvics (1. ábra), valamint az indirekt kompetitív ELISA. A kereskedelmi forgalomban ma már számos allergén fehérje meghatározásához áll rendelkezésre ELISA kit. Ezen kitek alkalmazhatósága és analitikai teljesítményjellemzői széles tartományban változnak. Az analitikai módszerek megbízható alkalmazásának alapfeltétele a módszerek validálása. Az allergénanalitika esetében azonban ennek több feltétele hiányzik, ezért a hozzáférhető kitek csak részlegesen validáltak.

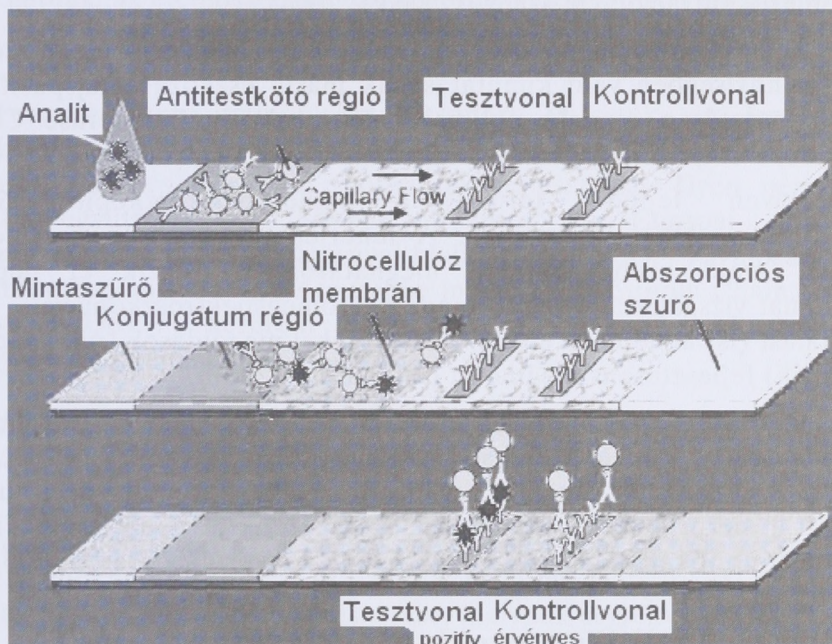


1. ábra: A szendvics ELISA működési elve

[<http://www.elisa-antibody.com/index.php?page=protocol>]

Az immunkormatográfiának is nevezett gyors tesztek (Lateral Flow Assay) szintén gyakran alkalmazott megoldások, különösen az élelmiszerbiztonsági rendszerek működtetéséhez. Kvalitatív, illetve szemikvantitatív meghatározásra alkalmas, használata gyors, egyszerű, nem igényel speciális képzettséget. Az LFD végrehajtása során a minta végigfut a mintaszűrőn és a konjugátum régió. A konjugátum régió

specifikus, jelölt antitesteket tartalmaz. Ha az antigén jelen van a mintában, kialakul az antigén-antitest komplex, mely a membrán mentén a tesztzóna felé vándorol tovább. A tesztzóna lekötött antitesteket tartalmaz, melyek specifikusak az analit egy másik epitópjára, mivel az ellenanyagok megkötik a komplexet (2. ábra). A tesztzóna színintenzitása összefüggésbe hozható a meghatározandó komponens mennyiségével (Takács, 2005).



2.ábra Az LFD lefutása

[http://www.iah.bbsrc.ac.uk/press_release/2008/images/LFD.jpg]

Az immunoblotting szintén antigén-antitest komplex képzésén alapuló eljárás. Első lépése a makromolekulák elválasztása, ezt a membránra történő blottolás követi. A membránt a mérendő fehérjére specifikus ellenanyaggal inkubálják, így kialakul az antigén-antitest komplex a primer antitesttel. Az eljárás utolsó fázisában szekunder antitesttel történő inkubálás után radioaktív, enzimés jelölés és kolorimetriás vagy kemilumineszcenciásan detektálásra kerül sor.

A radioallergoszorbens (RAST) és az enzim-allergoszorbens (EAST) inhibíciós tesztek olyan immunanalitikai módszerek, melyek az allergénre specifikus IgE ellenanyagot emberi vésérumból határozzák meg. A módszerek elve, hogy szilárd hordozóhoz rögzített allergénekhez kötődő specifikus IgE antitesteket mérnek egy jelölt ellenanyag segítségével.

Az immunoelektroforézis a gélközegben történő elektroforézis és az immunodiffúzió kombinálása. Hatékony módszer a komplex antigén-keverékek szétválasztására. Az immuno-elektroforézis egyik változata a rakéta immuno-elektroforézis, amelyben az antigén az antiszérumot tartalmazó gélközegben elektromos erőter hatására diffundál. Ha a két reagens találkozik, a precipitációs ív egy rakéta, illetve egy kúpszerű alakzat körvonalaihoz hasonló, a körülhatárolt terület nagysága pedig az antigén koncentrációjával arányos (Krska, 2004).

Az immunanalitikai módszerek mellett az allergén élelmiszerek nyom-mennyiségben való kimutatásának másik eszköze a fajspecifikus DNS kimutatásán alapuló polimeráz láncreakció (Polimerase Chain Reaction, PCR) (Holzhasuer, 2006).

Intenzíven fejlődő terület a tömegspektroszkópia (Mass Spectrometry, MS) alkalmazása. A fehérjéket enzimesen peptidekre bontják, majd ezen peptidek meghatározását végzik el peptid-újlenyomat-vizsgálattal vagy tandem tömegspektroszkópiával. MS detektálást (is) alkalmazó elválasztástechnikai megoldások (ún. kapcsolt technikák) fejlesztése is megindult (Horváthné, 2007).

A bioszenzorok a biológiai elven alapuló reakciók detektálására használhatók, így alkalmasak lehetnek allergének mérésére is. Működési elvük: a szenzor chip bioaktív receptort tartalmaz, amely specifikusan megköti a mérni kívánt komponens, a transzduktor pedig a biokémiai információt optikailag meghatározható jellé konvertálja (Besler, 2001).

Az allergénanalitika megoldandó feladatai

A túlérzékenységi reakciókat kiváltó fehérjék meghatározására alkalmas analitikai módszerek fejlesztése és érvényesítése több nehézségbe ütközhet:

- Egyes allergén fehérjék kémiai összetétele nem teljes mértékben ismert, valamint a kulcs fehérjék és epitópok meghatározása sem minden esetben adott.
- Az allergén komponensek gyakran csak kis mennyiségben vannak jelen az élelmiszermintákban.
- Az allergiás reakciót kiváltó küszöbdózisok nem ismertek, így nehéz meghatározni az egyes analitikai teljesítményjellemzőket a módszerfejlesztés során. Emellett több epitóp is kiválthatja a nemkívánatos reakciót.
- Az analit megfelelő megválasztása: magát a fehérjét vagy annak egy markerét határozza-e meg a módszer.

- Referencia módszerek hiánya.
- Referenciaanyagok hiánya. A legtöbb élelmiszerallergén esetében jelenleg nem áll rendelkezésre olyan feldolgozott élelmiszermátrix, amely deklarált mennyiségben tartalmazza az adott fehérjét.
- Az alapanyagok biológiai variabilitása.
- Az élelmiszerfeldolgozás és -tárolás során a fehérjék denaturálódhatnak, az élelmiszeralkotók között kölcsönhatások alakulhatnak ki. Ezek a folyamatok jelentősen befolyásolhatják a mintaelőkészítés és a meghatározás eredményét, és hathatnak pl. az immunaktivitásra is.

Természetesen számos kutatócsoport dolgozik az érzékenységi reakciókkal és az azt kiváltó komponensek analitikájával kapcsolatos diagnosztikai és analitikai módszerek fejlesztésén. Ilyen nemzetközi K+F együttműködés többek között az Európai Unió 6. keretprogramjának támogatásával kialakított MoniQA Kiválóságshálózat (Monitoring and Quality Assurance in the Food Supply Chain, FOOD-CT-2006-036337) keretein belül működő Allergén Munkacsoport, melynek munkájában Tanszékünk is részt vesz.

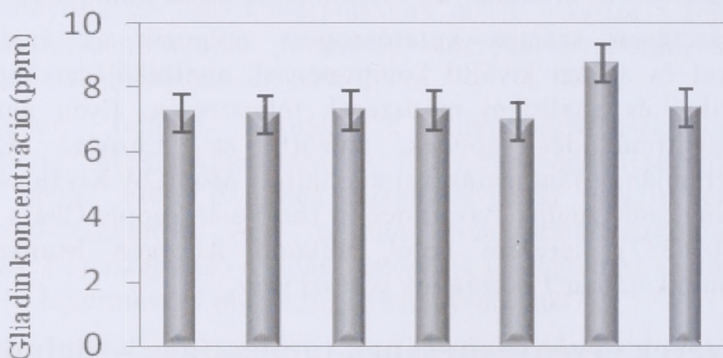
A módszerek érvényesítésének támogatása – élelmiszer modellmátrix előállítás és alkalmazási lehetőségei

Csoportunk egyik meghatározó feladata az allergénalkotókat ismert mennyiségben tartalmazó élelmiszer-modelltermékek fejlesztése. Eddigi kísérleteinkben tej-, tojás- és a gliadintartalmú mátrixokkal dolgoztunk. Olyan kísérlettervet állítottunk össze, melynek segítségével lehetségessé vált az élelmiszer feldolgozási folyamatok hatásának vizsgálata is. Az alkalmazott modelltermékeket Scaravelli és munkatársai (2008) által kidolgozott összetétel módosításával készítettük. Porkeveréket, nyers tésztát és sütött terméket állítottunk elő. A művelet minden fázisában vizsgáltuk a homogenitást és a mérhető toxikus komponensstartalmat. Munkánkhoz a jelenleg hozzáférhető allergén-kitteket használtuk.

A modelltermékek későbbi felhasználása érdekében alapvető követelmény a meghatározandó komponensek homogén eloszlásának biztosítása a mintamátrix előállításának minden fázisában. Ennek megoldása elsősorban fehérjeoldhatósági problémák miatt a siker/gliadin tartalmú mátrixokban bizonyult a legnehezebbnek. Az 3. ábrán bemutatott eredmények tanúsága szerint sikerült olyan homogenizálási eljárást kidolgoznunk, amely laboratóriumi méretekben alkalmas homogén eloszlású anyagok előállítására.

A kifejlesztett mintamátrixok alkalmasak lehetnek mérési módszerek érvényesítése során referenciaanyagként történő alkalmazásra. Ilyen

megoldás azonban eddig még nem állt rendelkezésre. Az 4. ábra egy példát mutat három, kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kit összehasonlító vizsgálatának eredményére gliadin esetében. Nagy jelentőségű, analitikai kit-előállítókat, felhasználókat, élelmiszergyártókat és forgalmazókat, ellenőrzést végzőket, tehát az élelmiszerlánc valamennyi szereplőjét érintő kérdéstről van szó. Ezért a munka és az eredményközlés különös körültekintést igényel. Jelenleg az eddigi eredményeinket megerősítő kísérleti munkákat, valamint stabilitásvizsgálatokat végzünk.



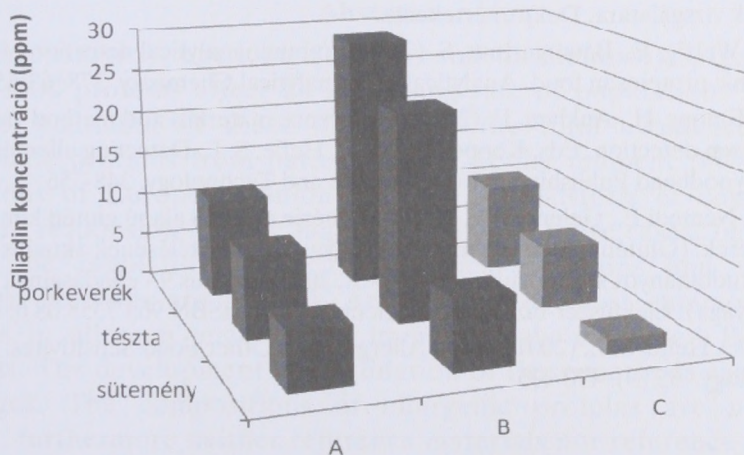
3.ábra: 10 ppm gliadint tartalmazó sütemény homogenitásának vizsgálata

A vizsgálataink harmadik területe a referenciaanyag-fejlesztésen is messze túlmutat. Az élelmiszerfeldolgozás során a kedvezőtlen reakciókat kiváltó fehérjék ugyanis denaturálódnak, mely folyamat nem csak az analitikai eredményeket, hanem az immunaktivitást és ezen keresztül az egészségügyi hatás mértékét is befolyásolhatja. Kísérleteinkben egyelőre csak az alkalmazott ELISA tesztekkel mérhető koncentrációcsökkenéssel foglalkoztunk, melyre egy példát az 4. ábra mutat. Az okok feltárása a denaturáció által kiváltott szerkezet- és összetétel-módosulás molekuláris szintű vizsgálatát igényli, amely ezért munkánk folytatásának célkitűzési között szerepel.

Összegzés

A munkánk során nyert információk olyan értelemben mindenképpen összefüggenek, hogy a mintamátrix tulajdonságai bizonyított módon és mértékben befolyásolják az egyébként kereskedelmi forgalomban kapható immunanalitikai kitek által szolgáltatott eredményeket. Azonban a kapott eredmények jellege lehetőséget ad a jelenségek mögötti folyamatok értelmezéséhez is. Ezek megértése és a hatások jellemzése együttesen szükséges ahhoz, hogy a módszerfejlesztések

irányait kijelöljük. Ugyanakkor a jelenleg rendelkezésre álló módszerek bizonytalanságainak azonosítása hatással kell, hogy legyen a szabályalkotók, az ellenőrzéssel, a fejlesztéssel, sőt az orvosi diagnosztikával foglalkozó szakemberek munkájára, gondolkodására is. Az élelmiszerallergénekre vonatkozó jelölési kötelezettség célja egyértelmű és messzemenően támogatandó, amely az ilyen rendellenességtől szenvedő emberek védelmét szolgálja. Másrészt viszont, ha a módszerek a munkálatok során bemutatott eltérések és hibák kezelésére nem lesznek alkalmasak, s ennek következtében sem a gyártó, sem a fogyasztó, sem a hatóság kezében nem lesz eszköz állításának igazolására, végső soron pedig a fogyasztók védelmére. Amennyiben, illetve amíg az analitikai módszerek korlátai nem teszik lehetővé a határértékek megbízható ellenőrzését, megfontolandó a szabályozás igazítása a jelenlegi analitikai valósághoz és lehetőségekhez. A mérhető fehérjekoncentrációban bemutatott csökkenés okainak feltárásával, magyarázatával lehetőség lesz a mintamátrix típusokra vonatkozó dedikált mintaelőkészítési eljárás kidolgozására. Ugyancsak a fehérjedenaturáció jellegének azonosítása szükséges ahhoz, hogy az immunanalitikai módszerek felhasználási korlátait meghatározzuk.



4. ábra: A feldolgozás hatása a 10 ppm gliadint tartalmazó mintáknál három különböző ELISA teszt (A, B, C) esetében

Köszönetnyilvánítás

A kutatómunka az EU 6. Keretprogramja által létrehozott MoniQA Kiválóság-hálózat (FOOD-CT-2006-036337) anyagi és szakmai támogatásával valósult meg. Köszönjük Dr. Gelencsér Éva és a Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet Élelmiszer-biztonsági Főosztály

munkatársainak szakmai támogatását. Munkánk kapcsolódik a „Minőségorientált, összehangolt oktatási és K+F+I stratégia, valamint működési modell kidolgozása a Műegyetemen” c. projekt szakmai célkitűzéseinek megvalósításához (TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0002)

Irodalom

- 40/2008. (IV. 3.) FVM-SZMM együttes rendelet az élelmiszerek jelöléséről szóló 19/2004. (II. 26.) FVM-ESzCsM-GKM együttes rendelet módosításáról (2008). Magyar Közlöny. 55.szám
- Besler, M. (2001): Determination of allergens in foods. Trends in Analytical Chemistry. 20 (11): 666-672
- Demeulemester, C., Giovannacci, I., Leduc, V. (2006): Detecting dairy and egg residues in food. Eds. Koppelman S J, Hefle S L. Detecting allergens in food. Woodhead Publishing in Food Science and Technology. 219-243
- Holzhasuer, T., Sephan, O., Vieths, S. (2006): Polymerase chain reaction (PCR) methods for the detection of allergenic foods. Eds. Koppelman, S. J., Hefle, S. L. Detecting allergens in food. Woodhead Publishing in Food Science and Technology. 125-143
- Horváthné Szanics E. (2007): Proteomikai módszerek alkalmazása különböző eredetű fehérjék vizsgálatára. Doktori értekezés.
- Krska, R., Welzig, E., Baumgartner, S. (2004): Immunoanalytical detection of allergenic proteins in food. Analytical & Bioanalytical Chemistry. 378: 63-65
- Poms, R., Emons, H., Anklam, E. (2006): Reference materials and method validation in allergen detection. Eds. Koppelman, S. J., Hefle, S. L. Detecting allergens in food. Woodhead Publishing in Food Science and Technology. 348-356
- Takács K., Némedi E., Gelencsér É. (2005): Fehérje és DNS alapú glutén kimutatási módszerek. (Gluténmentes élelmiszerek fogyasztói megítélésének aktuális kérdései” c. tudományos szimpózium – Budapest, 2005. március 9.- eladásainak átdolgozott anyaga). Élelmiszer-biztonsági Közlemények II., ISBN 963 7358 08 0: 24-32. p.
- Taylor, S. L., Hefle, S. L. (2001): Food Allergies and Other Food Sensitivities. Food technology. 55 (9): 470-475

Az élelmiszerallergének mérésének lehetőségei ma – kihívások, megoldások, a fejlesztés irányai

Összefoglalás

Az élelmiszerekkel szemben jelentkező túlérzékenységi reakciók (allergia, intolerancia) a népesség egyre növekvő hányadát érintik. Ezen betegségek egyetlen hatékony kezelési módja az érzékenyítő komponensek étrendből történő teljes elhagyása. Az EU jelenleg 14 olyan allergén komponenst tart számon, melyek jelölése kötelező az

élelmiszerek csomagolásán. A szabályozás betartásához megfelelő technológiára és ennek támogatására érvényesített (validált) analitikai módszerekre van szükség. Napjainkban az allergének mérésére az immunanalitikai módszerek (ELISA, LFD) a legelterjedtebbek. Ezen módszerek fejlesztése és validálása több nehézségbe ütközik. A reakciót kiváltó fehérjék összetétele nem minden esetben ismert, valamint nem állnak rendelkezésre sem referencia-anyagok, sem referencia-módszerek. Emellett a feldolgozási folyamat hatásait is meg kell ismerni és figyelembe kell venni. A problémamegoldás egyik iránya allergén fehérjét deklarált mennyiségben tartalmazó feldolgozott élelmiszer-mátrix fejlesztése, mely kutatásaink egyik fő célja. Siker esetén a mintamátrix referencia-anyagként is használható, melynek segítségével lehetőség nyílik a feldolgozási folyamat hatásainak vizsgálatára, valamint a kereskedelmi forgalomban kapható ELISA tesztek összehasonlító elemzésére is.

Possibilities of Allergen Analysis at Present – Challenges, Solutions and Directions of Development

Abstract

Hypersensitivity reactions (allergy and intolerance) triggered by certain food proteins affect an increasing rate of population. The only effective treatment of these illnesses is the total avoidance of the problematic proteins from patient's diet. At the moment the labelling regulations of European Union defines 14 foodstuffs or components which are responsible for the highest number of these cases. In order to comply the regulation, right technological solutions and validated analytical methods are needed. At present, the most commonly used methods in allergen analysis are immune-analytical based ELISA or LFD kits. The development and validation of these methods cause many challenges. The compositions of allergenic proteins are not well-defined, furthermore neither reference materials nor reference methods exist. Finally the effects of food processing steps on the allergenic proteins and the results of the analytical methods are not described well. One direction towards overtaking the problems is the development of incurred real food matrices which contains dedicated amount of allergenic protein, which was the main goal of this work. These model matrices can be used as incurred reference material (IRM) and opened the door to investigate the influence of food processing. Reference material also give the opportunity to make a comparative study of ELISA kits and other analytical methods.