



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

Gluténanalitikai módszerek validálásának fejlesztése referenciaanyag-jelölt modelltermék tulajdonságainak vizsgálatával

Készítette:

Langó Tamás
Biomérnök hallgató (MSc)

Témavezető:

Dr. Tömösközi Sándor
Egyetemi docens

Konzulensek:

Kormosné Bugyi Zsuzsanna
PhD hallgató
Török Kitti
PhD hallgató

Budapest, 2011

Tartalomjegyzék

1	Köszönetnyilvánítás.....	4
2	Rövidítések jegyzéke	5
3	Bevezetés	6
4	Irodalmi áttekintés.....	9
4.1	Az allergiáról általánosságban.....	9
4.2	Élelmiszerekkel szemben jelentkező túlérzékenységi reakciók	9
4.2.1	Immunmediált reakciók (Élelmiszerallergia)	10
4.2.2	Nem-immunmediált reakciók (Élelmiszer intolerancia)	12
4.3	Búzafehérjék fogyasztásával összefüggő rendellenességek	12
4.3.1	Búzaallergia.....	12
4.3.2	Cöliákia	12
4.4	Jogi szabályozás	13
4.5	A búza fehérje összetétele és az adott fehérjecsoportok túlérzékenységi tünetekért felelős epitópjai	15
4.5.1	A búzafehérjék csoportosítása.....	16
4.5.2	A különböző búza variánsokból származó fehérjefrakciók és azok hatása az allergenitásra	18
4.5.3	A rendellenességeket kiváltó- fehérjék epitópjai, és a hozzájuk kötődő antitestek.	19
4.6	Túlérzékenységet kiváltó élelmiszerkomponensek analitikai meghatározása	22
4.6.1	Fehérje-meghatározáson alapuló módszerek	24
4.6.1.1	Immunanalitikai módszerek	24
4.6.1.1.1	ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) módszer	24
4.6.1.1.2	Lateral Flow Device	29
4.6.1.1.3	Immunoblotting	29
4.6.1.1.4	RAST/EAST inhibíció.....	30
4.6.1.1.5	Rakéta immunoelktroforézis	30
4.6.1.1.6	Kettős immundiffúzió (Ouchterlony módszer).....	30
4.6.1.2	MS alapú fehérje meghatározási technikák	31
4.6.2	DNS meghatározáson alapuló módszerek.....	31
4.6.3	Specifikus problémák az allergénanalitika területén.....	31
4.6.3.1	Epitópok és az ezekre specifikus antitestek változatossága.....	32
4.6.3.2	Élelmiszer feldolgozás hatásai az allergenitást kiváltó komponensekre	33
4.6.3.2.1	Hőkezelés.....	34
4.6.3.2.2	Proteolitikus kezelés	35
4.6.3.2.3	Sugárzás	36
4.6.3.2.4	Genetikai módosítás	36
4.6.3.2.5	Élelmiszermátrixok hatása. Kölcsönhatás más élelmiszer-összetevőkkel	36
4.6.4	A validálás és annak hiányosságai az allergénanalitikában	37
4.7	Az immunanalitikai problémák részleges megoldására a tanszéken végzett korábbi kutatómunka ismertetése	38
4.7.1	A vizsgálataimhoz szükséges korábbi eredmények összegzése.....	39
4.8	A korábbi kutatómunka folytatása, célkitűzések.....	41
5	Anyagok és módszerek	42
5.1	Kísérletterv	42
5.2	A modelltermék.....	45
5.2.1	A modelltermék elkészítéséhez szükséges hozzávalók.....	45

5.2.2	A modelltermék készítéshez szükséges gliadin forrás előkészítése	45
5.2.3	A modelltermék előállításához szükséges eszközök	46
5.2.4	A modelltermékek készítésének módszere	46
5.3	Mintaelőkészítés	47
5.3.1	A mintaelőkészítéshez használt eszközök	47
5.3.2	Mintaelőkészítés a RIDASCREEN Gliadin teszt kit alapján	48
5.3.3	Mintaelőkészítés az AgraQuant Gluten teszt kit alapján	48
5.4	ELISA mérések	49
5.4.1	Az ELISA mérésnél használt eszközök	49
5.4.2	A RIDASCREEN Gliadin teszt elvégzésének a lépései	49
5.4.3	Az AgraQuant Gluten teszt elvégzésének a lépései	50
5.5	Az eredmények statisztikai értékelésének a módszere	51
6	Eredmények és értékelés	53
6.1	A gliadin izolátummal készült termék stabilitásának vizsgálata	53
6.2	Komplex fehérje forrással készült referenciaanyag-jelölt modelltermék fejlesztése	57
6.2.1	A kívánt gliadin koncentráció eléréséhez szükséges liszt mennyiség kiszámításának módszere	57
6.2.2	Az alapanyagok gluténmentességének igazolása	57
6.2.3	A komplex fehérje forrással készült modelltermékek homogenitásának vizsgálata	59
6.2.4	A gliadin visszanyerésének megbízhatósága a modelltermékből	61
6.2.5	A standard liszttel készült modelltermék gliadintartalmának stabilitás-vizsgálata	63
6.2.6	A feldolgozási folyamatok egyes lépéseinek a mérhető gliadin tartalomra gyakorolt hatásának szemléltetése	66
6.3	Gliadin forrás hatásának vizsgálata a mérhető gliadin tartalomra	69
6.4	A kétféle ELISA kit által szolgáltatott azonos mintára vonatkozó eredmények összevetése	71
6.5	Konklúzió	72
7	Összefoglalás	74
8	Irodalomjegyzék	76
9	Mellékletek	81

1 Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Tömösközi Sándornak, hogy kiváló szaktudásával, szemlélet módjának és logikájának átadásával segítette munkámat.

Külön köszönet illeti Kormosné Bugyi Zsuzsanna, PhD és Török Kitti, PhD hallgatókat, akik mind a mérések során, mind az értékelésnél segítségemre voltak.

Köszönöm továbbá Hajas Livia, MsC és Horváth Ágnes, BsC hallgatóknak, hogy a mérések kivitelezésénél segítségemre voltak.

Köszönöm a MoniQA (Monitoring Quality and Assurance in the Food Supply Chain FOOD-CT-2006-036337) nemzetközi EU Kiválóságghálózat kísérleteimhez nyújtott szakmai és anyagi segítségét.

2 Rövidítések jegyzéke

AOAC (Association of Official Analytical Chemists) - Analitikai Kémikusok Nemzetközi Szervezete

EAACI (European Academy of Allergy and Clinical Immunology) - Európai Allergiológiai és Klinikai Immunológiai Akadémia

EAST (Enzyme allergosorbent test) - Enzim-allergoszorbens teszt

EFSA (European Food Safety Authority) - Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) - Enzim-kapcsolt immunszorbens vizsgálat

HMBA (4-Hydroxythylbenzoic acid) - 4-hidroxi-benzoészav

HMW-GS (High Molecular Weight Glutenin Subunits) - Nagy molekulatömegű glutenin alegység

IEF (Isoelectric focusing) - Izoelektromos fókuszálás

LC/ESI/MS (liquid chromatography/electrospray ionization/mass spectrometry) - folyadékkromatográfia/electrospray ionizáció/tömegspektrometria

LFD (Lateral Flow Device) - Immunkromatográfiás tesztek

LMW-GS (Low Molecular Weight Glutenin Subunits) - Alacsony molekulatömegű glutenin alegység

MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) - Mátrixhoz kötött lézer deszorpciós ionizáció

MALDI-TOF/MS (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight/mass spectrometry) - Mátrixhoz kötött lézer deszorpciós ionizáció/repülési idő/tömegspektrometria

MoniQA NoE (Monitoring Quality and Assurance in the Food Supply Chain Network of Excellence)

MS (Mass Spectrometry) - Tömegspektrometria

NMR (Nuclear Magnetic Resonance) - Mágneses magrezonancia

PCR (Polymerase Chain Reaction) - Polimeráz láncreakció

RAST (Radioallergosorbent test) - Radioallergoszorbens teszt

RP-HPLC (Reversed-Phased High Performance Liquid Chromatography) - Fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadék-kromatográfia

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamid gelelectrophoresis) - Na-dodecilszulfátos poliakrilamid gélelektroforézis

SPR (Surface Plasmon Resonance) - Felületi plazmon rezonancia

3 Bevezetés

Az élelmiszerek elfogyasztása az emberek túlnyomó többségének nem okoz semmilyen problémát. Ugyanakkor egyes fogyasztói csoportok esetében bizonyos élelmiszer komponensek (néhány kivételtől eltekintve fehérjék) túlérzékenységi reakciót váltanak ki. Az ilyen rendellenességek megjelenése esetén jelenleg nincs megfelelő klinikai kezelés, illetve az adverz reakció kiváltásához szükséges küszöbdózis egyénenként és allergénenként nagyon változó. Így az érintettek számára az egyetlen biztonságos az adott élelmiszer komponens tartalmazó termék elhagyása az étrendből. A jelenleg érvényben lévő EU szabályozás 14 potenciális allergén komponens azonosít, melyek feltüntetése a betegek biztonsága érdekében kötelező az élelmiszerek csomagolásán.

A túlérzékenységi reakciók között – annak előfordulási gyakorisága miatt – kiemelt szerep jut a sikér (glutén) fehérjéknek, amelyek egyes gabonafélék jellegzetes komponensei. A sikérfehérjében szereplő glutenin és gliadin frakciók egyes alegységei felelősek a lisztérzékenység (cöliákia), illetve az egyes gabonafehérje-allergiás tünetek kialakulásáért. A gluténtartalom feltüntetésére a többi allergéntől eltérő szabályozás van érvényben, mely szerint megkülönböztetnek „gluténmentes” illetve „rendkívül kis gluténtartalmú” termékeket, amelyekhez konkrét határértékeket rendelnek.

A szabályozás kézbentartásához megfelelő analitikai módszerek szükségesek. Leggyakrabban immunanalitikai módszereket – ELISA kiteket – alkalmaznak a nagyfokú specifitásuk és érzékenyséjük miatt. Jelenleg azonban a kereskedelmi forgalomban hozzáférhető és ezért rutinszerűen alkalmazott módszerekkel kapott eredmények nem szolgáltatnak élelmiszerbiztonsági szempontból kielégítő információt.

Ennek oka, egyrészt, hogy a túlérzékenységi reakciókat kiváltó toxikus epitópok nem pontosan ismertek. Így az immunanalitikai módszereknél alkalmazott különböző antitestek nem feltétlenül a toxikus epitóppal, hanem a feltételezett allergenitásért felelős fehérjefrakció alegységeinek egy bizonyos részszekvenciájával reagálnak. Így csak közvetett toxikus fehérjetartalom meghatározására alkalmasak és nem a valódi toxicitás mértékét jellemzik. Emellett az egyes kitgyártók más és más epitópokra specifikus antitesteket használnak a kitjeikben, amely nyilvánvalóan befolyásolja az eredményeket, illetve azok megbízhatóságát. Az eredményekre hatással van továbbá az antitest- és a célzott epitóp variabilitása az egyes technikáknál és az egyes termékeknél, amely a módszerek által szolgáltatott eredmények különbözőségét eredményezheti. Másrészt a sikértartalom számításánál alkalmazott összefüggések messze nem tudják figyelembe venni a gliadin/glutenin expresszió során

jelentkező biológiai és környezeti variabilitást, amely igen nagymértékben befolyásolhatja a toxikus alegységek jelenlétét. További probléma, hogy a célmolekula (fehérje epitóp) meghatározására alkalmas referenciaanyag és referenciamódszer nem létezik, így a módszerek érvényesítésének (validálásának) feltételrendszere nem adott. Ezen felül az élelmiszer-feldolgozás technológiai lépése a fehérje denaturációt idézhetnek elő, amely hatással lehet a toxikus alegységek konformációjára, extrahálhatóságára, immunaktivitására, így értelemszerűen az analitikai eredményre is.

A fenti problémák megoldásával számos kutatócsoport foglalkozik, Tanszékünk az EU által létrehozott MoniQA Kiválóság-hálózat munkájához csatlakozott, melyhez TDK dolgozatom témája is kapcsolódik. Munkám során egy korábban kidolgozott referenciaanyag-jelölt modelltermék továbbfejlesztésével foglalkoztam. A fejlesztés során megoldott fő problémák (pl.: fehérje homogén eloszlásának biztosítása) mellett felmerültek más olyan kérdések is, melyek hatással lehetnek a referenciaanyag alkalmazhatóságára, mint például a stabilitás, az alkalmazott glutén eredete, illetve a feldolgozás hatása az analitikai eredményekre.

Ezen szakmai feladatok részbeni megoldásához kívánt hozzájárulni dolgozatom, melynek célkitűzései az alábbiak voltak:

- A korábbi kutatásokban fejlesztett gliadin-izolátumot tartalmazó modelltermék stabilitásvizsgálata.
- Új fejlesztésként a teljes sikefehérje alegység-mintázatot tartalmazó, referencia búzaliszt felhasználásával készült reális modelltermék (a sikért adott mennyiségben tartalmazó sütőipari termék) előállítása és referenciaanyagként történő alkalmazhatóságának tanulmányozása.
- A feldolgozás analitikai eredményekben jelentkező hatásának meghatározása az előállítási folyamat minden lépésénél, így az alapanyag keverékekből, a tésztából és a süteményből vett minták analízisével.
- A piacon hozzáférhető immunanalitikai tesztekkel kapott eredmények összehasonlítása, az eltérések értelmezése. Munkámban modellként azon két gyártó tesztjét alkalmaztam, melyek eredményei a korábbi vizsgálatokban a legnagyobb eltérést mutatták.
- Az eredmények komplex értékelése és értelmezése.

Kutatómunkám egy hosszabb, öt éves, sokszereplős fejlesztési tevékenység része. Így értelemszerűen nem végeredményeket tartalmaz, dolgozatomban az eddig elért eredményeket igyekszik összegezni.

4 Irodalmi áttekintés

4.1 Az allergiáról általánosságban

Az allergia az immunrendszer egy túlzott reakciója olyan anyagokra, melyek normál esetben semmilyen választ nem váltanak ki a szervezetben. Az ilyen anyagokat allergéneknek nevezzük. Allergén lehet például a pollen, állati szőrök, atka, penészspórák, különböző állatok mérgei, mikroorganizmusok, élelmiszerek, gyógyszerek, vegyszerek, nehézfémek, stb [1].

Az allergének által kiváltott adverz (nem várt) reakciók a népesség egyre nagyobb százalékát érintik. A növekvő tendencia egyértelműen jelzi a probléma aktualitását, fontosságát.

Az allergénnel szembeni nem várt reakciók felnőttkorban is előfordulhatnak, de bizonyított tény, hogy gyermekkorban gyakoribb.

Az élelmiszerek által kiváltott túlérzékenységi reakciók (amelyeknek részhalmaza az élelmiszerallergia) kiemelt fontosságúak [2].

4.2 Élelmiszerekkel szemben jelentkező túlérzékenységi reakciók

Az emberek többségének egy adott élelmiszer elfogyasztása nem okoz egészségügyi problémát. Viszont vannak olyan személyek, akiknél az élelmiszereknek egy adott komponense (néhány kivételtől eltekintve fehérjéje) túlérzékenységi reakciót vált ki. Ezeket az élelmiszerekkel szembeni adverz reakciókat 1995-ben az EAACI patomechanizmusuk alapján osztályozta (1. ábra) [3,4,5].



1. ábra: Adverz reakciók csoportosítása

Az élelmiszerek által kiváltott túlérzékenységi reakciók 2 csoportra oszthatók: toxikus és nem toxikus reakciókra. A toxikus reakció mindenkinél jelentkezik, aki az adott termékből fogyaszt, míg a nem toxikus reakció csak az adott élelmiszer komponensre érzékenyeknél nyilvánul meg. Az utóbbi lehet immunmediált és nem-immunmediált.

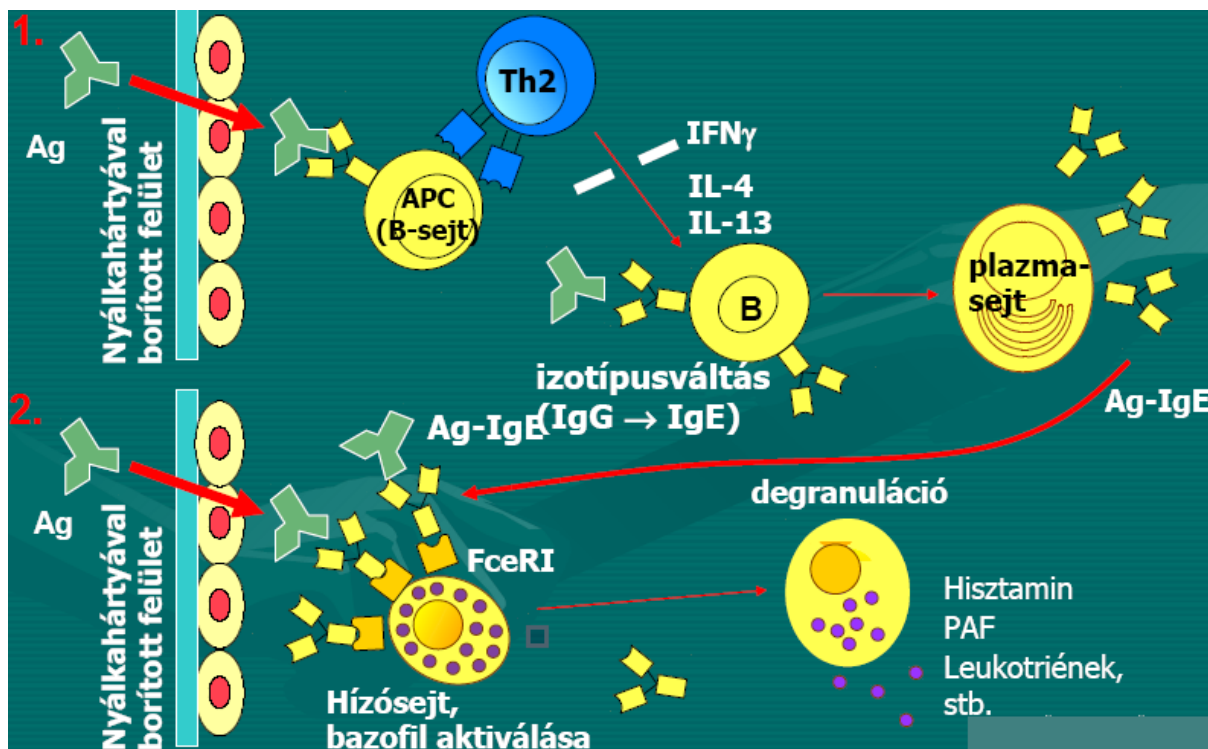
Az élelmiszerallergia immunmediált, immunoglobulinokkal illetve nyiroksejtekkel összefüggő immunválaszt jelent. Ezen belül is megkülönböztetünk két típust, melyek az immunválasz természetétől függően az azonnali és késleltetett reakciók csoportjaiba sorolhatók. Az azonnali reakciókért a humorális immunrendszer a felelős, melynél a reakcióra adott válaszkor allergén-specifikus immunglobulin E (IgE) antitestek termelődnek (IgE-mediált reakciók), a késleltetett reakciók a sejtes immunrendszer rendellenes válaszát jelentik érzékenyített T-sejtek megjelenésével (nem-IgE-mediált reakciók).

A nem-immunmediált reakciókat vagy élelmiszer intoleranciákat okozhatja valamely élelmiszer komponens lebontásához szükséges enzim(ek) hiánya, egy adott gyógyszer hatóanyag (farmakológiai), illetve egyéb nem ismert tényező [4,5,6,7].

4.2.1 Immunmediált reakciók (Élelmiszerallergia)

Az immunrendszer indukálta reakciók között megkülönböztetnek IgE-mediált és sejtmediált reakciókat.

Az IgE-mediált reakciónál a szervezetbe bejutó allergén az arra érzékeny egyénnél ellenanyag termelést indít be. Ezek a specifikus IgE ellenanyagok a kötőszövetben, a bőrben, a légutakban és a bélben lévő hízósejtek, illetve a vérben lévő bazofil sejtek felszínére kötődnek (ezek a sejtek nagy mennyiségben tartalmaznak olyan molekulákat, amelyek az allergiás tünetek kialakulásában szerepet játszanak). Ez az érzékenyítés folyamata, amely nem okoz panaszt a betegnek. Amikor az allergén anyag ismételten a szervezetbe jut, a hízósejtek illetve bazofil sejtek felszínén előzetesen lekötött ellenanyagokkal kapcsolatba lép és keresztkötés alakul ki. Ezzel stimulálja az allergiás válasz közvetítőinek kibocsátását a szövetekbe és a vérbe. Ilyen felszabadult mediátorok például a hisztamin, a leukotriének és a prosztaglandinok (2. ábra). IgE-mediált reakció következik be például a gabonaallergiában szenvedők esetében [8,9].



2. ábra: IgE-mediált reakció folyamata [8,10]

A nem IgE–mediált (sejtmédiált) allergiás reakciók bizonyos élelmiszerek elfogyasztása után 6-24 órával jelentkeznek. A sejtmembránban jelenlévő prekuzormolekulákból a foszfolipáz A2 hatására lipid mediátorok jönnek létre, melyek a folyamat kulcsszereplői. Az aktivált hízósejtek a folyamat során citokineket termelnek, melyek egy része gyulladásokeltő. Számos sejtfeleséget toboroznak a reakció színhelyére, és szövetkárosító folyamatokat indítanak el. Ilyen például az élelmiszer fehérje által indukált enterocolitis [2,10,11].

A fogékonyságot ezekre és más egyéb allergiás betegségekre, atópiának nevezzük, mely születési rendellenességet, hajlamot jelent. Az atópiás egyéneknél az allergiás betegség kifejlődéshez azonban számos külső (pl.: környezeti) és belső (pl.: genetikai, immunrendszeri) tényező is szükséges [9].

A kritikus élelmiszer fehérjék hatására létrejövő tünetek változatosak lehetnek: légzőszervi, emésztőszervi, bőr, kardiovaszkuláris problémák jelentkezhetnek. Súlyosabb esetekben a reakció nem marad lokalizált és az egész szervezetre kiterjed, anafilaxiát okoz. A küszöbdózis, az a legkisebb mennyiség, mely aktiválja az adverz reakciót, mind az egyes allergén komponensek, mind az érintett személyek esetében rendkívül változó lehet [5,7].

Tehát a betegek számára az egyetlen univerzális megoldás az adott élelmiszer komponenst tartalmazó termékek elhagyása az étrendből [5].

4.2.2 Nem-immunmediált reakciók (Élelmiszer intolerancia)

Az intoleranciák az anyagcserezavarokként, anafilaxiás reakciókként és egyéni, nem szokványos (idioszinkratikus) reakciókként nyilvánulnak meg. Tüneteinek megjelenése általában hosszabb ideig tart, valamint haspuffadás, hasmenés vagy székrekedés formájában nyilvánul meg. Az ételintolerancia egy fajtája például a laktózintolerancia, mely azoknál az egyéneknél nyilvánul meg, akik nem rendelkeznek a tejcukor lebontásáért felelős laktáz nevű emésztőenzimmel [8,12].

4.3 Búzafehérjék fogyasztásával összefüggő rendellenességek

A Codex Alimentarius, a nemzetközi élelmiszerkönyv, mely általános és speciális élelmiszerbiztonsági szabványok sorozatát foglalja magába. A Codex Alimentarius Bizottság szerint a búza az élelmiszerallergiás megbetegedések egy jelentős részéért felelős. A búzával szemben jelentkező két leggyakoribb betegség a búzaallergia illetve a cöliákia [13,14].

4.3.1 Búzaallergia

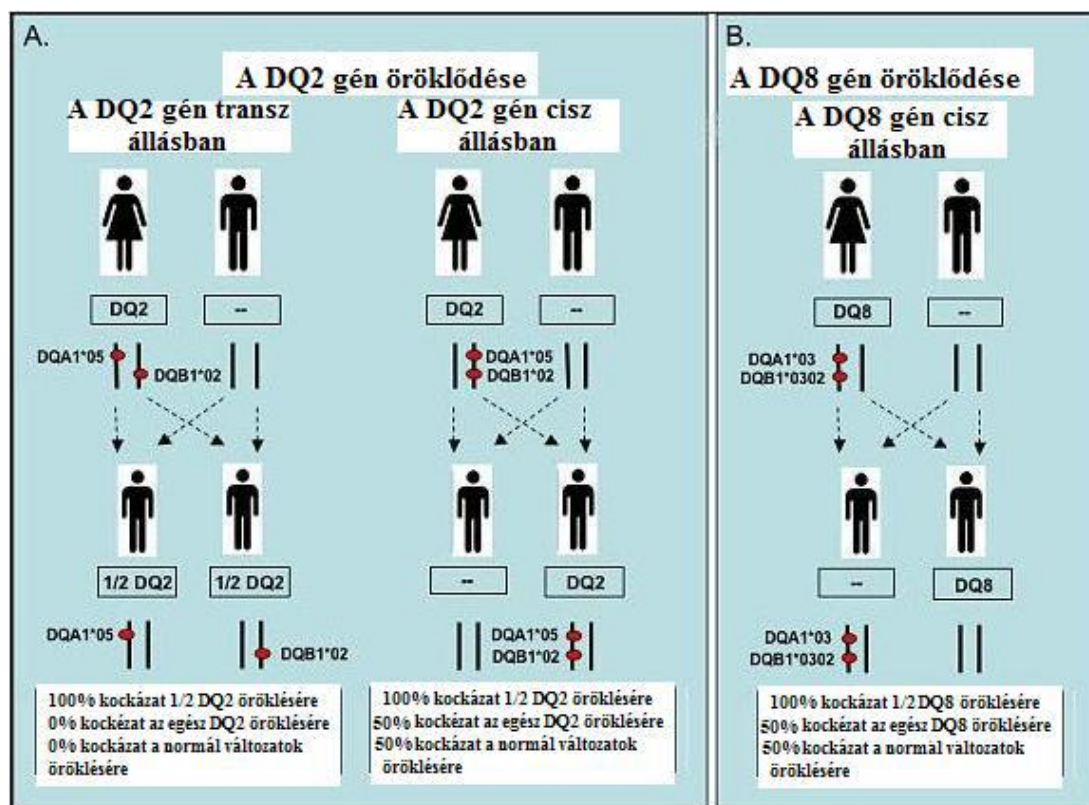
Általánosságban elmondható, hogy a búza allergia előfordulása a gyerekeknél és a csecsemőknél a leggyakoribb [15]. Az allergiás reakció mechanizmusa lehet IgE-mediált és lehet sejtmediált, melyeket a reakciók időlefutása jellemez az allergén fehérjével történő érintkezés után. A különböző búzafehérje frakciók mindegyikében található olyan fehérje, amely a búzaallergiát kiválthatja. Egyéb gabonafélék (pl.: rozs, árpa, zab, stb.) fogyasztása is okozhat ilyen adverz folyamatot, mivel szerkezetileg rokon fehérjerészeket tartalmaznak [16,17].

Az azonnali reakciót a következő tünetek egyike vagy több együttese jellemzi: csalánkiütés és/vagy angioödéma, hányinger, hányás, hasmenés, rhinitis (orrműnyálkahártya gyulladása), asztma, tüdőelzáródás, anafilaxia. A késleltetett reakciók jellemző tünetei többnyire ekcéma, bőrviszketés, bőrvörösség és laza széklet vagy hasmenés [13,14].

4.3.2 Cöliákia

A cöliákia (vagy gluténszenzitív enteropátia, illetve nontropical sprue) autoimmun betegség. Olyan rendellenesség, amely a táplálék gluténtartalmával szembeni állandó érzékenység (ún. lisztérzékenység) okoz. A betegségre jellemző, hogy az immunrendszer saját sejtjei, fehérjei (transzglutamináz-2) ellen támad, azokat véli betolakodóknak. A bélhám szöveteiben lévő transzglutamináz antigénné válik, immunfolyamatok hatására önfelszámolási folyamat alatt a vékonybélbolyhok szerkezetileg átalakulnak, részlegesen elsorvad a vékonybél nyálkahártyája, a bél nem képes megfelelően ellátni feladatát,

felszívódási problémák lépnek fel [16]. Megállapították, hogy a HLA-DQ2 és HLA-DQ8 gének genetikai kockázati faktora a betegségnek (3. ábra). Azonban nem minden ember szenved cöliákiában azok közül, akiknél ezek a gének expresszálódtak. Más genetikai és környezeti faktork is szerepet játszanak a betegség kialakulásában, mint például az emésztőrendszeri zavarok és a stressz [18,20,21,22].



3. ábra: A DQ2 és DQ8 génnel összefüggésben lévő cöliákiára való hajlam öröklődése családonál, ahol az egyik szülő cöliákiára fogékony HLA halotípus, a másik pedig nem [19]

Hasi görcs, puffadás és felfúvódás, hasmenés, súlyvesztés, hányás és általános soványság a cöliákia leggyakoribb tünetei. Jelenleg az egyetlen kezelési módja a glutén tartamú ételek mellőzése az étrendből.

A búzaallergia és a cöliákia kiváltásáért a prolaminek és glutelinek különböző fehérje epitópjai felelősek. Ezekben a frakciókban jelenlévő különböző molekulatömegű és szerkezetű fehérjék az arra genetikailag hajlamos személyeknél túlérzékenységi reakciót eredményezhetnek. A részletesebb tárgyalásukról később lesz szó.

4.4 Jogi szabályozás

Az allergiában vagy intoleranciában szenvedő betegeknek száműzniük kell az érzékenyítő élelmiszert teljes, természetes formájukban, azonban nem lehetnek biztosak benne, hogy ezen allergén fehérjék nem jelennek meg néhány előre elkészített ételben. A fogyasztók egészségvédelme, továbbá információhoz való joguk érdekében az EU

törvénymódosítást rendelt el. A potenciális allergénként számon tartott élelmiszerkomponensek érthető feltűntetése kötelező az élelmiszerek csomagolásán.

2008. január 31-én az Európai Bizottság egyértelműbb és a fogyasztók igényeinek jobban megfelelő élelmiszer-címkézési gyakorlatra vonatkozó javaslatot fogadott el, melynek hazai megvalósítása a 40/2008. (IV. 3.) FVM-SZMM együttes rendelet lett. A 19/2004. (II. 26.) FVM-ESzCsM-GKM együttes rendelet 4. számú melléklete tartalmazza az allergén összetevők pontos és részletes listáját, amelyeket jelölni kell. A következő 14 élelmiszercsoportra vonatkozik:

1. Glutént tartalmazó gabona (búza, rozs, árpa, zab, tönköly, kamut-búza vagy ezek hibrid változatai) és azokból készült termékek, kivéve
 - a) búzából készült glükózsirup, beleértve a dextrózt is(*),
 - b) búzából készült maltodextrin(*),
 - c) árpából készült glükózsirup,
 - d) gabonafélék, amelyből készült párlatot vagy mezőgazdasági eredetű etilalkoholt szeszes italok vagy egyéb alkoholtartalmú italok készítéséhez használják.
2. Rákfélék és azokból készült termékek.
3. Tojás és abból készült termékek.
4. Halak és azokból készült termékek, kivéve
 - a) vitaminok vagy karotinoidok hordozójaként használt halenyv,
 - b) a sör és a bor derítéséhez használt halenyv és vizahólyag.
5. Földimogyoró és abból készült termékek.
6. Szójabab és abból készült termékek, kivéve
 - a) finomított szójabab olaj és zsír(*),
 - b) szójababból származó természetes vegyes tokoferolok (E 306), természetes D-alfa tokoferol, természetes D-alfa tokoferol-acetát, természetes D-alfa tokoferol szukcinát,
 - c) a szójabab növényi olajából nyert fitoszterolok és fitoszterol észterek,
 - d) a szójabab növényi olajából nyert szterolokból előállított fitosztanol-észter.
7. Tej és abból készült termékek (beleértve a laktózt is), kivéve
 - a) tejsavó, amelyből készült párlatot vagy mezőgazdasági eredetű etilalkoholt szeszes italok vagy egyéb alkoholtartalmú italok készítéséhez használják,
 - b) laktit.
8. Diófélék, azaz mandula (*Amygdalus communis* L.), mogyoró (*Corylus avellana*), dió (*Juglans regia*), kesudió (*Anacardium occidentale*), pekándió [*Carya illinoensis*]

(Wangenh.) K. Koch], brazil dió (Bertholletia excelsa), pisztácia (Pistacia vera), makadámia és queenslandi dió (Macadamia ternifolia) és azokból készült termékek, kivéve

a) diófélék, amelyből készült párlatot vagy mezőgazdasági eredetű etilalkoholt szeszes italok vagy egyéb alkoholtartalmú italok készítéséhez használják.

9. Zeller és abból készült termékek.

10. Mustár és abból készült termékek.

11. Szezámag és abból készült termékek.

12. Kén-dioxid és SO₂-ban kifejezett szulfítok 10 mg/kg, illetve 10 mg/liter koncentrációt meghaladó mennyiségben.

13. Csillagfürt és abból készült termékek.

14. Puhatestűek és abból készült termékek [23].

(*) és az abból készült termékek, amennyiben az előállítási eljárás során várhatóan nem növekszik az előállítás alapjául szolgáló termék EFSA által megállapított „allergén aktivitása”.

A Glutén tartalom feltüntetésével kapcsolatos további szabályozás a nemzetközi Codex Alimentarius 118-1979 standard. E szerint gluténmentesnek tekinthető a termék, ha gluténtartalma nem haladja meg a 20 ppm-et. A rendelet alapján a lisztérzékenységben szenvedőknek szánt élelmiszerek, amelyek búzából, rozsból, árpából, zabból vagy ezeknek a gluténcsökkentés céljából feldolgozott keresztezett változataiból készültek, a fogyasztó számára értékesített élelmiszerben nem tartalmazhatnak 100 ppm mennyiséget meghaladó glutént („rendkívül kis gluténtartalmú”). A Codex Alimentarius glutén meghatározásra immunológiai alapú módszert javasol, az ELISA-t [24].

Hazánkban az Európai Unió 41/2009/EK bizottsági rendelete a gluténmentes termékekre vonatkozó új, kétlépcsős címkézési szabályokkal már életbe lépett, de a gyártási technológiák és csomagolóanyagok átalakítása miatt 2012. január elsejétől kell kötelezően betartani [25].

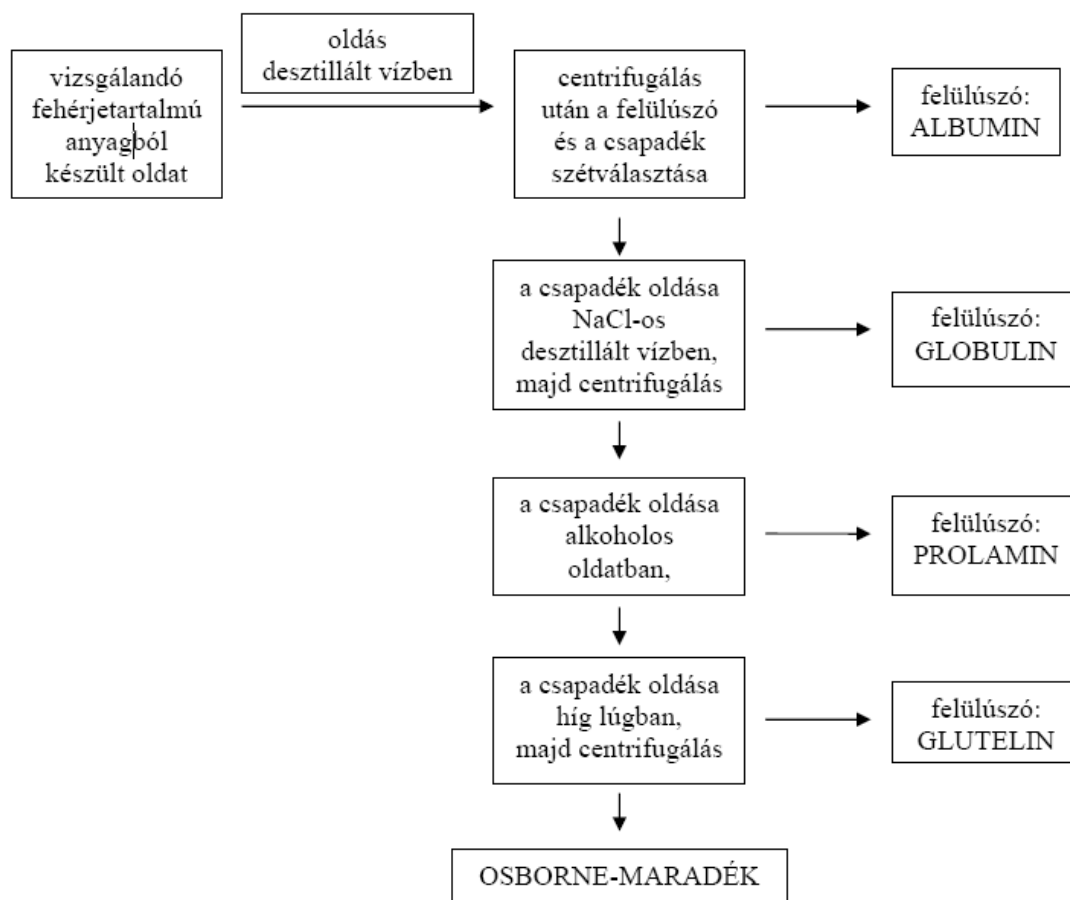
4.5 A búza fehérje összetétele és az adott fehérjecsoportok túlérzékenységi tünetekért felelős epitópjai

Az allergiás tünetek kiváltásáért elsősorban nem a teljes allergénfehérje-tartalom felelős, hanem annak bizonyos alegységei, amelyeket epitópoknak nevezünk. Ezek az antigén (allergén) molekulának azon minimális molekuláris struktúrái, amelyekkel az arra specifikus

antitest reagál, így az antigén-antitest komplex létrejön [26]. A búza fehérjéinek csoportosítása, illetve a túlérzékenységi reakciók szempontjából fontosabb fehérje alegységek, építópok ismertetése a következő alfejezetekben található.

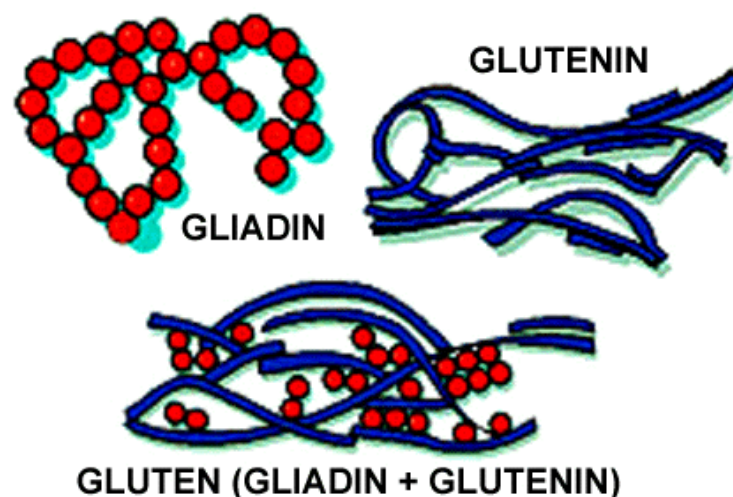
4.5.1 A búzafehérjék csoportosítása

A búza fehérjéinek leggyakoribb csoportosítása az Osborne- féle oldószeres frakcionáláson alapul (4. ábra), miszerint a vízoldható komponenseket albuminnak, a só-oldhatókat globulinnak, az alkohol-oldhatókat prolaminnak (gliadin) és a híg lúgban oldhatókat glutenin frakciónak nevezzük [17].



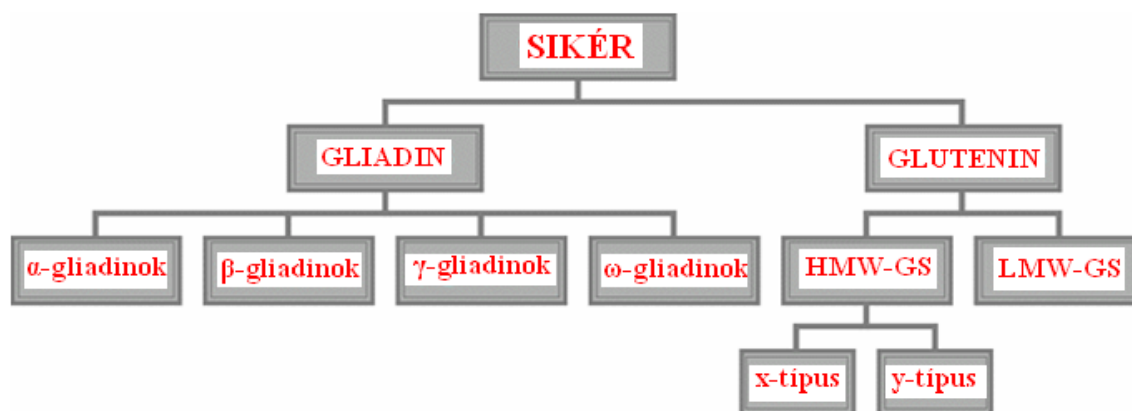
4. ábra: Osborne frakcionálás menete [17]

Az összfehérje tartalom megközelítőleg 20-25 %-át a metabolikusan aktív albumin és globulin fehérjék teszik ki, a többi részét a tartalékfehérjék, a gliadin és glutenin alkotják. Ez a két, vízben nem oldódó frakció víz hozzáadásával alkotja a sikért (5. ábra) [27,28].



5. ábra: Sikér szerkezet [27]

A sikért alkotó fehérjék további alegységekre bonthatók az elektroforetikus mobilitásuk alapján (6. ábra) [27,28].



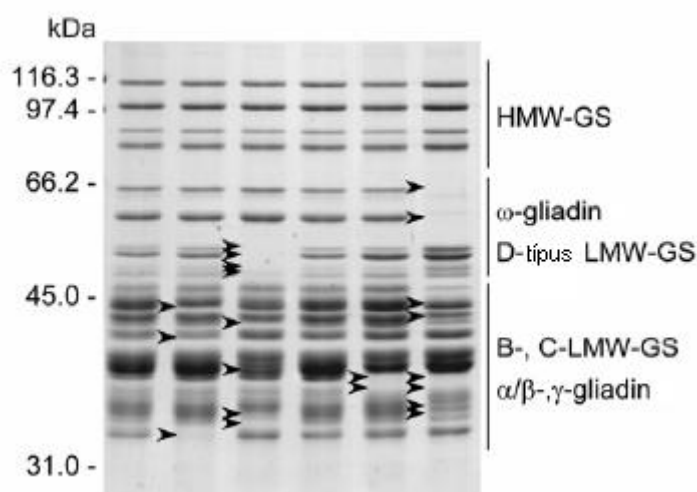
6. ábra: A gliadinok és glutelinek további csoportosítása [27]

A gliadinok a sikér kis molekulatömegű komplexét alkotják, monomer fehérjék, egyetlen polipeptid láncból állnak. Savas poliakrilamid gélen történő elektroforetikus mobilitásuk alapján a monomer gliadinokat négy csoportra osztják: az ω - gliadinok mozgékonyasága a legkisebb, őket követik a γ -gliadinok, majd a β - és az α - gliadinok.

Az α -, β - és γ -gliadinokra jellemző, hogy tömegük általában a 30-40 kD tartományba esik. A frakciók aminosavösszetétele nagy hasonlóságot mutat, általában nagy mennyiségű (30-40 %) monoaminodikarbonsavat tartalmaznak (glutaminsav, aszparaginsav) és a hidrofób oldalláncú aminosavak jelenléte is jelentős (alanin, valin, leucin, izoleucin, fenilalanin), emellett bázikus aminosavak (hisztidin, arginin) is találhatóak bennük. Két limitáló aminosavat tartalmaznak, a lizint és a kéntartalmú metionint. Ezen gliadin fehérjék szerkezetére az intramolekuláris diszulfidkötések jellemzők. Ezekről a tulajdonságokról jelentős eltérést

mutatnak az ω -frakciók. Ezek tömege elérheti a 80 kD-t is, igen kevés cisztein és minimális metionin tartalmuk miatt, a többi frakcióval ellentétben, nem alakítanak ki diszulfid hidakat, kénben szegény gliadinoknak is nevezik őket. Az ω -gliadinok az összes gliadinok 20 %-át teszik csak ki [30,31].

A glutenin alegységekre jellemző egyedi tulajdonság, hogy diszulfidkötéssel képesek egymáshoz kapcsolódni (intermolekuláris kötések). Az S-S kötések redukcióval történő bontása után a glutenin alegységek 4 csoportra oszthatók SDS-PAGE-en történő elektroforetikus mobilitásuk alapján (A-, B-, C- és D-csoport). Az A csoport (80-120 kDa) tartalmazza a nagy molekulatömegű glutenin alegységeket (HMW-GS). A B- (42-51 kDa) és C-csoport (30-40 kDa) foglalja magába a kis molekulatömegű glutenin alegységeket (LMW-GS), melyek molekulatömege és szerkezete is az α -, β - és γ -gliadinokéra emlékeztet. Végezetül a D-csoport (65-70 kDa) szintén LMW glutenin alegységeket tartalmaz, melyek az ω -gliadinokkal mutatnak rokonságot [30,31]. A sikér fehérjéinek gélelektroforetikus futtatása a 7. ábrán látható.



7. ábra: Sikér fehérjék redukált alegységeinek SDS gélelektroforézise [29]

4.5.2 A különböző búza variánsokból származó fehérjefrakciók és azok hatása az allergenitásra

Az irodalmi adatok szerint a búzával kapcsolatos túlérzékenységi reakciók döntő többsége a sikért alkotó fehérjék jelenlététől függ. Azoknak is csak bizonyos alegységeik felelősek a túlérzékenységi tünetekért, ilyen például α -, ω -gliadinok, és az LMW glutenin alegységek. A különféle búzafajták eltérő sikértartalommal és sikér összetétellel rendelkezhetnek, így az allergiás tünetek kockázata eltérő lehet [32,33].

A potenciálisan toxikus fehérjék jelenlétére végzett kísérletek során összehasonlító vizsgálatokat végeztek a sikértartalomra különböző búzafélékből. A vizsgált búza típusok:

tönkölybúza, durumbúza, kétszemű búza, egyszemű búza, őszi búza, tavaszi búza és tritikálé (búza rozs hibrid) voltak. Ezek lisztjéből extrahálták a glutént és az extrakciós oldatot SDS-gélelektroforézissel és RP-HPLC-vel is vizsgálták. A kapott kromatogramokból az egyes frakciók százalékos arányára következtettek, ezeket tartalmazza az alábbi táblázat [34].

	Gliadin				Glutenin			
	Teljes gliadin arány (%)	ω -gliadin(%)	α -gliadin(%)	γ -gliadin(%)	Teljes glutenin arány (%)	ω b (%)	HMW(%)	LMW(%)
Őszi búza	64,5	9,1	32,3	23,1	35,5	1,3	9,1	25,1
Tavaszi búza	71,6	13,2	28	30,4	28,4	0,8	9,3	18,3
Tritikálé	69,6	14,8	33,7	21,1	30,4	0,9	9,1	20,4
Tönkölybúza	75,3	10	35,7	29,6	24,7	0,4	6,6	17,7
Durumbúza	75,4	6,4	39	30	24,6	0,3	5	19,3
kétszemű búza	86,8	10,2	45,3	31,3	13,2	0,6	2,6	10
egyszemű búza	76,7	12,3	44,6	19,8	23,3	0,5	3,5	19,3

1. Táblázat: A különböző búza fajok sikérjének összetétele [34]

Az 1. táblázatból látszik, hogy minden fajtánál az α -, γ -gliadinok illetve LMW glutenin alegységek voltak jelen nagy arányban, míg az ω -gliadinok és a HMW glutenin egységek kisebb mennyiségben. Továbbá a közönséges búzáknak volt a legnagyobb a glutenin tartalma, illetve a kétszemű búzában volt a legkevesebb a glutenin. Az α -gliadin tartalom és a gliadin/glutelin arány a kétszemű- és az egyszemű búzáknak volt a legnagyobb. Az utóbbiak és a közönséges búza félék közötti átmenetet a tönköly- és durumbúza képezi. Legnagyobb ω -gliadin tartalma a tritikálénak volt [34].

Mivel az allergiás tünetek kiváltásáért csak bizonyos fehérjefrakciók felelősek (azoknak is csak egy kis részszekvenciája, epitópja), és jól láthatóan jelentős különbségek vannak a különféle búzák siker-összetételében, így eltérő lehet az allergenitásuk [34].

A rozs, az árpa és a zab a búzához hasonlóak, hasonló peptideket expresszálnak, ezért ezek is kiválthatnak hasonló allergiás tüneteket [16].

4.5.3 A rendellenességeket kiváltó- fehérjék epitópjai, és a hozzájuk kötődő antitestek

Az immunogenitás a fehérjék olyan képessége, mely során az élő szervezetbe jutva immunválasz kiváltására képesek, azaz az immunkompetens sejteket aktiválva antigén-specifikus ellenanyag termelést indítanak el. Az immunválaszt kiváltó tulajdonságukat, azaz a fehérjék allergén/antigén jellegét a kémiai szerkezetük határozza meg. Az antigén felületén számos olyan motívum (epitópok, antigéndeterminánsok) található, amelyekhez a különböző antitestek kötődni tudnak. Megkülönböztetünk szekvenciális epitópokat (peptidkötéssel közvetlenül egymáshoz kapcsolt aminosavakból álló rövid lineáris peptidszakasz), illetve

konformációs epitópokat (a fehérje térszerkezetének kialakulása során egymáshoz szorosan asszociálódott aminosavak alakítják ki). Minél több epitóppal rendelkezik a fehérje, annál nagyobb a specifikus reakcióképessége a különböző antitestekkel [16].

A különböző antitestek eltérő epitóp szekvenciákat, konformációkat ismernek fel, illetve bizonyos fehérje alegységekkel keresztreagálhatnak, ha azok teljesen ugyanolyan vagy csak kis mértékben eltérő epitópot tartalmaznak. Az egyes epitóp szekvenciák egyedenként különbözőek lehetnek, ami megnehezíti az allergiás reakciót kiváltó szekvenciák azonosításához használt antitest kiválasztást. A 2. táblázatban található a glutén tesztekhez alkalmas antitestek csoportosítása a reakciópartnereik szerint 5 csoportban.

Antitest	Ref.	Izotípus	Specifitás
Group 1. Selective for α , β and γ -gliadins.			
22123	8F7	1–3	IgG1 α -gliadins and some C-LM _r GS
22205	10D2	2,8	IgG1 β/γ -gliadins and some C-LM _r GS
22722	12G3	1,2,8	IgG1 β -gliadins encoded by several loci
23009	1A5	1–3,8	IgG1 α -gliadins encoded by 6AS, weakly to B- and C- LM _r GS
40406	1B2	2,4,8	IgG1 β and γ -gliadins and some C-LM _r GS
80207	3B5		IgG1 β -gliadins encoded by 1DS, weakly to x-HM _r GS
Group 2. Binds γ , ω -gliadins, cross-react with B-LM _r -GS.			
12208	1A2	1,2	IgG1 cluster of γ -, ω - gliadins, broad B-LM _r GS specificity
12224	1A9	1	IgG1 specific for slow ω -gliadins, broad B-LM _r GS specificity
80818	10F9		IgM fast and slow ω -gliadin, cross-reaction with six B-LM _r GS
Group 3. Bind B-LM _r -GS, cross-react with some gliadins.			
21817	7E8	2	IgG1 1BS fast ω -gliadins, cluster of 3-4 B-LM _r GS of similar Mr
80512	10C2		IgG1 most B- and C-LM _r GS, cross-reacts with α/β , γ - gliadins
81405	5H7	16	IgM 3 major B-LM _r GS, weak cross-reaction with omega-gliadins
82123	5D5	16	IgG3 4 B-LM _r GS, cross-reacts with a few α/β , γ -gliadins
82208	20F6	16	IgG1 most B-LM _r GS, cross-reacts with γ - and slow ω -gliadins
Group 4. Bind HM _r -GS, varying degrees of cross-reaction with LM _r -GS and γ , ω -gliadins ^a .			
23609	3D11	2	IgM γ -/slow and fast ω -gliadins, HM _r GS and B-LM _r GS
23724	4H11	2	IgM γ -/slow and fast ω -gliadins, HM _r GS binding>LM _r GS
30413	1B2	2	IgG1 fast ω -gliadins and HM _r GS.
80105	5F12		IgG1 fast and slow ω -gliadins and HM _r GS
80410	3C11		IgG1 selective γ -HM _r GS, weak cross-reaction β -gliadins
80414	3G4		IgG1 HM _r GS, weak cross-reaction with β -gliadins and 4 B-LM _r GS
80603	3A4		IgM Specific for 1Dx subunits and single B-LM _r GS band, weak cross-reaction with slow ω -gliadins
Group 5. Broad specificity antibodies.			
24311	7C10	2	IgM binds all fractions, but weakest to HM _r GS
24504	4A10	2	IgM equal binding to all fractions
40116	1C9		IgG1 selective for gliadins and LM _r GS, weak HM _r GS binding
41223	1D10		IgG1 binds all fractions except C-LM _r GS, weak α/β -gliadin binding

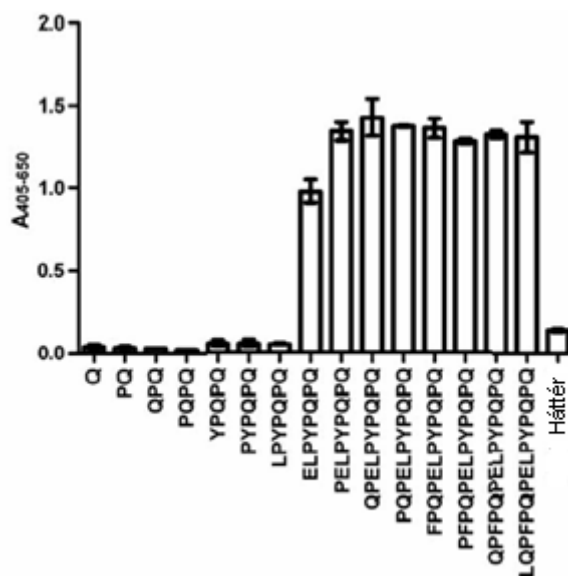
2. Táblázat: A különféle antitestek és reakció partnereik [32]

A 2. táblázatban lévő antitestekkel végzett epitóp térképezések illetve az egyes antitestek által felismert legjelentősebb epitópok (50-100% a kötődési valószínűség az adott epitóphoz) táblázatos összefoglalása a 1. mellékletben található [32]. Az aminosav szekvenciák beazonosításához szükséges aminosav táblázat 2. mellékletben tekinthető meg.

A továbbiakban a cöliakiát kiváltó fehérjeepitópok és más egyéb epitópok térképezésére alkalmas módszer rövid bemutatása következik. A cöliákia indikátora a glutén fő összetevőjére, a gliadinra specifikus antitest jelenléte. Egy tanulmányban monoklonális anti-gliadin antitestet generáltak a gliadin egy megfelelő fragmentjének aminosav sorrendjéből (LQFPQPQLPYPQPQ) és epitóp térképezésre használták [33].

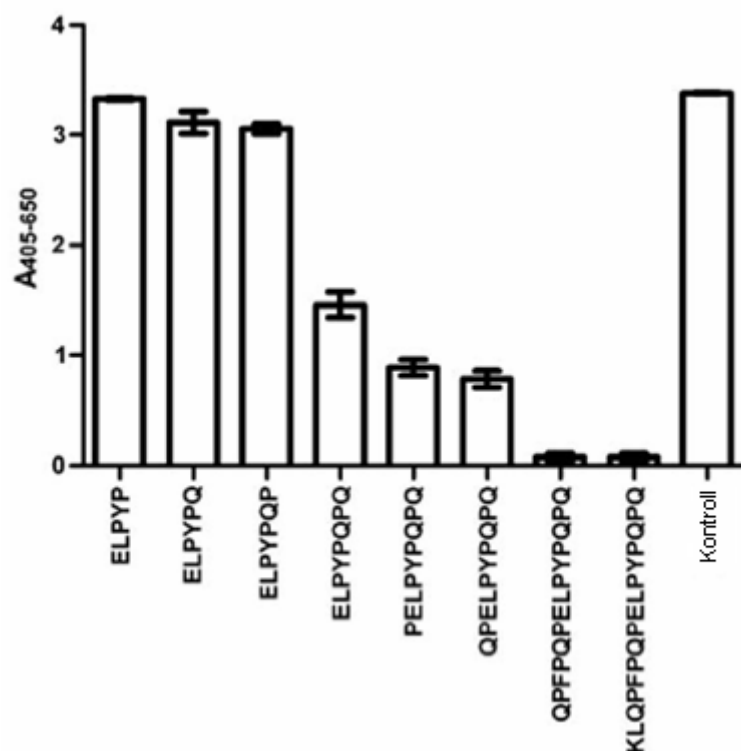
Az N-terminálisról emésztett peptid analógokat gyantához kötötték, hogy meghatározzák azt a minimális peptid hosszt, mely szükséges az antitestnek a felismeréshez. A peptideket saválló HMBA linker segítségével kötötték meg TentaGel gyantán. Ha szükséges, enyhén bázikus körülmények között leválaszthatóak [33].

A 8. ábrán látható az antitest kötődésének mértéke a fokozatosan egy aminosavval rövidülő peptid szekvenciákkal. A legrövidebb szekvencia, amelynél még az antitest kötődése észlelhető az ELPYPQPQ. Az egy aminosavval hosszabb szekvencia (PELPYPQPQ) nagyobb mértékben képez komplexet az antissal, viszont az ennél hosszabb láncoknál a kapott jelre nézve szignifikáns változás nem észlelhető. Ebből az következik, hogy erre a kilenc aminosavból álló epitópra specifikus az antitest.



8. ábra: Antitest kötődésének tesztje [33]

Ezt követően kompetitív ELISA módszeren alapuló vizsgálatokkal is igazolták az adott szekvencia gátló hatását (9. ábra). Az adott szekvenciájú peptideket 1mg/ml koncentrációban adták a reakció elegyhez. Kontrollként inhibitortól mentes oldatot használtak.



9. ábra: Kompetitív ELISA [33]

Látható, hogy PELPYPQPQ szekvencia 74%-ban megkötötte az antitestet, tehát specifitása kétségtelen. Ezzel szemben a 14 aminosavból (QPFPQPELPYPQPQ) álló szekvencia teljes mértékben kötődött az antitesthez. Továbbá az eredmények azt is mutatják, hogy az N-termiálisról emésztett prolin és a C-terminálisról emésztett glutamin esszenciálisak az antitest felismeréshez. Tehát megállapították, hogy a PELPYPQPQ szekvencia immunodomináns szekvencia, mely a gliadin C-terminális végénél található [33].

Összességében elmondható, hogy a búzával kapcsolatos túlérzékenységi reakcióért felelős fehérje epitópok száma rendkívül nagy, továbbá meglehetősen sok különböző variációjuk létezik, amelyek akár ugyanazzal az antitesttel is reagálhatnak (persze eltérő mértékben), komplexet képezhetnek. Az is előfordulhat, hogy többféle fehérjefrakció is tartalmazza ugyanazt a jellegzetes aminosav szekvenciát, konformációt, amit az adott antitest felismer. Az antitestek által felismert szekvenciák ismerete elengedhetetlen az adott antitesttel történő túlérzékenységet kiváltó élelmiszerkomponensek analitikai meghatározásához [33].

4.6 Túlérzékenységet kiváltó élelmiszerkomponensek analitikai meghatározása

A túlérzékenységet kiváltó komponensek minőségi és mennyiségi meghatározására használnak fehérje, illetve adott DNS szakasz (ami az adott fehérjét kódolja) jelenlétének

igazolásán alapuló analitikai módszereket. Ezek a technikák szükségesek a túlérzékenységet kiváltó komponensekre vonatkozó jogi szabályozások betartatására. Jelenleg az élelmiszerallergiában vagy élelmiszerintoleranciában szenvedő személyek számára az egyetlen megoldás az adott élelmiszerkomponenst tartalmazó ételek elhagyása az étrendből. Gyártói oldalról igazolni kell az adott nem várt reakciót kiváltó komponens jelenlétét vagy csökkentett mértékét a termékben, amelyhez megfelelő analitikai módszerekre van szükség [5].

A széles körben alkalmazott analitikai módszerek egyik lehetséges csoportosítása:

I. Fehérje meghatározáson alapuló módszerek

A) Immunanalitikai módszerek

o Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

- Szendvics ELISA
- Kompetitív ELISA

o Lateral Flow Device (LFD)

o Immunoblotting

- IEF-blotting
- SDS-PAGE-blotting
- 2D elektroforézis-blotting
- Dot-blotting
- Szöveti (tissue) blotting

o RAST/EAST inhibíció

o Rakéta immunelektroforézis (RIE)

o Kettős immundiffúzió

B) Bioszenzorok

o Bioszenzor immunoassay-k

o SPR bioszenzorok

C) Kromatográfiás módszerek

o Ioncserés kromatográfia

o Méretkizárásos kromatográfia

o RP-HPLC

- D) Spektrometriás módszerek (kapcsolt technikákkal)
 - o LC/ESI/MS
 - o LC/MS/MS
 - o MALDI-TOF/MS
 - o NMR
- II. DNS meghatározáson alapuló módszerek
 - o PCR
 - o RT-PCR
 - o PCR-ELISA [35]

4.6.1 Fehérje-meghatározáson alapuló módszerek

Ezek a módszerek egy adott minta fehérje tartalmának minőségi és mennyiségi meghatározását teszik lehetővé. Megkülönböztetünk immunanalitikai, elválasztástechnikai és kapcsolt technikákon alapuló fehérje meghatározási módszereket.

4.6.1.1 Immunanalitikai módszerek

Az allergén fehérjék meghatározásához a leggyakrabban immunanalitikai módszereket választanak nagyfokú specifitásuk és érzékenységük miatt mind az iparban, mind hivatalos élelmiszervizsgáló testületek részéről.

Az immunanalitikai módszerek alapjául az antitest-antigén komplexek kialakulása szolgál. A megfelelő antitestek kiválasztása alapvető fontosságú az ilyen típusú módszerek fejlesztéséhez. Az allergén fehérjék karakterizálásához nagy szükség van az allergiás személyek vérplazmájából származó szérum IgE ellenanyagra, bár ez komoly etikai kérdéseket vet fel. Emellett a különböző betegekből származó IgE molekulák jelentős változékonyságot és keresztreaktivitást mutatnak, valamint csak korlátozott mennyiségben állnak rendelkezésre. Ezen hátrányok miatt a kereskedelmi mennyiségű poliklonális antitesteket nyulakból, bárányból vagy kecskéből, míg a monoklonális ellenanyagokat legtöbbször egerekből nyerik az állat adott antigénnel történő érzékenyítésével [36].

4.6.1.1.1 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) módszer

Az ELISA az allergén fehérjék minőségi és mennyiségi meghatározásának legelterjedtebb módszere. Léteznek ELISA módszerek mind poliklonális, mind monoklonális ellenanyagok használatával. A monoklonális ellenanyagok (az adott fehérje egy epitópjának

felismerésére képes) alkalmazása lehetővé teszi egy adott allergén fehérje specifikus meghatározását. Ez azonban nagy körütekintést igényel a megfelelő ellenanyag megválasztásakor, valamint az egerek érzékenyítésére használt megfelelő tisztaságú allergén-extraktum elkészítésekor. Ezzel szemben a poliklonális ellenanyagok több allergén fehérjén lévő epitóp felismerésére képesek [36].

4.6.1.1.1 A kompetíció (vetélkedés) elvén alapuló ELISA módszerek

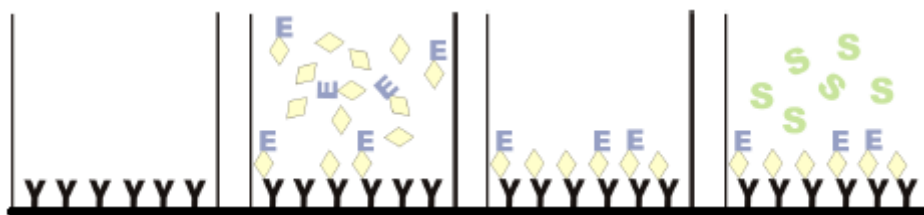
Két változata létezik:

Az első az immobilizált antigén alapú változat (indirekt, kompetitív ELISA) (10. ábra). A szilárd hordozóhoz kötött antigénhez olyan oldatot adnak, amely korlátozott számú antigénre specifikus antitestet és a vizsgálandó mintát tartalmazza. A versengés az inkubációs idő alatt következik be az oldatban lévő, illetve a műanyag mikrotiter lemezen lekötött antigének között a szintén oldatban lévő antitestért. Minél több antigén volt az oldatban annál kevesebb antitest tudott kötődni a lekötött antigénekhez. Ezután mosási lépés következik, majd hozzáadják az enzimmel jelzett ellenanyagot, amely a kötődött antitestre specifikus, így alkalmas az antigén-antitest komplex detektálására. A feleslegben lévő enzim-antitest konjugátumot lemosják, majd hozzáadják az enzim szubsztrátját. Az inkubációs idő alatt az enzimreakció által színes termék keletkezik, amelynek intenzitása adott hullámhosszon fotometriásan mérhető. Minél nagyobb volt az ismeretlen minta antigén koncentrációja annál kisebb jel detektálható (fordított arányosság) [37].



10. ábra: Indirekt, kompetitív ELISA menete [38]

A másik az immobilizált antitest alapú változat (direkt, kompetitív ELISA) (11. ábra). Itt az antitest kötőhelyeiért a minta szabad antigénje és annak enzimmel jelzett származéka verseng. Az inkubációs idő után a meg nem kötött antigének lemosása, majd a szubsztrát hozzáadása, végül szintén a színintenzitás fotometriás detektálása történik. A rögzített antitest módszer előnye a gyakran tapasztalható magasabb érzékenység, hátránya viszont, hogy a jelzőenzim közvetlenül érintkezik a mintával, így az abban levő enzimgátló komponensek tönkreteszhetik a mérést [37].



11. ábra: Direkt, kompetitív ELISA menete [37]

A gyakorlatban a gyorsabb kivitelezhetőség és a gyakran nagyobb érzékenység miatt a direkt eljárások használatosak, de nagyszámú indirekt módszer is ismeretes. Ugyanakkor a direkt rendszerek kidolgozása valamivel bonyolultabb, hiszen ebben az esetben az antigén-enzim konjugátumot is elő kell állítani. A jelzőenzimmel keresztreagáló mintaközeg vagy a jelzőenzimet gátló célvegyület (haptén) esetén az indirekt eljárás a kedvezőbb [37].

Az allergénanalitikában a fent említett módszerek közül az indirekt kompetitív ELISA használatos.

4.6.1.1.1.2 A konszekutív (nem vetélkedő) elven alapuló ELISA módszer

Más néven szendvics ELISA (12. ábra). Itt a feleslegben lévő, nagyon tiszta antitestet kötik meg a műanyag mikrotiter lemezen. A szilárd hordozóhoz kötött specifikus antitesteket reagáltatják a vizsgálati minta antigénjeivel. Mosás után hozzáadják az enzimmel jelölt specifikus antitestet (konjugátumot), majd az újabb mosási lépést követően az enzim szubsztrátját, amelyből az enzimes reakció során színes termék képződik. A színintenzitást spektrofotometriásan detektálják, a vizsgálati mintában lévő célvegyület (antigén) mennyiségével egyenesen arányos jelet kapnak [37].



12. ábra: Nem kompetitív, direkt szendvics ELISA menete [37]

Ennek a módszernek is létezik indirekt változata. A nem vetélkedő indirekt ELISA rendszer is hasonló felépítésű, de ebben az esetben a nem rögzített antitest enzimes jelzést nem tartalmaz. A kettős antitest szendvics komplexet egy, a szabad antitest IgG-jére specifikus és enzimmel jelzett második ellenanyaggal reagáltatják. Az így képződő komplexet a másodlagos antitest jelzőenzime segítségével detektálják. Ennek az az előnye, hogy elkerüli a specifikus antitest biokémiai jelölését [37].

Az allergének meghatározására a fent említett módszerek közül a direkt szendvics ELISA használatos.

A kereskedelmi forgalomban elérhető gliadin meghatározására alkalmas ELISA kitéket a 3. táblázat tartalmazza.

Gyártó	Kit neve	Analit	ELISA típusa	Ellenanyag típusa	LoD	LoQ
R-Biopharm	RIDASCREEN Fast Gliadin	Búza, rozs és árpa prolamínjai	Szendvics	Monoklonális R5 ellenanyag	2 ppm gliadin (4 ppm glutén)	5 ppm gliadin (10 ppm glutén)
R-Biopharm	RIDASCREEN Gliadin	Búza, rozs és árpa prolamínjai	Szendvics	Monoklonális R5 ellenanyag	1,5 ppm gliadin (3 ppm glutén)	2,5 ppm gliadin (5 ppm glutén)
R-Biopharm	RIDASCREEN Gliadin Competitive	Búza, rozs és árpa prolamínjai	Kompetitív	Monoklonális R5 ellenanyag	922 µg peptid/g élelmiszer	1250 µg peptid/g élelmiszer
Romer Labs	AgraQuant Gluten Assay (4-120 ppm)	Gliadin	Szendvics	N.A.	0,6 ppm glutén	4 ppm (4-120 ppm) glutén
Diagnostic Innovations Ltd.	Haven Gluten-check Kit	Omega-gliadin	Szendvics (eredeti fejlesztés: Skerritt és Hill, JAOAC, 1991, 74 (2):257-264	N.A.	<1 ppm glutén	7,5-120 ppm
Diagnostic Innovations Ltd.	Haven Gluten Kit	Omega-gliadin	Szendvics	N.A.	<7,5 ppm	7,5-156 ppm
ELISA Systems	ELISA Systems Gliadin	Omega-gliadin	Szendvics	N.A.	2,5 ppm	2,5-25 ppm gliadin
Tepnel (Neogen)	BIOKITS Gluten Assay Kit	Glutén gliadin és glutenin frakciói	Szendvics	Monoklonális ellenanyag (401/21), fejlesztette a Wheat Research Unit of CSIRO, jogtulajdonos: Vital Diagnostics, ill. lsd. Skerritt et. al. 1989	1 ppm glutén	β-50 ppm glutén
Neogen	Veratox Quantitative Gliadin Test	Gliadin	Szendvics	N.A.	5 ppm gliadin	5-50 ppm gliadin
Neogen	Alert for Gliadin	Búza, rozs és árpa prolamínjai	N.A.	N.A.	10 ppm gliadin (20 ppm glutén)	Csak kimutatás
Morinaga	Wheat Protein ELISA Kit (Gliadin)	Gliadin	Szendvics	Poliklonális	0,78 ng/ml	0,78-50 ng/ml búzafehérje

3. Táblázat: Gliadin-meghatározására alkalmas ELISA kitek [59-69]

(N.A. az adat nem elérhető)

4.6.1.1.2 Lateral Flow Device

A gyorsvizsgálati módszerek olyan technikák, amelyek akkor alkalmazandók, ha egy adott termékben, szervezetben, adott komponens jelenlétéről mihamarabb meg szeretnének bizonyosodni. Az élelmiszert előállító cégeknek a gyártási folyamat során folyamatos felügyelet alatt kell tartani, hogy a készítendő termék a jogilag megszabott határértékeknek megfelelő mennyiségben tartalmazza-e a vizsgálandó komponenst.

Az elmúlt években a szilárd fázisú immunanalitikai módszerek száma jelentősen gyarapodott. A kidolgozott új módszereknek meg kell felelniük bizonyos követelményeknek, pl. megfelelő specifikusság és érzékenység, egyszerű használat és rövid időigény.

A gyorsmódszerek fontos képviselője a lateral flow device. Ezek a tesztcsíkok gyors, egyszerű, kvalitatív (kimutatási határ 2,5-5 ppm) és szemikvantitatív meghatározást tesznek lehetővé. A tesztcsíkot az extrahált mintaoldatba helyezve 5 perc után megszületik az eredmény, hogy az adott komponenst tartalmazza-e a minta, legalább a kimutatási hátnak megfelelő mennyiségben. Az allergének detektálására ez a módszer nyújtja a leggyorsabb lehetőséget, ha csak az adott komponens jelenlétére kíváncsiak. A minta allergén tartalmára a szín intenzitás alapján csak összehasonlító vizsgálatokat végezhetnek (Pl.: az egyik minta több allergént tartalmazott, mint a másik) [39,40].

4.6.1.1.3 Immunoblotting

Az immunoblotting szintén antigén-antitest komplex képzésén alapuló eljárás, bár módszertana az ELISA-tól eltérő. Az antitesttel való inkubálást elválasztástechnikai előkészítő műveletek előzik meg. A blottolási módszerek előkészítési lépése a vizsgálandó fehérje extraktum fehérje komponenseinek szétválasztása (izoelektromos fókuszálással, nátrium-dodecil szulfátos gélelektroforézissel, 2D elektroforézis). A következő lépés során a fizikailag elválasztott fehérjéket elektrotranszfer segítségével átvezetik a nitrocellulóz, polivinilidén vagy poliészter membránra. A membránt az analitra specifikus ellenanyaggal inkubálják, így kialakul az antigén-antitest komplex a primer antitesttel. A mosás után a szekunder antitesttel történő inkubálás következik, ami általában radioaktívan vagy enzimes jelölt, így kolorimetrikus, kemilumineszcencián alapuló detektálás alkalmazható.

A dot blotting esetében nincs elválasztás, a mintákat pontszerű foltként viszik fel egy poliészter rétegre, melyre korábban az adott analitra specifikus ellenanyagot immobilizáltak. A mintából a felületi ellenanyaghoz kötődött antigéneket egy második antitest segítségével immunológiai úton detektálják.

Szöveti (tissue) blotting: A dot-blothoz hasonló, de nincsen szükség a növényi minta homogenizálására. A friss növénymintát egyszerűen rányomják a membránra. Növényi virológiában alkalmazzák [41].

4.6.1.1.4 RAST/EAST inhibíció

A radioallergoszorbens (RAST) és az enzim-allergoszorbens (EAST) inhibíciós tesztek olyan immunanalitikai módszerek, melyek az allergénre specifikus IgE ellenanyagot emberi vérszérumból határozzák meg. A módszerek elve, hogy szilárd hordozóhoz rögzített allergénekhez kötődő specifikus IgE antitesteket mérnek egy jelölt ellenanyag segítségével. Ezek az in vitro tesztek standardizált módszerek, melyek megerősítésül szolgálnak a páciensek élelmiszerrel szembeni érzékenységének diagnosztizálásánál. Az élelmiszer termékekben jelenlévő allergének azonosítása céljából, a módszert módosították. Az emberi vérszérumot az élelmiszer-mintából származó extraktummal előinkubálják, és az így megkötődött IgE antitesteket kimossák, ami az IgE molekulák felszíni antigénhez való csökkent mértékű specifikus kötődését eredményezi [43,44].

4.6.1.1.5 Rakéta immunelektroforézis

A módszer alapja szintén az antigén-antitest kölcsönhatás. A minta fehérje elektroforetikusán vándorol az immobilizált antitest tartalmú gélben. Ekvivalens antigén/antitest aránynál az immun komplex kicsapódik, egy rakéta alakot létrehozva. A rakéta fejében található az antigén-antitest komplex főtömege. Minél több antigén van jelen a mintában, annál tovább tud vándorolni a gélben, tehát nagyobb rakétákat kapnak. Kvantitatív módszer mivel a rakéta alakú precipitációs zóna magassága arányos a minta fehérjetartalmával, de kalibráció szükséges ismert antigén koncentrációjú oldatokkal [45].

4.6.1.1.6 Kettős immundiffúzió (Ouchterlony módszer)

A előzőhöz hasonlóan módszer lényege az ekvivalens mennyiségben lévő antigén-antitest arány esetében létrejövő kicsapódás. Az antigén, és az antitest a gélközegbe vágott különálló lyukakban helyezkedik el. Az antigén és az ellenanyag radiálisan az agarba diffundál, és találkozásuknál alakul ki a precipitációs zóna. A precipitációs zóna lyukaktól való távolsága jellemzi az antigén és az ellenanyag mennyiségi viszonyait. A módszer antigének (fehérjék) összehasonlítására alkalmas, például, hogy van-e közös epitópjuk, rokonok-e [45].

4.6.1.2 MS alapú fehérje meghatározási technikák

A tömegspektrometriás detektálás az elmúlt években meghatározó módszerré vált számos olyan analitikai területen, ahol a nagy szelektivitás mellett nagy érzékenységre is szükség van (orvos-biológiai analitika, gyógyszer analitikai, élelmiszeranalitikai stb. területek) [49].

A tömegspektrometriás módszerek elválasztás technikai elemekkel (pl.: HPLC, GC) vannak kapcsolva. A kapcsolatot ionforrásokkal hidalják át, amelyek az adott molekulákat ionos állapotba hozzák. Ezek az ionok tömeg/töltés szerint az analizátorban szétválnak, majd detektálásra kerülnek [48,49].

A tömegspektrometriás módszer érzékenysége és a tömeg-meghatározás pontossága lehetővé teszi marker peptidek kimutatása által élelmiszerallergének meghatározását. Jelenleg is léteznek allergének (pl.:mogyoróallergének, tejallergének, gliadin stb.) meghatározására alkalmas tömegspektroszkópiás módszerek, melyek érzékenysége az ELISA módszerével összehasonlítható [50].

4.6.2 DNS meghatározáson alapuló módszerek

Az immunanalitikai és a tömegspektrometriás módszerek mellett az allergén élelmiszer komponensek nyom-mennyiségben való kimutatásának másik eszköze a fajspecifikus DNS kimutatásán alapuló polimeráz láncreakció (PCR).

A PCR a DNS egy adott szakaszának (egy nukleotid sorának) felsokszorozására alkalmazható. Rövid idő alatt korlátlan számú másolat készíthető ezzel a technikával az adott szakaszból. Ehhez a folyamathoz szükség van két specifikus (adott szakaszra specifikus) iniciáló oligonukleotidra (primerekre), a hőstabil DNS-polimeráz (pl.: Taq-polimeráz) enzimre (az adott szál szintézisét végző enzim), PCR pufferre, továbbá az új szálak szintéziséhez szükséges nukleotidokra [42,51].

A módszer nagy hátránya, hogy az adott allergén fehérjét vagy annak egy részét kódoló DNS-t képes kimutatni, nem magát a fehérjét, így csak közvetett meghatározásra alkalmas. Lehetséges, hogy a fehérjét kódoló szekvencia jelen van a DNS-ben, de nem expresszálódik, így fals pozitív eredmény adódhat.

4.6.3 Specifikus problémák az allergénanalitika területén

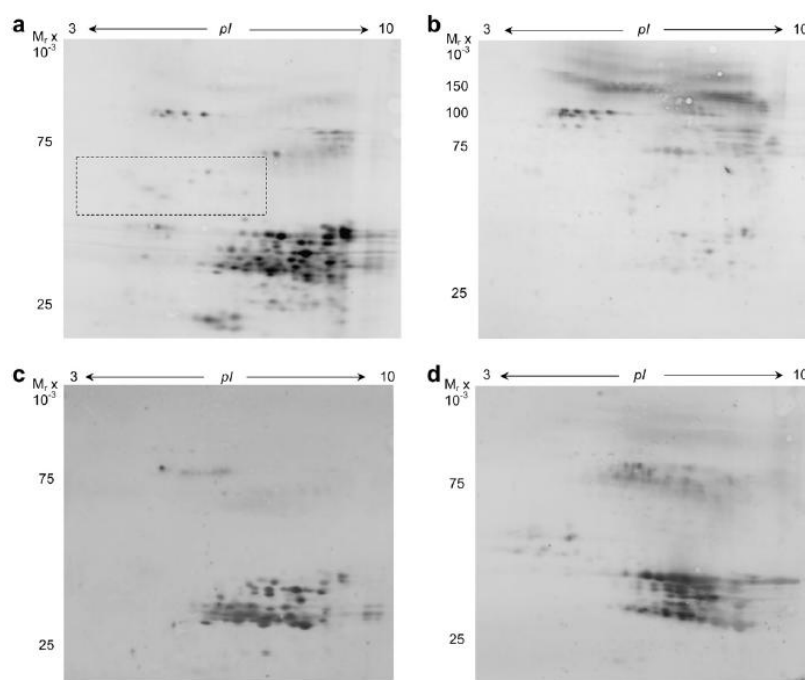
Az allergénanalitikában immunanalitikai módszereket használnak a nagyfokú specifitásuk és érzékenységük miatt.

Az immunanalitikai vizsgálatok során problémát jelentenek az immunanalitikában a vizsgált antigén epitópok illetve az őket felismerő antitestek változatossága, a különféle

élelmiszer feldolgozások hatásai az antigenitásra, illetve az immunanalitikai módszerek validálásának hiányosságai. A következőkben ezen problémákat részletesen ismertetem.

4.6.3.1 Epitópok és az ezekre specifikus antitestek változatossága

Az ELISA módszerek és egyéb immunanalitikai tesztek érzékenységük miatt a fő meghatározási technikái a gluténmentes élelmiszerek gliadin tartalmának. Ezeket a teszteket azonban különböző antitest-referencia anyag párosításokkal készítik és ettől függően azonos mintából különböző glutén mennyiség kimutatására képesek. Egy tanulmány során 3 egér antigliadin-antitest (2 kereskedelmi forgalomban kapható (401.21, R5) és egy kísérletezéssel készített antitest (PN3)) reaktivitását hasonlították össze 28 európai búzafajtából származó gliadin referenciaanyag segítségével. A referencia fehérjéket CY3 fluoreszcens festékkel jelölték. 2D elektroforézissel szeparálták őket, majd polivinilidén-fluorid membránra vitték át elektrotranszfer segítségével. Ezt követően egyenként inkubálták az elsődleges antigliadin antitestekkel. A képződött antigén-antitest komplexeket anti- egér antitestekkel detektálták, amelyeket előtte CY5 fluoreszcens festékkel jelöltek. Ezzel a módszerrel lehetővé válik, hogy a referencia fehérjék (CY3) a megfelelő antitesttel reagáló fehérjék (CY5) mellett egyszerre láthatóak legyenek (13. ábra) [32,46].



13. ábra: a) a mintában jelenlévő összes fehérje CY3 fluoreszcens festékkel jelölve, b) 401.21 antitesttel inkubált membrán, c) PN3 antitesttel inkubált membrán d) R5 antitesttel inkubált membrán [46]

A 3 különböző vizsgált antitestnek különböző a reaktivitása a referencia gliadinhoz. Az R5 és PN3 antitestek főleg a gliadin frakcióval reagáltak, míg a 401.21 antitest inkább nagy molekulatömegű gluteninekkel [32,46].

Annak ellenére, hogy ezek az antitestek köztudottan hasonló aminosav szekvenciákkal kapcsolódnak, mégis különböző fehérjefrakciókkal reagáltak. Ebből az is megállapítható, hogy egy adott antitest nem feltétlenül egy adott fehérjeszekvenciára specifikus, hanem különböző fehérjék egy adott epitópjára vagy annak olyan mértékben módosult változatára, amire még az antitest kötni tud [46].

Látható a fehérje alegységek relatív reakcióképessége a különböző antitestekkel, így megmagyarázható, hogy a különböző antitestekkel készült ELISA kitek miért adnak más glutén mennyiséget ugyanarra a mintára. A glutén különböző egyedi fehérjék heterogén keveréke, ezért a detektált gluténmennyiség nagyban függ az antitest specifitásától, melynek jól definiálnak és reprezentatívnak kell lennie [46].

Új kutatások kimutatták, hogy a glutenin cöliákiát kiváltó epitópot is hordoz, mivel a gliadin és glutenin összetétel búzánként változik, új kutatások témája a gliadin és glutenin egyéni mennyiségi kimutatása. A 401.21 monoklonális antitest a HMW-glutenin egységekhez köt erősen, ezért a glutenin detektálás antitestje lehet, míg a másik két antitest a PN3 és R5 főleg gliadinhoz köt ezért a gliadiné lehet. Az antitest keverékek, melyek tartalmaznak gliadin és glutenint is hasonló hatékonysággal felismerő tagokat, jól definiált referenciaanyaggal párosítva, lehetnek a gluténmentes élelmiszerek glutén tartalmának megbízható kimutatásának alapjai [32, 46].

A betegek biztonsága és a jogi szabályozások betarthatóságának érdekében fontos az analitikai módszerek alacsony kimutatási határa, amelyet nehéz biztosítani a nagy mértékű epitóp és antitest variabilitás miatt [46].

4.6.3.2 Élelmiszer feldolgozás hatásai az allergenitást kiváltó komponensekre

Az élelmiszerallergén fehérjék stabilitásában, az élelmiszerek feldolgozással és az emésztéssel szembeni rezisztenciájában fontos szerepet játszik a fehérjeszerkezet. Az élelmiszerek feldolgozása különböző célból történhet: az élelmiszerek minőségének növelése, íz- és aromajavítás, a külső megjelenés és a textúra változtatása, előkészítése más élelmiszerekhez történő keveréshez, illetve az eltarthatósági idő meghosszabbítása. A különböző fizikai (melegítés, mikropartikuláció, ultraszűrés, sugárzás) és kémiai eljárások (proteolízis, fermentáció) erősen befolyásolhatják a fehérjék struktúráját, ennél fogva az allergenitásukat, antigenitásukat, valamint immunológiai tesztekkel történő detektálhatóságukat. Az élelmiszertől és az alkalmazott eljárástól függően csökkenhet, illetve nőhet is egyes élelmiszerek allergenitása [52].

Az egyes kezelések különböző módon hatnak az epitópokra, így indokolt az egyes kezeléseket körültekintéssel figyelembe venni, ha az allergén-stabilitást vizsgáljuk. A fehérjeszerkezetben történő változás vezethet az epitóp destrukciójához, módosulásához, maszkírozásához, vagy nem-maszkírozásához, ezáltal csökkentheti, növelheti vagy változatlanul hagyhatja az allergénitást. Olyan módosulások, melyek a polipeptidlánc elsődleges szerkezetét változtatják meg - foszforiláció, glikolizáció, proteolízis- új epitópok megjelenését okozhatják, melynek eredményeként neoantigének alakulhatnak ki. Részben ez magyarázhatja, miért van az, hogy néhány ember tolerálni tudja a feldolgozatlan élelmiszert vagy élelmiszer-összetevőt, míg a feldolgozottat nem [52,53].

A konformációs epitópok denaturáció hatására elvesznek. Ezen epitópok sokkal érzékenyebbek a feldolgozás indukálta destrukcióra, mint a lineáris epitópok az azonos allergén felületén. A lineáris epitópok nagyobb valószínűséggel változnak meg hidrolizált állapotban. Az allergiás reakciót indukáló epitópok természete és megfelelő klinikai tünetek közötti kapcsolat azonban még nem ismert. A kapcsolat megértése döntő fontosságú lehet az allergének allergénitálásának csökkentésében vagy eliminálásában [52,53].

4.6.3.2.1 Hőkezelés

A hőkezelést az élelmiszerek minőségének növelésére, a külső megjelenés, a textúra, az aroma és az íz javítására, valamint a tápérték növelésére és az emészthetőség javítására használják. A legtöbb élelmiszer esetében a hőkezelés - mely lehet szárítás, sütés, pörkölés, forralás vagy mikrohullámú kezelés- szükséges és elkerülhetetlen [52].

A fizikai-kémiai behatás okozta változás jellege és mértéke a fehérje struktúrájában és funkcionalitásában függ a fehérje jellemzőitől, az alkalmazott hőmérséklettől, a hőkezelés időtartamától és a környezettől (pl. pH-tól vagy egyéb reaktív összetevő jelenlététől) [52].

A terciér szerkezet elvesztése létrehozhat új allergiás reakciót kiváltó epitópokat, pl. felfedhet korábban rejtett struktúrákat, valamint megsemmisíthet létező epitópokat. A másodlagos szerkezet elvesztése 55-70 °C között következik be, majd a diszulfidkötések hasadnak fel 70-80 °C közötti hőmérsékleten. Új intra/intermolekuláris kölcsönhatások alakulnak ki, valamint diszulfidkötések rendeződnek át 80-90 °C-nál, és aggregátumok jönnek létre 90-100 °C között. Ezen fizikai átalakulásokon kívül a fehérje kémiai módosulása is bekövetkezik magas hőmérsékleten (100-125 °C). Az egyik legfontosabb reakció a fehérje

aminocsoportjainak cukrokkal történő reakciója (Maillard-reakció). Azonban nem tisztázott a kapcsolat a fehérje szerkezete és az allergenitása között [52,54].

A melegítés a fehérjék egyéb kovalens módosulását is okozhatja, mely hozzájárulhat az antigenitás megváltozásához. Lejátszódhat oxidáz reakciója lipiddel, direkt oxidáció és az aszparagin dezaminálása. Polifenolokkal történő reakció lényeges és megjósolhatatlan változásokat okozhat a fehérjeszerkezetben [52].

A hőkezelés csökkentheti a célfehérje oldhatóságát, mely csökkenti az allergenitását és az antigenitását egyes élelmiszerekben, valamint az oldható protein extrahálhatóságát, mely az allergiát kiváltó élelmiszer-összetevő detektálhatóságának alapja [52].

Nincs általános szabály a hőkezelés allergenitásra gyakorolt hatását illetően. Bizonyos allergiás reakciót kiváltó élelmiszer hőstabil (pl. tej, tojás, hal, mogoró és a belőlük készült termékek), míg mások részben stabil (pl. szójabab, gabonafélék, zeller és termékeik) vagy labilis (pl. gyümölcs, rózsafélék családja, répa) fehérjéket tartalmaznak [52,53,54].

4.6.3.2.2 *Proteolitikus kezelés*

A proteolízist szintén sokat tanulmányozták az élelmiszerek allergenitásának csökkentésének felhasználása céljából. A proteolitikus eljárás a fehérjék enzimatisz emésztésén alapul, mely az allergiás reakciót kiváltó epitópok szerkezetének szétesését okozhatja. Feltéve, hogy az allergizáló epitóp szerkezete ismert, és rendelkezésre áll egy specifikus proteáz az epitóp szelektív támadására, akkor a proteolízis alkalmazható egyes élelmiszerek potenciális allergén hatásának csökkentésére és megszüntetésére [52].

Az élelmiszerallergének legnagyobb része a béltraktuson keresztül érzékenyít, így ezen okból az emészthetőség és a bélfal permeabilitása figyelembevétele kulcsfaktor, melyek hatással lehetnek a potenciális allergén jellegre. Másrészt az allergének relatív mennyiségét is figyelembe kell venni az élelmiszerben a szerkezeti stabilitással együtt, ugyanis ez hatással lehet az allergén dózis emésztéssel szembeni rezisztenciájára. A vizsgált paraméterek befolyásolják a pepszinolízist. A fehérjék potenciális allergén jellegének vizsgálatakor ez is fontos faktor, mivel a protein stabilitása függ az alkalmazott kísérleti körülményektől: pH, pepszin/fehérje arány, a pepszin tisztasága és a detektálási módszer. Az egyes allergén fehérjék pepszines emésztéssel szembeni érzékenysége lényegesen megváltozhat, ha különböző in vitro tanulmányokat összehasonlítunk. A pepszin aktivitásának optimuma relatív széles pH tartományban mozog: 1,2 és 3,5 között [55].

4.6.3.2.3 Sugárzás

Gamma-sugárzást széles körben alkalmaznak élelmiszerek tartósságának meghosszabbítására, különösen fűszernövények és tea esetében. A gamma sugárzás alkalmazása különböző dózisban képes inaktiválni mikrobákat és enzimeket. A fehérjékben, melyek sugárzásnak vannak kitéve, különböző strukturális változások következnek be, mint például aggregáció, fragmentáció, aminosavak módosulása, melyek a fehérje oldhatóságát, másodlagos és negyedleges szerkezetét és az immunreaktivitását is befolyásolják. Egyes esetekben a sugárzás növeli a fehérje allergénitását, ami valószínűleg epitópok felfedésének eredményeként történik [52].

4.6.3.2.4 Genetikai módosítás

A rekombináns DNS technológia egy kivételes lehetőséget nyújt a specifikus allergének szintjének csökkentésére. Azonban akaratlan következmény lehet új allergének bekerülése az új élelmiszerekbe. A genetikai mérnöki munka megpróbálja szelektíven kontrollálni egy vagy több specifikus fehérje expresszióját DNS szegmens beillesztésével vagy deléciójával, esetleg specifikus mutációval. Meg kell említeni az antisense RNS stratégiát, melynek alapja, hogy az antisense mRNS kötődik a megfelelő natív mRNS-hez, így módon meggátolja a kódolt polipeptid vagy fehérje szintézisét. A másik megközelítés, specifikus egyoldalú mutáció, mely csak egy aminosav cseréjét okozza az expresszált fehérjében. Ez a módosítás megfelelően lerombolja a lineáris epitópot anélkül, hogy a fehérje jellemzői, vagy a konformációs epitóp strukturális integritása megváltozna [52].

4.6.3.2.5 Élelmiszermátrixok hatása. Kölcsönhatás más élelmiszer-összetevőkkel

A fehérje hidratációs állapota, proteáz inhibitor és más mátrixhatás is hozzájárulhat a fehérje azon képességéhez, hogy elérje az aktív immunmintavétel helyét a bélrendszer nyálkahártyájában, ezáltal befolyásolhatja potenciális allergénitását. Egy tanulmány szerint az élelmiszermátrix kritikus hatással van az allergén fehérjék hozzáférhetőségére. Másrészt egyes allergén fehérjék érzékenysége a proteolízissel szemben változást mutatott a feldolgozás eredményeként, mely emellett kölcsönhatásokat eredményezhet az allergének és más élelmiszer-összetevők, főleg lipidek és poliszacharidok között. A β -laktoglobulin érzékenységét a proteolízissel szemben tripszinnel és kimotripszinnel végrehajtva egyértelműen csökkentette a poliszacharidok jelenléte, mint például a pektin, gumiarábikum és a xilán. Ennek oka valószínűleg a fehérje/poliszacharid keverékben a különböző molekulafajták közötti nem specifikus kölcsönhatások fennállása [55].

4.6.4 A validálás és annak hiányosságai az allergénanalitikában

A módszerválidálás olyan eljárás, mely során megfogalmazzuk az analitikai feladat követelményeit és igazoljuk, hogy a vizsgált módszer rendelkezik azokkal a teljesítményjellemzőkkel, melyeket az adott alkalmazás megkövetel. A validálás során tehát a módszeralkalmasság (Fit for Purpose) komplex értékelése történik. A teljesítményjellemzők, melyek részletes definícióját a 3. melléklet tartalmazza, a következők: szelektivitás, kimutatási határ, meghatározási határ, mérési tartomány, lineáris tartomány, érzékenység, pontosság, precizitás, mérési bizonytalanság, robosztusság [56,57].

A validálás során tehát a módszeralkalmasság (Fitness for Purpose) komplex értékelése történik. Egy laboratóriumnak érvényesíteni kell: a nem szabványos módszereket; a laboratórium saját módszereit; az alkalmazási területükön túlmenő szabvány módszereket; a szabványos módszerek kibővítéseit, módosításait. A validálási folyamat minden lépését dokumentálni kell [56].

A validálási folyamat:

- ❖ Az első lépés kísérletileg bizonyítani, hogy a módszer „statisztikai kontroll alatt” áll. Ehhez a következő feltételeknek kell teljesülnie:
 - A mérések átlagértékei hosszú időn keresztül állandók, mind alacsony, mind magas koncentrációértékeknél.
 - A pontosság az adott célnak megfelelő.
 - A pontosság állandó.
 - Minden egyéb teljesítményjellemző állandó.
 - Ezeknek a feltételeknek nemcsak a kalibrációs minták mérése során kell fennállniuk, hanem az analit mintamátrix vizsgálatok is.
- ❖ Ezután következik a második szakasz ami a célnak megfelelő helyesség igazolása. Ez a költségesebb szakasza a validálásnak, mivel más laboratóriumokat is be kell vonni a vizsgálatokba, illetve már validált módszerekkel kell igazolni validálandó módszer helyességét [56].

Bármilyen módszert is használunk az allergén élelmiszer komponensek analizálására, biztosnak kell lennie annak, hogy a mérési eredmények megbízhatóak és relevánsak a vizsgált élelmiszerben lehetségesen jelen lévő allergén fehérje mennyiségi meghatározásához.

Jelenleg általánosan elfogadott az, hogy az analitikai minőségbiztosítás (AQA) három fő elven alapszik, azaz a validált módszerek, referenciaanyagok és jártassági vizsgálatok szisztematikus használatán. Ennél fogva általános előfeltétele bármely minőségbiztosítási rendszer létrehozásának a referencia módszerek és referenciaanyagok elérhetősége [58].

Az allergén-meghatározási módszerek validálásának hiányosságai:

- A módszerek fejlesztését különböző antitest-referenciaanyag párosítással végzik, így eltérők lehetnek a különböző módszerekkel kapott eredmények (eltérő validálási protokollnak felelnek meg), továbbá a mérésekhez használt ellenanyagok ismeretlenek (nem tudjuk mely epitópokkal reagálnak) és a kalibráló anyagok pontos fehérje összetétele sincs megadva
- Nincs megfelelő rendelkezésre álló referencia módszer (pl.: HPLC, PCR) sem, amely tanúsítaná az allergén analitikai módszerünk helyességét
- Az allergén fehérjék és azok allergenitást kiváltó epitópjai szerkezetileg nem teljesen ismertek, továbbá különböző fajokban és eltérő földrajzi területekről származó egyedek fehérje frakciói különbözhetnek, így kérdésesek a referenciaként használható megfelelő fehérje fragmens(ek)
- Az előzőből adódik, hogy nincs egységesen homogén (sarzson belül, sarzsok között), stabil (különböző hőmérsékleten, eltérő ideig) referencia anyag, amely segítségével összehasonlíthatnánk a különböző módszereket
- A fizikai (hőmérséklet, nyomás, sugárzás stb) és kémia (proteolitikus) hatásoknak kitett fehérjék oldhatósága, reaktivitása csökkenhet, így a referencia anyagot is hasonlóan kell kezelni
- Az allergének kölcsönhatásba léphetnek a minta mátrix komponenseivel (pl.: polifenolok), így a referencia anyagnak is hasonló mintamátrixban kell lennie [58]

Ezen problémák megoldására az AOAC a MoniQA projekttel közösen létrehozott egy új validálási útmutatót, mely kifejezetten allergén analitikai problémák optimális megoldását célozza [47].

4.7 Az immunanalitikai problémák részleges megoldására a tanszéken végzett korábbi kutatómunka ismertetése

A fenti áttekintésből látható, hogy az allergiát, intoleranciát okozó élelmiszerkomponenseknek élelmiszerbiztonság, egészségvédelem szempontjából történő kézbentartásának jelenleg több gyenge pontja is van. A jelenleg rendelkezésre álló, elsősorban immunanalitikai módszereken alapuló, sorozatvizsgálati tesztek az említett hibaforrásokat nem, vagy csak részlegesen tudják figyelembe venni, ezért megbízhatóságuk korlátozott.

A korábbi kutatás szerint a fentiek tudományos igényű tisztázása olyan referenciaanyag segítségével lehetséges, mely kontrollált összetételű, előre meghatározott allergéntartalmú, de a valódi élelmiszerek fizikai-kémiai tulajdonságait megközelítő, ún.

reális modellmátrix. Ez esetben ugyanis nem csak a változások mértékének meghatározására, hanem azok értelmezésére is lehetőségünk adódik.

Az allergénanalitikában jelenleg rutinmódszerként az ELISA teszteket használják. Számos gyártó készít allergének kimutatására és meghatározására alkalmas ELISA módszereket. Ezen kitek ugyanarra a célra készültek, mégis különböző antitesteket használhatnak és a mintaelőkészítés módszertana is eltérő lehet. Joggal merült fel a kérdés, hogy vajon ugyanarra a mintára ugyanazt az analitikai jelet szolgáltatják-e.

Ennek megfelelően korábbi kutatás célkitűzései a következők voltak:

- Olyan referenciaanyag fejlesztése, mely reális élelmiszer-mátrixban, deklarált mennyiségben tartalmaz gliadin fehérjét.
- A jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható gliadin kimutatására és meghatározására alkalmas ELISA tesztek összehasonlítása a kifejlesztett referenciaanyaggal.
- Az élelmiszer feldolgozási folyamatok (jelen esetben a tésztakészítés és sütés) hatásának vizsgálata a mérhető allergén fehérje tartalomra a kidolgozott modelltermékben [43].

4.7.1 A vizsgálataimhoz szükséges korábbi eredmények összegzése

Az alkalmazott hét ELISA módszer mindegyike gliadintartalom élelmiszerekben történő kimutatására és meghatározására készült. Az eredmények alapján, a tesztek mind pontosság, mind precizitás szempontjából változatos eredményeket szolgáltatnak. A kifejlesztett referenciaanyagok koncentrációját a törvényi határértékek alapján határozták meg, így mind a fogyasztók, mind pedig az élelmiszer gyártók szempontjából fontos, hogy ezekben a koncentrációtartományokban a kereskedelmi forgalomban kapható ELISA tesztek megbízható eredményekkel tudjanak szolgálni. Élelmiszerbiztonsági szempontból tehát lényeges kérdés, hogy az eredmények változatosságának hátterében milyen tényezők állhatnak.

A referenciaanyag kifejlesztésére és vizsgálatára, olyan kísérleti módszertant alkalmaztak, ahol az analitikai módszerek egyes jellemzőinek meghatározása során a mintamátrix előállítási folyamatától és tulajdonságaitól függő hatásokat is azonosítani és jellemezni tudták. Sikerült gliadin tartalom szempontjából homogén terméket előállítani.

A tésztakészítés során az porkeverékhez adagolt margarin komplexet képezhet az allergén fehérjékkel. Ez esetben egyrészt csökkenhet a fehérje oldhatósága, illetve a zsíros fázis jelenléte miatt a mintaelőkészítés során alkalmazott extrakciós módszer alkalmatlanná

válhat a teljes allergén fehérjetartalom kinyerésére. Emellett a kölcsönhatás módosíthatja az allergén molekulák antitesthez való affinitását. Így az analitikai módszerrel kimutatott fehérjekoncentráció kisebb lehet a valódi értéknél. Mindezek alapján jelenleg nem világos, hogy a mért koncentráció csökkenés valódi vagy csak látszólagos, illetve fontos kérdés, hogy az így megváltozott szerkezetű allergén fehérje immunrendszerre gyakorolt hatása változott-e, és ha igen, milyen mértékben.

A sütés, mint hőkezeléssel együtt járó technológia az előzőnél is többértű és hatásában is jelentősebb problémakör kezelését teszi szükségessé.

A sült termékekben bekövetkezett hődenaturáció okozhat oldhatósági nehézségeket, valamint módosíthatja a fehérjék biológiai funkcióját is. Ezen funkció változás maga után vonhatja az immunaktivitásának változását is. A megváltozott allergén szerkezet módosíthatja a fehérje antitesthez való kötődését is. Emiatt vizsgálni kell az alkalmazott módszer immunanalitikai korlátait és megoldást kell találni ezen korlátok feloldására, hogy valóban azt a teljes fehérje mennyiséget mérhessük, ami az immunrendszerben válaszreakciót válthat ki.

Az allergén fehérjék denaturációja, illetve mátrixba való beépülése gondot jelenthet a mintaelőkészítés során. A natív fehérjékre kidolgozott extrakciós módszer a mátrixhatás miatt alkalmatlanná válhat. Az azonban, hogy a fehérje frakció nem extrahálható, nem feltétlenül jelenti azt, hogy megváltozik az allergén aktivitása. Ennek vizsgálata élelmiszerbiztonsági szempontból lényeges kérdés, mivel az extrakció okozta mérési hiba elérheti akár az egy nagyságrendnyi koncentráció különbséget, ami az cöliákiában szenvedő betegek számára kritikus lehet.

Ezek az 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 foglalkozók, sőt az orvosi diagnosztikával foglalkozó szakemberek munkájára, gondolkodására is. Az élelmiszer allergénekre vonatkozó jelölési kötelezettség célja egyértelmű és messzemenően támogatandó: az ilyen rendellenességtől szenvedő emberek védelme. Másrészt viszont, ha a módszerek a munkájuk során bemutatott eltérések, hibák kezelésére nem lesznek alkalmasak, sem gyártó, sem fogyasztó, sem 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 lehetne a szabályozás igazítása ennek figyelembevételével. A jelen munkájukban azonosított fehérjedenaturációból adódó egyértelmű fehérjekoncentráció csökkenés okainak feltárásával, magyarázatával lesz lehetőség a mintamátrix típusokra vonatkozó dedikált mintaelőkészítési eljárás kidolgozása. Ugyancsak a fehérjedenaturáció jellegének azonosítása szükséges ahhoz, hogy az immunanalitikai módszerek felhasználási korlátait meghatározzák. Ha ugyanis a hődenaturáció immunaktivitás változást okoz a meghatározandó komponensekben, ilyen típusú mintamátrixokban történő alkalmazása erősen megkérdőjelezhető. Ennél is távolabbi területre mutat az a kérdés, hogy ha valóban az aktív csoportokban történik konformációváltozás, akkor ez hogyan változtatja meg a szervezetben az immunválaszok kialakulását és lefolyását [43].

4.8 A korábbi kutatómunka folytatása, célkitűzések

A munkát folytattam azzal, hogy vizsgáltam a fentebbi homogén referenciaanyagok stabilitását. Ezzel gyakorlatot és szemléletet szereztem munkám fő területéhez, a teljes lisztet – és így sikérkomplexet, nem csak gliadint tartalmazó referenciaanyag fejlesztéséhez.

Az allergén forrását már egy tanúsítvánnyal rendelkező standard liszt biztosította. Munkám további célkitűzései ezzel a liszttel készült modelltermékek vizsgálatával fűgnek össze, amelyek:

- A standard liszttel 10 és 50 ppm elméleti gliadin koncentrációjú modelltermékek előállítása
- Ezen minták homogenitásának, visszanyerésének igazolása
- Stabilitás vizsgálatainak megkezdése
- A különböző feldolgozottsági szintű minták (porkeverék, tészta, sütemény) gliadintartalmának immunanalitikai módszerek általi meghatározásra gyakorolt hatása
- Illetve a gliadin izolátummal készült mintáknál alkalmazott hasonló módszerek eredményeinek összevetése (két fajta ELISA kit), erre a modelltermékre kapott eredményekkel, szemléltetve a lisztben jelen lévő kísérő komponensek hatását a gliadintartalom analitikai mennyiségi meghatározására
- Továbbá a két kit által szolgáltatott eredmények közötti összefüggések, tendenciák keresése

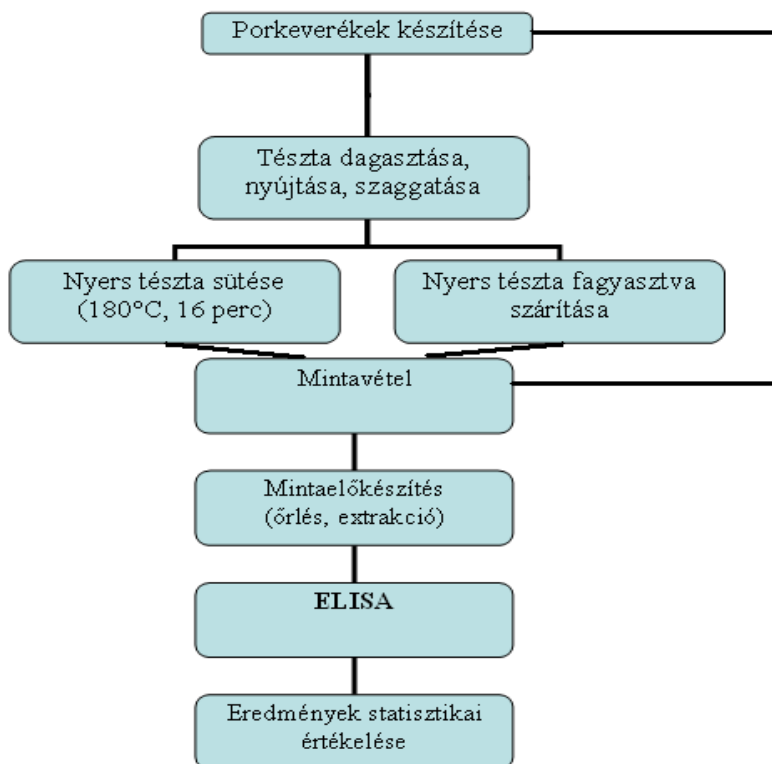
5 Anyagok és módszerek

5.1 Kísérletterv

Előre meghatározott kísérletterv szerint az irodalmi részben említett problémák megoldására egy korábbi kutatásban fejlesztett gliadin tartalmú referenciaanyag jelölt (későbbiekben modelltermék) további vizsgálatait végeztem, amelyek hatással lehetnek a referenciaanyagként való alkalmazhatóságra [72]. A vizsgált tulajdonságok: a modelltermék stabilitása, az alkalmazott gliadin forrás eredetének hatása, illetve a feldolgozás hatása az analitikai eredményekre. Ezeket kétféle kereskedelmi forgalomban kapható, gliadin meghatározásra alkalmas ELISA módszer (R-Biopharm, Romer Labs) használatával vizsgáltam.

A fentebb említett vizsgálatokhoz, a korábbi kutatáshoz hasonló módon készítettem új típusú modelltermékeket is. A változtatás a gliadin forrás eredetében történt, régebben gliadin izolátum volt, míg az általam készítetteknél standard lisztet alkalmaztam. Így vizsgálhattam, hogy a gliadin tartalom immunanalitikai meghatározására hatással van-e a standard lisztben jelen lévő többi komponens.

A munkám során 0, 10 és 50 ppm gliadintartalommal rendelkező modelltermékeket állítottam elő. Az előállításuk vázlatát illetve az utána következő lépéseket a 14. ábrán szemléltetem. Részletesebb ismertetésük a következő alfejezetekben található.



14. ábra: Kísérletterv

Az alkalmazott ELISA kitek:

- R-Biopharm – RIDASCREEN Gliadin (Art. No.: R7001)
- Romer Labs – AgraQuant Gluten Assay (Order #: COKAL0248)

A különböző mintákból a statisztikai kiértékeléshez megfelelő számú párhuzamos mérést (2 és 9 között) végeztem ezen kitekkel, amelyeknek tervezett felosztását a 4. és 5. táblázatban foglalom össze. Ezen táblázatok a szükséges hígításokat is tartalmazzák az egyes mintafélékre, amelyeket úgy határoztam meg, hogy a mérési adatok a kalibrációs görbe lineáris tartományába essenek.

Standard lisztrel készült modelltermékek	R-Biopharm		Romer Labs	
	Párhuzamosok száma	Hígítás	Párhuzamosok száma	Hígítás
0 ppm porkeverék	2	1X	2	1X
0 ppm liofilezett tészta	2	1X	2	1X
0 ppm sütemény	2	1X	2	1X
10 ppm porkeverék	4	1X	4	2X
10 ppm liofilezett tészta	5	1X	5	2X
10 ppm sütemény	6	1X	7	2X
50 ppm porkeverék	4	5X	4	10X
50 ppm liofilezett tészta	5	5X	5	10X
50 ppm sütemény	6	5X	7	10X

4. Táblázat: A standard lisztrel készült minták felosztása és hígítása a két kiten

Gliadin izolátummal készült modelltermékek	R-Biopharm		Romer Labs	
	Párhuzamosok száma	Hígítás	Párhuzamosok száma	Hígítás
0 ppm porkeverék	2	1X	0	
0 ppm liofilezett tészta	2	1X	0	
0 ppm sütemény	2	1X	2	1X
10 ppm porkeverék	4	1X	0	
10 ppm liofilezett tészta	5	1X	9	1X
10 ppm sütemény	6	1X	9	1X
50 ppm porkeverék	4	5X	0	
50 ppm liofilezett tészta	5	5X	9	5X
50 ppm sütemény	6	5X	9	5X

5. Táblázat: A gliadin izolátummal készült minták felosztása és hígítása a két kiten

Mivel a kétféle módszer esetében a standardek száma eltérő volt, így a mintákból különböző számú párhuzamos mérést végeztem. Továbbá a gliadin izolátummal készült modelltermék egyes mintáiból nem volt elegendő, így a Romer Labs kittel végzett méréseket azoknál nem végeztem el. A minták plate-re történő felhelyezése randomizált módon, sorsolással történt. A standardek helyei a két kit esetében a 6. és 7. táblázatban láthatók a

sárga cellákban feltüntetve a koncentrációkkal. A többi cellában lévő számok által jelölt minták a 4. mellékletben tekinthetők meg.

ROMER LABS	1	2	3	4	5	6
A	26	37	0 ppm	28	9	3
B	24	40 ppm	25	14	30	16
C	22	31	36	33	20	29
D	120 ppm	32	35	34	120 ppm	6
E	17	0 ppm	23	19	38	4 ppm
F	27	40 ppm	15	11	4 ppm	12 ppm
G	10	8	13	18	12	21
H	7	12 ppm	1	2	4	5

6. Táblázat: Romer Labs standardek helye a plate-en

R-BIOPHARM	1	2	3	4	5	6
A	26	0 ppb	10 ppb	28	9	3
B	24	40 ppb	25	14	30	16
C	22	31	36	33	20	29
D	80 ppb	32	35	34	0 ppb	6
E	17	5 ppb	23	19	5 ppb	10 ppb
F	27	80 ppb	15	11	20 ppb	40 ppb
G	10	8	13	18	12	21
H	7	20 ppb	1	2	4	5

7. Táblázat: R-Biopharm standardek helye a plate-en

Azért használtam a minták és a standardek esetében is random elhelyezést, hogy teszteljem a módszerek saját bizonytalanságát. Ha a párhuzamosokat különböző tesztesíkokra helyezem, akkor az statisztikailag reprezentatívabb eredményt ad, mintha egymás mellett lennének.

Összefoglalva tehát a modelltermékekkel kapcsolatos immunanalitikai vizsgálatok fő pontjai, amelyek eredményeit statisztikai módszerekkel értékeltem:

- Az előzőekben említett minták stabilitásának vizsgálatait elvégeztem.
- Az izolált gliadinnal és a standard liszttel készült modelltermékekben a mérhető gliadin tartalmat összehasonlítottam.
- A feldolgozási folyamatok egyes lépéseinek analitikai eredményekre gyakorolt hatásának szemléltetésére mintát vettem a különböző gliadin koncentrációjú (0, 10 és

50 ppm) porkeverékekből (recept szerinti száraz komponensek+ a 10 és 50 ppm esetében a szükséges allergén komponens) a liofilizált tésztából, illetve a süteményekből is (14. ábra).

- Végül a kétféle kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kit által szolgáltatott eredmények összevetésére is lehetőségem adódott.

Ezek részletes ismertetésére az Eredmények és értékelés fejezetben kerül sor.

5.2 A modelltermék

A modelltermék előállításának alapját egy Scaravelli és munkatársai által kidolgozott recept képezte [71]. Jelen kísérletekhez egy alapvető változtatást végeztem a receptben: a búzalisztet gluténmentes lisztre illetve az adott gliadin forrásra (gliadin izolátum, standard liszt) cseréltem.

5.2.1 A modelltermék elkészítéséhez szükséges hozzávalók

- Liszt – Gluténmentes lisztkeverék Mix C (Schär), 1 kg
- Porcukor – Mesterkonyha (SALT-IMAGE Kft.), 500 g
- Só – Vákuum só (PRO-TEAM Kht.), 1 kg
- Szódabikarbóna – Horváth Rozi étkezési (R-Coop 3 Kft.), 50 g
- Margarin – Tejmentes, 80 %-os (Accento), 5 kg
- Víz
- Gliadin forrás:
 - kísérleti gliadin izolátum (BOKU)
 - standard búzaliszt (Gabona-labor Kft.)

5.2.2 A modelltermék készítéshez szükséges gliadin forrás előkészítése

A gliadin izolátummal készített modellterméket Adonyi Zsanett készítette, amelynek részletes ismertetése a 2010-es TDK dolgozatában megtalálható [72]. Ezen termékből származó mintákat a vizsgálataimhoz felhasználtam.

A standard liszt szükséges vizsgálatait a modelltermékek készítéséhez:

- Szabvány szerint, több párhuzamos méréssel, sikérmosó alkalmazásával meghatároztam a nedvessikér tartalmat [74]. Az analitikai mérlegen bemértem 10 g lisztet, amelyet egyenletesen eloszlattam a benedvesített szűrőn. Majd a lisztet a szűrő tartó edény falára nátrium-kloridos pufferoldatot (2%-os) csepegtetve nedvesítettem. A nedves sikért a tésztából 10 perces nátrium-klorid pufferoldatos kimosással elkülönítettem. Végül a kimosó oldat feleslegének eltávolítása céljából

centrifugáltattam a keletkezett siker-golyócskát. A lecentrifugált siker golyót egy előre lemerített tömegű edénybe helyeztem, majd tömegét 0,01 g pontossággal meghatároztam. Négy ilyen párhuzamos mérést végeztem, amelyek átlagát kiszámítottam és a termék tömegszázalékban kifejezett nedvessikér-tartalmát a következő képlettel határoztam meg: $(m \cdot 100) / 10 = 10 \cdot m$, ahol m a nedvessikér tömege.

- Majd szintén szabvány szerint szárítószekrénybe helyeztem sikért szárazsiker-tartalom meghatározása céljából [75]. A szárítószekrény hőmérsékletét 130 °C-ra állítottam, ezután két órán keresztül ott hagytam. A két óra letelte után minden mintán 3-4 párhuzamos bevágást végeztem késsel. Majd további 3 órára visszahelyeztem a szárítószekrénybe. Végül exsikkátorban hűtöttem a mintát és a tálkával lévő együttes tömegét 0,01 g pontossággal meghatároztam. A következő képlettel következtettem a liszt %-os szárazsiker-tartalmára: $(m_1 - m_0) / m \cdot 100$, ahol m a nedvessikér meghatározásához vett bemérés tömege (10,00g), m_0 a tálka tömege, m_1 a tálka és a szárazsiker tömege volt.
- Jelenleg rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján a szárazsiker-tartalom 50%-a gliadin, így már meg tudtam határozni a különböző gliadin koncentrációjú modelltermékeimhez szükséges liszt mennyiséget.

5.2.3 A modelltermék előállításához szükséges eszközök

- Analitikai mérleg – Pioneer, gyártási szám: 8730478205 (Ohaus)
- Sikérmosó – PERTEN 2200, gyártási szám: 026170 (Perten Instrument AB)
- Szárítószekrény – MLW WS50, gyártási szám: 83206 (WEB-MLW Labortechnik)
- Valorigráf – FQA-205, gyártási szám: 98/106-003 (Metefém)
- Alveográf nyújtáshoz használt tartozékai (fémsín, nyújtóhenger, pogácsaszaggató)
- Légkeveréses sütő – 640VE/U, gyártási szám: 2708060215 (Tecnoeka S.r.l.)
- Liofilező – Christ LOC-1m 10041, gyártási szám: 10660 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH)
- Főzőpoharak, kiskanál, kés, spatula
- Háztartási sütőpapír – PROFI (Kelly 2000 Zrt)
- Frissen tartó fólia – Profissimo (dm-drogeriemarkt)

5.2.4 A modelltermékek készítésének módszere

A szárazanyagokból a recept szerinti mennyiségeket bemértem analitikai mérlegen. A gluténmentes lisztet, a porcukrot, a sót és a szóda bikarbónát a valorigráfban kevertettem 20

percen keresztül. Ezt követően az allergén forrást is tartalmazó minták esetében hozzáadtam a kívánt koncentrációnak (10 ill. 50 ppm) megfelelő mennyiségű standard lisztet az eddigi keverékhez. Majd ismételt 20 percig kevertettem valorigráfban a homogén eloszlás biztosításának érdekében.

Ezután a porkeverékhez hozzáadtam a margarint és a vizet, amellyel 5 percen keresztül dagasztottam valorigráf segítségével.

Az így elkészült tésztát az alveográf tartozékainak segítségével egyenlő vastagságúra nyújtottam, majd 3 db megegyező nagyságú, nagyobb repedéséktől mentes, egységes magasságú korongokat szaggattam belőle. A maradék tésztából pedig 3 megközelítőleg azonos méretű mini pogácsát gyúrtam.

A korongocskákat sütőpapír-négyzetre helyezve egy fémtálca közepére tettem tálca hosszabb oldalával párhuzamosan. Légkeveréses sütőbe helyezve 180 °C-on, 16 percig sütöttem. Miután a kész sütemények kihűltek mintatartó zacskóba tettem őket.

A mini pogácsákat petricsészére helyeztem, majd lefedtem frissen tartó fóliával és a fagyasztóba raktam. A fagyasztott pogácsákat 24 órán keresztül liofilező berendezésben fagyasztva szárítottam. A kiszáritott mintákat ebben az esetben is mintatartó zacskóba helyeztem el.

5.3 Mintaelőkészítés

A liofilezett pogácsákat és a korong alakú süteményeket a daráló használatával leőröltem. Az őrleményeket és a porkeverékekből vett mintákat zárható mintatartóban tároltam szobahőmérsékleten, sötétben. A további előkészítési lépéseket az alkalmazott ELISA kit leírata szerint végeztem (R-Biopharm RIDASCREEN Gliadin Assay, Romer Labs AgraQuant Gluten Assay).

5.3.1 A mintaelőkészítéshez használt eszközök

- Daráló készülék – RETSCH GM200, gyártási szám: 129060505 (RETSCH GMBH)
- Analitikai mérleg – Pioneer, gyártási szám: 8730478205 (Ohaus)
- Rázó – Analog Vortex Mixer, gyártási szám: 090902010 (VWR)
- Vortex – Lab Dancer S40 (VWR)
- Centrifuga – T24 (MLW)
- Vízfürdő – Shaking Water Bath 1024, gyártási szám: 520039680 (FOSS)
- 50 ml-es centrifugacsövek
- Automata pipetták

5.3.2 Mintaelőkészítés a RIDASCREEN Gliadin teszt kit alapján

- A kit leírásnak megfelelően elkészítettem a szükséges oldatokat:
 - 80%-os etanol oldat
 - Hígító oldat: a kitben található Sample diluent oldatot ötszörösére hígítottam desztillált vízzel
- Majd analitikai mérlegen 0,25 g mintát mértem be műanyag centrifugacsövekbe.
- Minden mintához hozzáadtam 2,5 ml Cocktail Solution oldatot vegyi fülke alatt, mert a vegyszer β -merkaptóetanolt tartalmaz, amely mérgező hatású.
- Ezután 30 másodpercig vortexeltem az oldatot.
- A csöveket 40 percre 60 °C-os vízfürdőbe helyeztem.
- Hűlés után 7,5 ml 80%-os etanolt adtam a mintákhoz.
- Majd további 60 percig rázattam a mintákat rázógépen, 7-es fokozaton.
- A rázás után szobahőmérsékleten (20-25 °C) 10 percig 5000 rpm-en centrifugáltam az oldatot.
- A centrifugálás végeztével a csöveket óvatosan kivettem (nehogy felkavarodjon a leülepedett oldhatatlan rész) és a felülúszóból átpipettáztam 5 ml-t egy tiszta centrifugacsőbe.
- A felülúszókat tartalmazó centrifugacsöveket szobahőmérsékleten, sötétben tároltam a mérés kivitelezéséig.
- A felülúszót megfelelő töménységűre hígítottam 2 ml-es Eppendorf csövekben, a kithez adott, a leírásnak megfelelően elkészített mintahígító oldattal.
- Egy üres műanyag plate-re random elhelyezéssel felpipettáztam 200-200 μ l-t az elkészült mintákból és a standardokból, majd ezekből 100-100 μ l-t használtam fel a mérés során. Az üres plate használatára azért van szükség, hogy az oldatok közel ugyanannyi időt töltsenek el a primer antitesteket tartalmazó plate-en [60].

5.3.3 Mintaelőkészítés az AgraQuant Gluten teszt kit alapján

- A kit leírásnak megfelelően elkészítettem a szükséges oldatokat:
 - 40%-os etanol
 - Hígító oldat a kitben található Sample dilution buffer oldat desztillált vízzel való 10-szeres hígításával készült.
- Majd analitikai mérlegen műanyag centrifugacsövekbe mértem 1 g mintát, melyhez 10 ml 40%-os etanolt adtam.
- A csöveket 5 percig rázattam a rázógép 7-es fokozatán.

- Ezután 10 percig 4000 rpm-en centrifugáltam.
- A centrifugálás végeztével a felülúszóból 5 ml-t átpipettáztam egy tiszta centrifugacsőbe.
- A felülúszót megfelelő töménységűre hígítottam a kithez adott és előírásnak megfelelően előhígított mintahígító pufferrel. A hígítást ebben az esetben is 2 ml-es Eppendorf csövekben végeztem.
- Egy üres műanyag plate-re random elhelyezéssel felpipettáztam 200-200 µl-t az elkészült mintákból és a standardokból, majd ezekből 100-100 µl-t használtam fel a mérés során. Erre a lépésre szintén azért van szükség, hogy az oldatok egységes ideig tartózkodhassanak a primer antitesteket tartalmazó plate-en [62].

5.4 ELISA mérések

Az ELISA tesztek minden esetben az alkalmazott kit leírásnak megfelelően végeztem el. A kitek tartalmazzák a tesztekhez szükséges reagenseket, vegyszereket. Ezeknek használatuk előtt szobahőmérsékletűnek kellett lenniük, így azokat már a mintaelőkészítésnél kivettem a hűtőből.

5.4.1 Az ELISA mérésnél használt eszközök

- Vortex készülék – Lab Dancer (VWR)
- Plate mosó – Elx50 gyártási szám: 238577 (BioTek)
- Fotométer – iMark Microplate Reader gyártási szám: 11410 (Bio-Rad)
- Automata pipetták – 100, 1000 és 5000 µl-es pipetták, 300 µl-es nyolccsatornás pipetta (Biohit)

5.4.2 A RIDASCREEN Gliadin teszt elvégzésének a lépései

- A kit leírásnak megfelelően elkészítettem a szükséges oldatokat:
 - Mosópuffer: a kitben található koncentrátumot a 10-szeresére hígítottam desztillált vízzel
 - Hígított enzim konjugátum: a kitben található antibody enzyme conjugate oldat desztillált vízzel 11-szeresére hígítva
- A mikrotiter lemez tartójába megfelelő számú mikrotiter csíkot illesztettem be az összes standard és minta meghatározására.
- Ezt követően az előzetesen üres plate-re pipettázott mintákból és standardekből 100-100 µl-t az ELISA lemezre pipettáztam nyolccsatornás pipettával.
- Ezután szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltam a plate-et.

- A cellákból a reakcióelegy eltávolítását és az egyenként 250 µl mosópufferrel való háromszori átmosást automata plate-mosó készülékkel végeztem el.
- A mosást követően minden egyes cellához hozzáadtam 100 µl hígított enzim konjugátumot nyolccsatornás pipetta segítségével, majd 30 percig inkubáltam a lemezt szobahőmérsékleten.
- Az ezt követő mosási lépésnél ugyanúgy jártam el, mint ahogy azt előzőleg ismertettem.
- A mosást követően minden egyes cellához 50 µl szubsztrátot és 50 µl kromogént pipettáztam, majd ismét 30 percig, lefedve (sötétben), szobahőmérsékleten inkubáltam a plate-et.
- Utolsó lépésként hozzáadtam minden egyes cellához 100 µl stop reagenst. Majd fotométerrel 450 nm-en megmértem az egyes cellákban lévő oldatok abszorbanciáját [60].

5.4.3 Az AgraQuant Gluten teszt elvégzésének a lépései

- A kit leírásnak megfelelően elkészítettem a szükséges oldatot:
 - Mosópuffer: a kitben található koncentrátumot a 10-szeresére hígítottam desztillált vízzel
- Első lépésként a mikrotiter lemez tartójába megfelelő számú tesztcsíkot illesztettem be.
- Ezt követően az előzetesen üres plate-re pipettázott mintákból és standardekből 100-100 µl-t az ELISA lemezre pipettáztam nyolccsatornás pipettával.
- Szobahőmérsékleten 20 percig inkubáltam a lemezt.
- Az inkubálási idő letelte után a cellákból a reakcióelegy eltávolítását és az egyenként 300 µl mosópufferrel való háromszori átmosást automata plate-mosó készülékkel végeztem el.
- Mosás után minden egyes cellába 100 µl konjugátumot pipettáztam nyolccsatornás pipetta segítségével.
- Ezután szobahőmérsékleten 20 percig inkubáltam a plate-et.
- A 20 perc letelte után ismét mosási lépés következett, amely a feljebb leírt módon végeztem el.
- A mosási lépést követően minden egyes cellába 100 µl szubsztrátot adagoltam.
- Ezzel is 20 percet inkubáltam sötétben, majd minden cellába 100 µl stop reagenst pipettáztam.

- A reakció leállítása után fotométerrel 450 nm-en megmértem az egyes cellákban lévő oldatok abszorbanciáját [62].

5.5 Az eredmények statisztikai értékelésének a módszere

A különböző összehasonlító értékeléseknél számoltam a kapott eredmények szórását az alábbi képlet szerint.

$$s_d^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (d_i - \bar{d})^2}{n - 1}$$

- s_d^2 szórásnégyzet
- d egy adott pár különbsége
- $\bar{d}$ ezen különbségek átlaga
- n a mintaszám [73]

Ezután **F-próbát** alkalmaztam a két összehasonlítandó mérésorozat szórásainak segítségével a következő képlet szerint.

$$F_0 = s_x^2 / s_y^2$$

- s_x^2 az egyik valószínűségi változó korrigált szórás négyzete
- s_y^2 a másik valószínűségi változó korrigált szórás négyzete

Az F-eloszlás kritikus értékét egyoldali szinten megkerestem. Ha a fentebbi hányados a kritikus határérték alatt van végezhetünk azonos varianciájú t-próbát (homoszcédasztikus kétmintás t-próbát), ha viszont fölötte akkor különböző varianciájú t- próba szükséges a két mintacsoport összehasonlítására [73].

A kétmintás t-próba próbastatisztikája

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{(n-1)s_x^{*2} + (m-1)s_y^{*2}}} \cdot \sqrt{\frac{nm(n+m-2)}{n+m}}$$

- $\bar{x}$ az egyik valószínűségi változó átlaga a mintájában
- $\bar{y}$ a másik valószínűségi változó átlaga a mintájában
- s_x^2 az egyik valószínűségi változó korrigált szórása
- s_y^2 a másik valószínűségi változó korrigált szórása
- n az egyik minta elemszáma
- m a másik minta elemszáma

A t-eloszlás kritikus értékét kétoldali szinten megkerestem. Ha a fentebbi képlet által kapott eredmény a kritikus határértékeken belül van, akkor a két összehasonlítandó csoport között nincs szignifikáns különbség 95%-os konfidenciaszinten [73].

6 Eredmények és értékelés

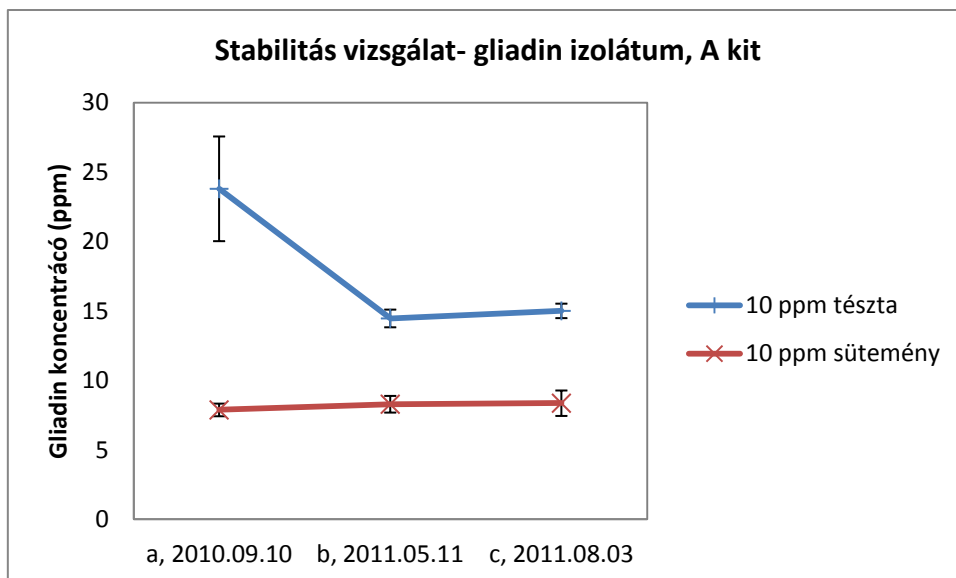
Az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint elkészített modelltermékek vizsgálatára az R-Biopharm által gyártott Ridascreen Gliadin ELISA, illetve a Romer Labs által gyártott AgraQuant Gluten ELISA kitekkel került sor. Az eredmények ismertetésénél a kétféle kit sorrendtől függetlenül az A és B jelölést kapja, mivel célunk nem az ELISA módszerek minősítése, hanem a szakmai problémásor mértékének megvilágítása és megoldások keresése. A betűkódok minden esetben ugyanarra az ELISA módszerre vonatkoznak. Anyagi okok miatt nem volt lehetőségem a korábban hét különböző módszerrel végzett vizsgálatok folytatására, így kiválasztottam azt a két módszert, amely ugyanazon mintákra nagyon különböző eredményeket adott.

A fejezet felépítése a kísérletek időrendi sorrendjében történik:

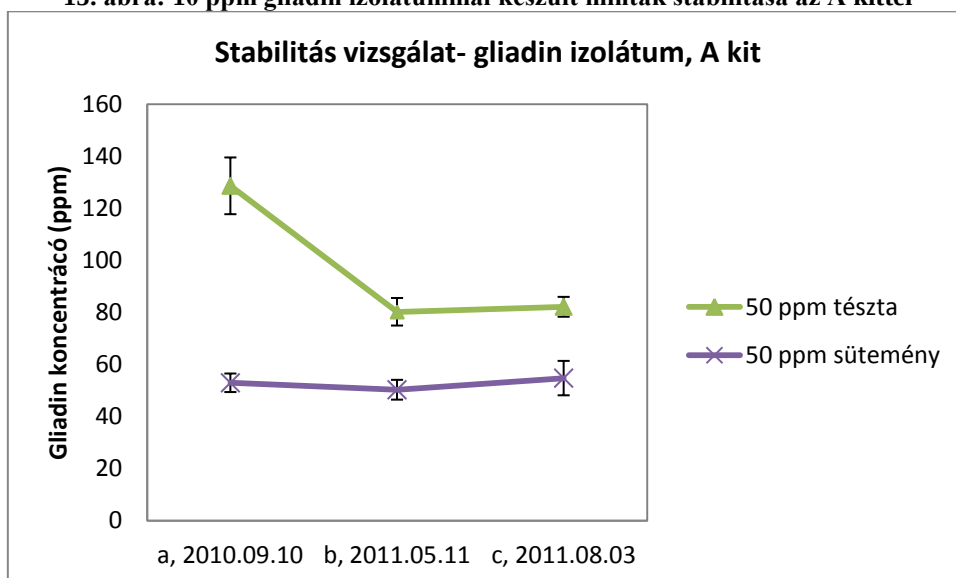
- a korábbi kutatások során fejlesztett referenciaanyag-jelölt modelltermék stabilitásának vizsgálata
- az új, standard lisztrel készült modelltermékkel kapcsolatos vizsgálatok ismertetése
- összehasonlító elemzések (a régebbi gliadin izolátummal és az újabb, standard lisztrel készült modelltermékre vonatkozó kutatási eredmények, illetve a kétféle ELISA módszer összehasonlítása).

6.1 *A gliadin izolátummal készült termék stabilitásának vizsgálata*

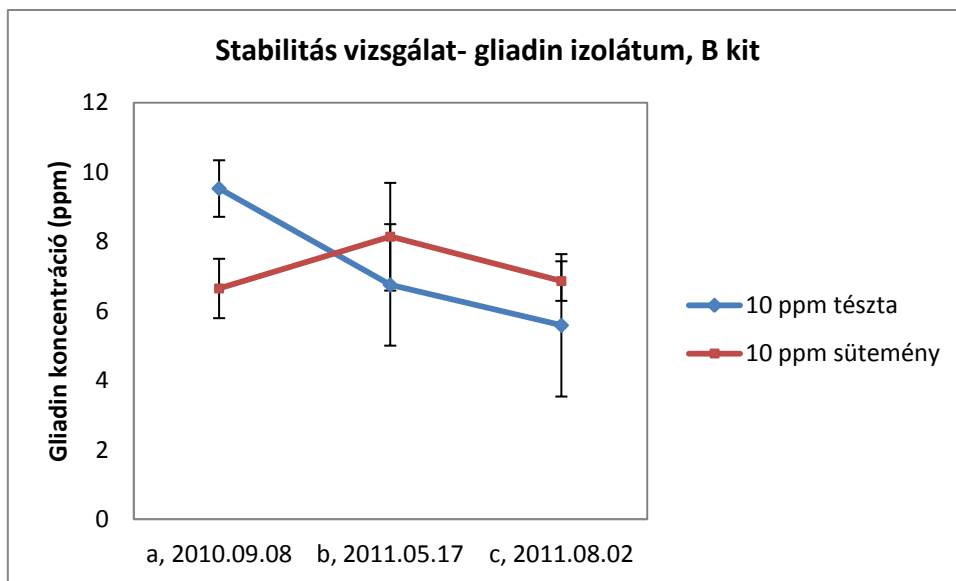
A modelltermék referenciaanyagként történő alkalmazásának alapvető feltétele a minta stabilitásának ismerete a tárolás és szállítás alatt. Munkám ezen fázisában korábban (2010 augusztusában) előállított, gliadin izolátum adagolásával készült minták stabilitásának vizsgálatába kapcsolódtam be. A korábban elkészített gliadin izolátumos porkeverékek nem álltak rendelkezésemre a módszerekhez szükséges mennyiségben, így ezen minták vizsgálatát kihagytam. Két-két saját párhuzamos mérést végeztem a két kittel a 10 és 50 ppm gliadin tartalmú liofilezett tészta és sütemény mintákra, illetve egy-egy mérést használtam fel a korábbi vizsgálatokból.



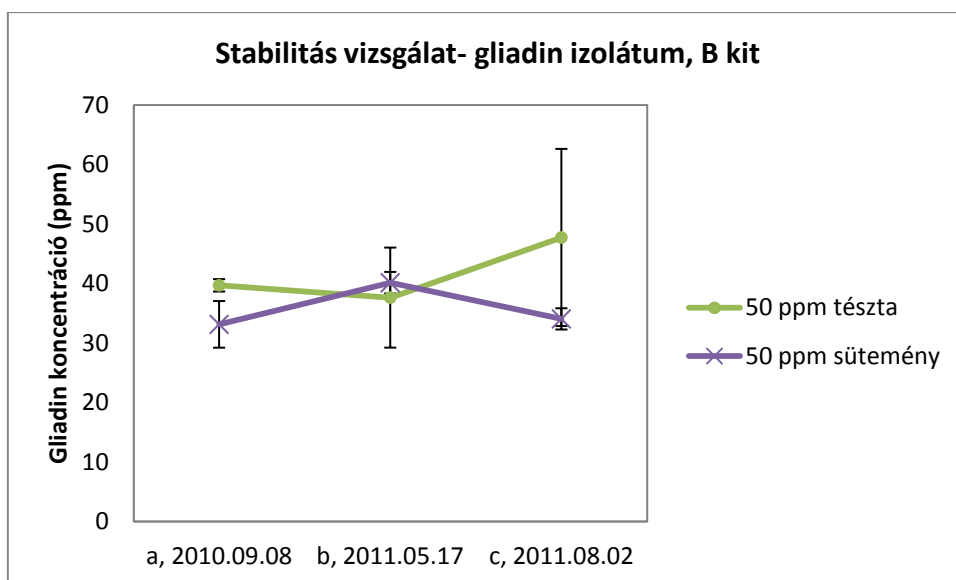
15. ábra: 10 ppm gliadin izolátummal készült minták stabilitása az A kittel



16. ábra: 50 ppm gliadin izolátummal készült minták stabilitása az A kittel



17. ábra: 10 ppm gliadin izolátummal készült minták stabilitása az B kittel



18. ábra: 50 ppm gliadin izolátummal készült minták stabilitása az B kittel

A 15-18. ábrák alapján a gliadin izolátummal készült modelltermék 10 és 50 ppm-es liofilezett tészta, illetve sütemény minták stabilnak mondhatók az „A” kit esetében 2011.05.11. és 2011.08.03 között a „B” kit esetében 2011.05.17. és 2011.08.02 között a kétféle kittel meghatározott gliadin tartalomra nézve. Statisztikailag értékeltem az eredményeket a mintákra kapott átlageredmények és szórásaik felhasználásával a 8. táblázatban.

Minták	„A” ELISA		„B” ELISA	
	F-próba	t-próba	F-próba	t-próba
10 ppm tészta	0,92	0,21	0,67	0,40
50 ppm tészta	0,77	0,59	0,26	0,22
10 ppm sütemény	0,55	0,64	0,13	0,16
50 ppm sütemény	0,57	0,72	0,95	0,0008

8. táblázat: Gliadin izolátummal készült termék stabilitására vonatkozó statisztikai táblázat

A statisztikai táblázatban látható, hogy az F- próba minden esetben nagyobb értéket eredményezett, mint 0,05. Így a különböző időpontban mért, azonos mintára vonatkozó párhuzamosok szórása egyenlőnek tekinthető. Ebből következik, hogy úgynevezett homoscedasztikus kétmintás t-próba végezhető. A t-próbák alapján megállapíthatjuk, hogy többnyire nincs szignifikáns különbség 95%-os konfidenciaszinten az azonos minta típusok várható értéke között a különböző időpontokban (egyik ELISA kit esetében sem), kivéve az 50 ppm-es sütemény esetében a „B” kittel való mérésnél (pirossal jelölve a statisztikai táblázatban). Összességében azonban stabilnak tekinthetők a minták mindkét módszer esetében.

Továbbá összehasonlítottam az általam készített mérések egyikét, a 2010 őszén végzett mérőssorozatok eredményeivel, amelyeket szintén a 15-18. ábrákon szemléltetnek. A 9. táblázatban található a két időpontban kapott átlagos eredmények statisztikai összehasonlítása:

Minták	„A” ELISA		„B” ELISA	
	F-próba	t-próba	F-próba	t-próba
10 ppm tészta	0,0375	0,0173	0,17	0,0159
50 ppm tészta	0,22	0,0022	0,0013	0,45
10 ppm sütemény	0,20	0,32	0,52	0,69
50 ppm sütemény	0,26	0,61	0,23	0,69

9. táblázat: Gliadin izolátummal készült termék stabilitására vonatkozó statisztikai táblázat

A statisztikai értékelés azt igazolta, hogy a sütemények egy adott módszerrel azonos értéket eredményeztek ebben a két időpontban is, míg a liofilezett tésták esetében szignifikánsan különböző gliadin koncentrációk jöttek ki, kivéve az 50 ppm-es téstánál.

Tehát kijelenthető, hogy a gliadin izolátummal készült modelltermékek gliadin koncentrációjára vonatkozó stabilitása a két módszer esetében régebbi méréssel összehasonlítva már csak a süteményekre teljesül. Az ilyen típusú téstákról pedig elmondható, hogy az általam végzett mérések alapján stabil, de a régebbi méréssel összehasonlítva instabil (szignifikáns különbség mutatkozik). Ebből az következik, hogy a korábban bebizonyított homogenitási feltételek teljesülése mellett a stabilitás szempontjából is alkalmas referenciaanyag-jelölt modellterméknek a sült termék.

6.2 Komplex fehérje forrással készült referenciaanyag-jelölt modelltermék fejlesztése

A korábbi kutatásban fejlesztett gliadin izolátumot tartalmazó referenciaanyag jelölttel szemben az általam készített modelltermék esetében egy komplex fehérje összetételű gliadinforrást, standard lisztet alkalmaztam. Ez a referenciaanyag jelölt termék jobban modellezi a hétköznapi életben előforduló allergén vizsgálatra került minták összetételét. A modelltermék a lisztben előforduló fehérjefrakciók mindegyikét tartalmazza, amely hatással lehet a gliadin tartalom immunanalitikai mennyiségi meghatározására (gliadin kölcsönhatása a kísérő komponensekkel, más fehérjék kioldása az extrakció során, amelyek hasonló szekvenciájú és térszerkezetű epitóppal rendelkeznek stb.).

6.2.1 A kívánt gliadin koncentráció eléréséhez szükséges liszt mennyiség kiszámításának módszere

Az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint először nedvessikér-tartalmat határoztam meg szabvány szerint. Majd szintén szabvány szerinti szárazsikér-tartalom meghatározást végeztem szárítószekrény használatával. A kapott eredményeket a gliadin forrásként használt standard lisztre a 10. táblázatban mutatom be.

Standard liszt	Tára	Tára + nedves sikér	Nedves sikér (%)	Tára + száraz sikér	Száraz sikér (%)
Párhuzamos1	48,3518	51,5288	31,77	49,4146	10,628
Párhuzamos2	58,7926	61,8779	30,853	59,8268	10,342
Párhuzamos3	55,8887	59,0466	31,579	56,9373	10,486
Párhuzamos4	53,943	57,1424	31,994	54,9975	10,545
Átlag			31,549		10,500

10. táblázat: A standard liszt nedvessikér- és szárazsikér-tartalma

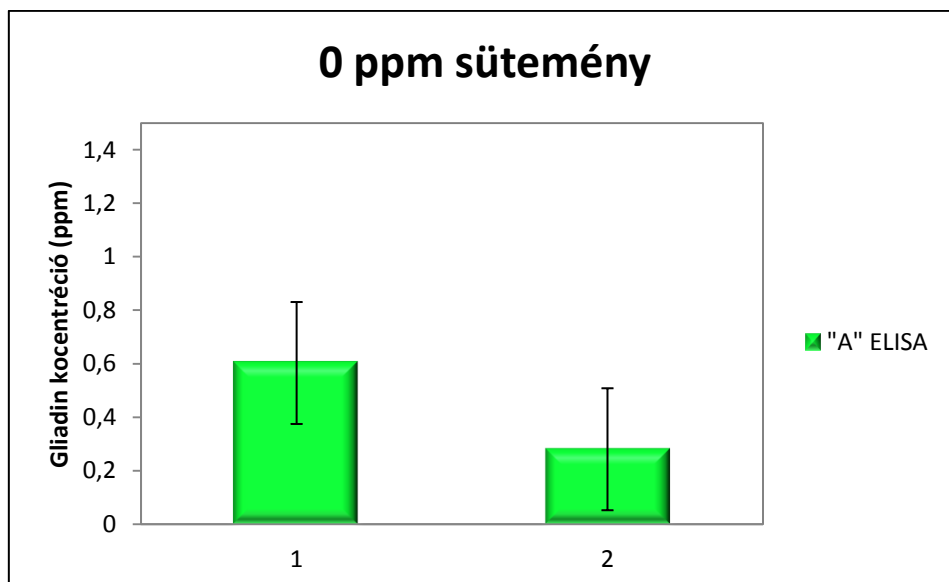
Az átlag eredmény alapján 100g standard lisztben 10,5 g szárazsikér van. Az irodalmi adatok szerint ennek fele a gliadin, tehát 5,25g. Ha már tudjuk a liszt átlagos gliadin tartalmát a kiindulási porkeverékünk mennyiségétől és az elérni kívánt elméleti gliadin koncentrációtól függően számítjuk a bemért liszt mennyiségét.

6.2.2 Az alapanyagok gluténmentességének igazolása

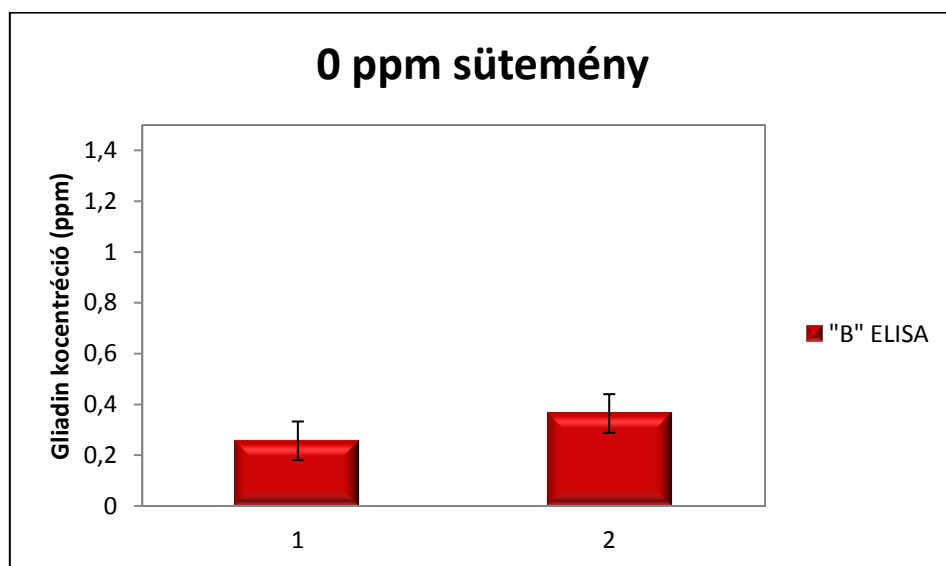
A standard liszttel készült modelltermékek gluténtartalmának deklarációsága csak akkor valósulhat meg, ha a használt alapanyagok gluténmentessége igazolható. Ennek ellenőrzése céljából vizsgáltam a standard lisztet nem tartalmazó porkeveréket, liofilezett tésztát és süteményt. Az eltérő feldolgozottságú termékek vizsgálatának oka egyrészt a száraz komponenseket tartalmazó porkeverék összetevőinek, illetve hozzá adagolt margarin és víz

gluténmentességének igazolása, másrészt annak a bizonyítása, hogy a technológiai lépések során keresztszennyeződés és egyéb hiba nem történt. Így a modelltermék készítési folyamat utolsó lépését jelentő sütés után is gluténmentesnek tekinthetők a minták.

A süteményekre kapott eredmények a két módszerrel a 19.-20. ábrán látható:



19. ábra: 0 ppm-es sütemény allergénmentességének igazolása, „A” kit



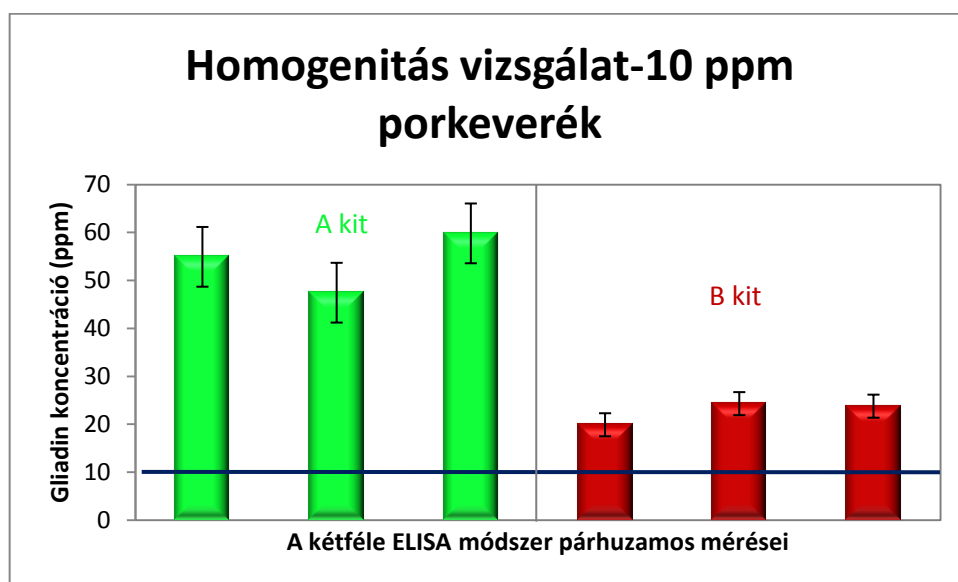
20. ábra: 0 ppm-es sütemény allergénmentességének igazolása, „B” kit

A használt ELISA módszerek kimutatási határa (LoD) 0,3 illetve 1,5 ppm gliadin, így a minták abban az esetben gluténmentesek analitikailag, ha ezen kimutatási határ alatt van a mért gliadin koncentráció. Ez a feltétel egy-egy kiugró értéket leszámítva teljesül a mintákra (19.-20. ábra + 5. melléklet 41-44. ábrái). Annak érdekében, hogy elkerüljem a tesztek beazonosíthatóságát, nem áll módomban a mért értékekhez tartozó LoD-ket megadni. A módszerek meghatározási határai (LoQ) 2 illetve 2,5 ppm gliadin. A mintáink esetében a mért koncentrációk néhány esetben a kimutatási határ felett, de egy kivétellel (gliadinforrást nem

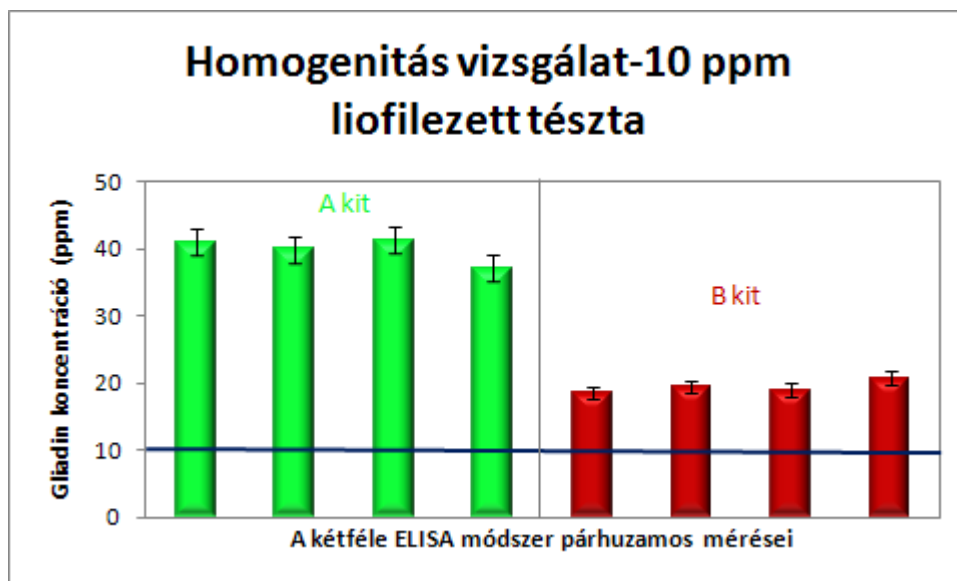
tartalmazó liofilezett tészta) a meghatározási határ alatt vannak. Így ebben az esetben is teljesül az analitikai gluténmentesség kritériuma.

6.2.3 A komplex fehérje forrással készült modelltermékek homogenitásának vizsgálata

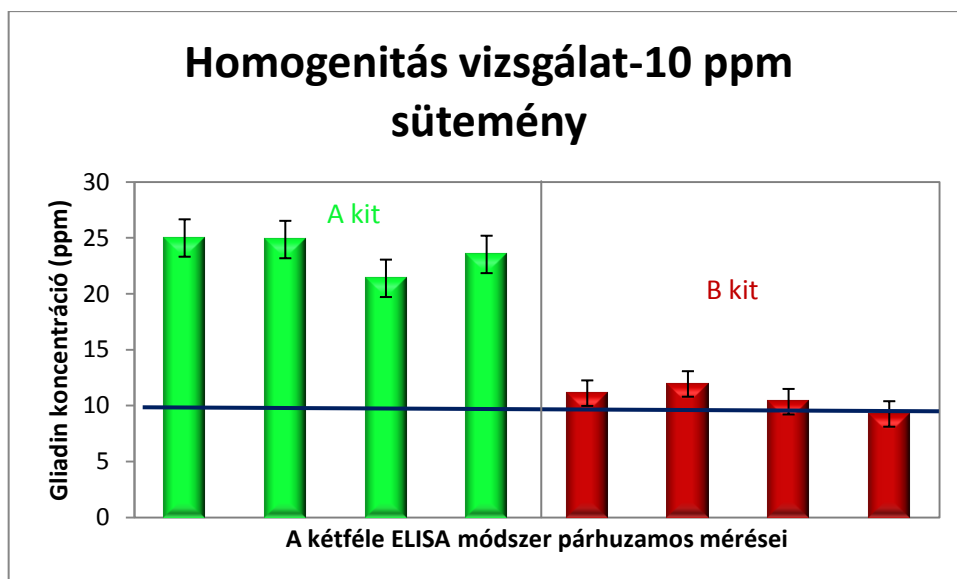
A referenciaanyagokkal szemben támasztott követelmények miatt a modellterméknek vizsgáltam a homogenitását. Mivel a fejlesztendő referenciaanyag mintamátrixa saját készítésű, így meg kellett bizonyosodnom mind a porkeverékek, mind a liofilezett tészták, mind a sütemények gliadintartalmának homogenitásáról. Az egyes 10 ppm-es mintatípusokra a két kit által szolgáltatott eredmények a 21-23. ábrákon láthatók.



21. ábra: 10 ppm gliadin tartalmú porkeverék homogenitás vizsgálata



22. ábra: 10 ppm gliadin tartalmú líofilezett tézta homogenitás vizsgálata

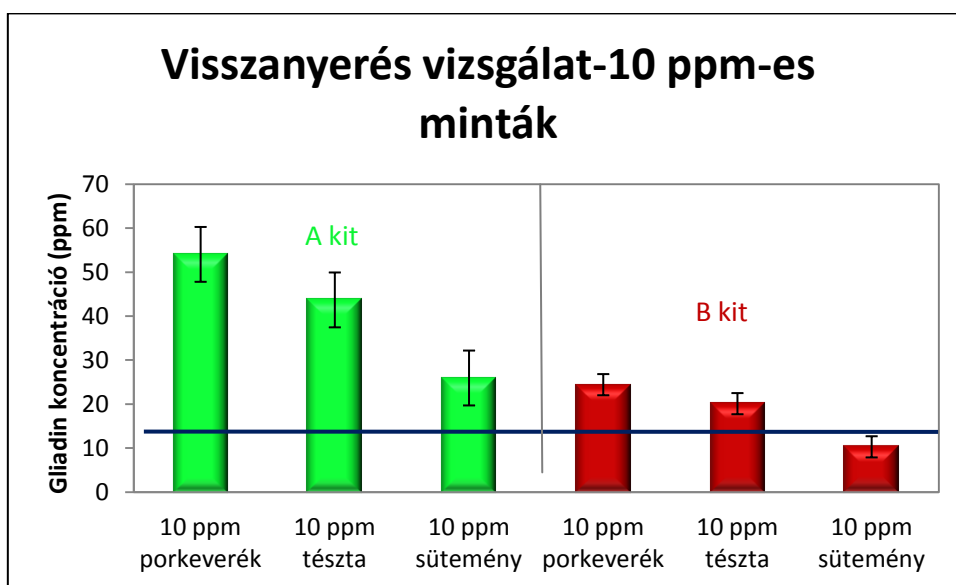


23. ábra: 10 ppm gliadin tartalmú sütemény homogenitás vizsgálata

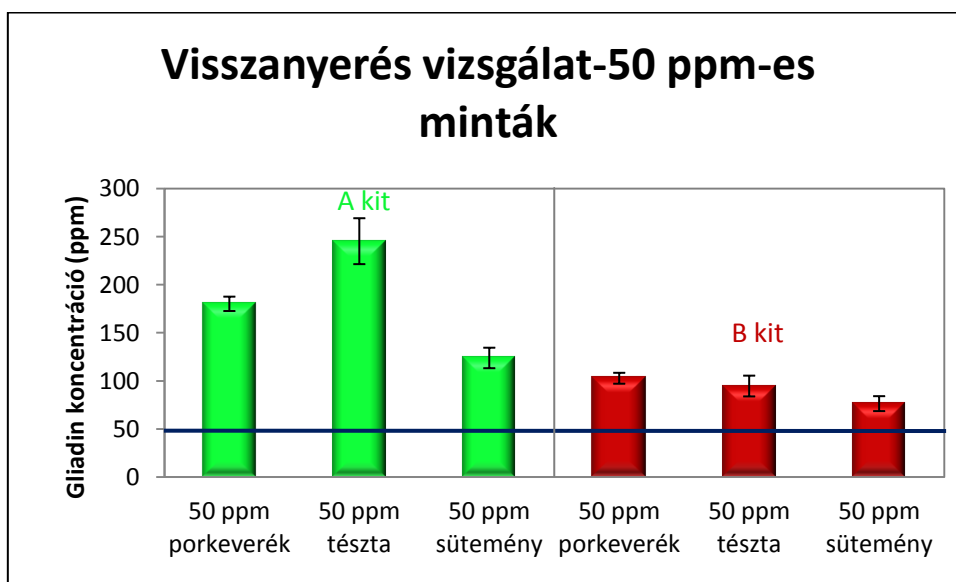
A 21-23. ábrák alapján elmondható, hogy a 10 ppm gliadin koncentrációjú és különböző feldolgozottsági szintű minták mindegyikénél a gliadin homogén eloszlása megvalósult egy adott ELISA módszer esetében, hiszen szignifikáns különbség a párhuzamosok között. Az is megállapítható, hogy a két kit által szolgáltatott eredmények viszont szignifikáns különbséget mutatnak, de ezek tárgyalásáról később lesz szó. Az 50 ppm allergén tartalmú mintáim szintén homogénnek bizonyultak (5. melléklet, 45-47. ábrák). A homogenitás megfelelőnek bizonyult, így folytathattam tovább a modelltermék referenciaanyagként történő alkalmazhatóságának alátámasztását, az egyéb követelmények (pl.: visszanyerés, stabilitás) vizsgálatával.

6.2.4 A gliadin visszanyerésének megbízhatósága a modelltermékből

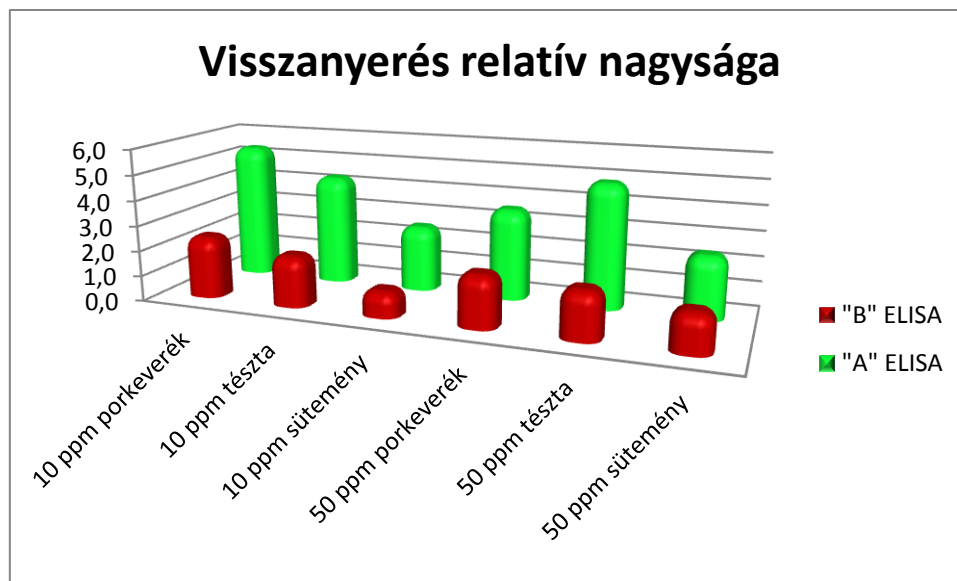
Az allergén tartalom megbízható visszanyerése fontos kérdés, mivel a visszamért értéket a jövőben referencia értéként kívánjuk felhasználni körvizsgálatok, módszerfejlesztés és módszervalidálás során. Ennek következtében igen fontos, hogy a mért adatok minél jobban megközelítsék az elméleti értéket. Mivel az előzőekben bebizonyítottam az egyes mintatípusokban a homogén gliadin eloszlást innentől kezdve a párhuzamosok átlagértékét vizsgálom. A 10 és 50 ppm elméleti gliadintartalmú mintákból kapott visszanyerés értékeket a 24-25. ábrákon szemléltetem.



24. ábra: A 10 ppm elméleti gliadin koncentrációk visszanyerése



25. ábra: Az 50 ppm elméleti gliadin koncentrációk visszanyerése



26. ábra: Az elméleti gliadin koncentráció visszanyerésének relatív nagysága

A 24. és a 25. ábrán látszik, hogy az elméleti gliadin koncentrációkhoz képest mindkét koncentrációnál, minden mintatípusra, mindkét módszer esetében jelentősen nagyobb gliadin koncentrációt mértem. A relatív visszanyerést is ábrázoltam (26. ábra), hogy jobban látható legyen, hogy az egyes módszerekkel kapott koncentrációk hányszorosai az elméleti koncentrációnak.

A 26. ábrán jól látható, hogy az „A” ELISA módszerrel a sütemények elméleti koncentrációjának kétszeresét mértem, míg a porkeverék és a liofilezett tészta esetében 3 illetve 5-szörös koncentrációkat is kaptam. A „B” ELISA módszerek a sütemény 1 és másfélszeres míg a többi minta estében kétszeres eredményt mutattak az elméleti koncentrációhoz képest.

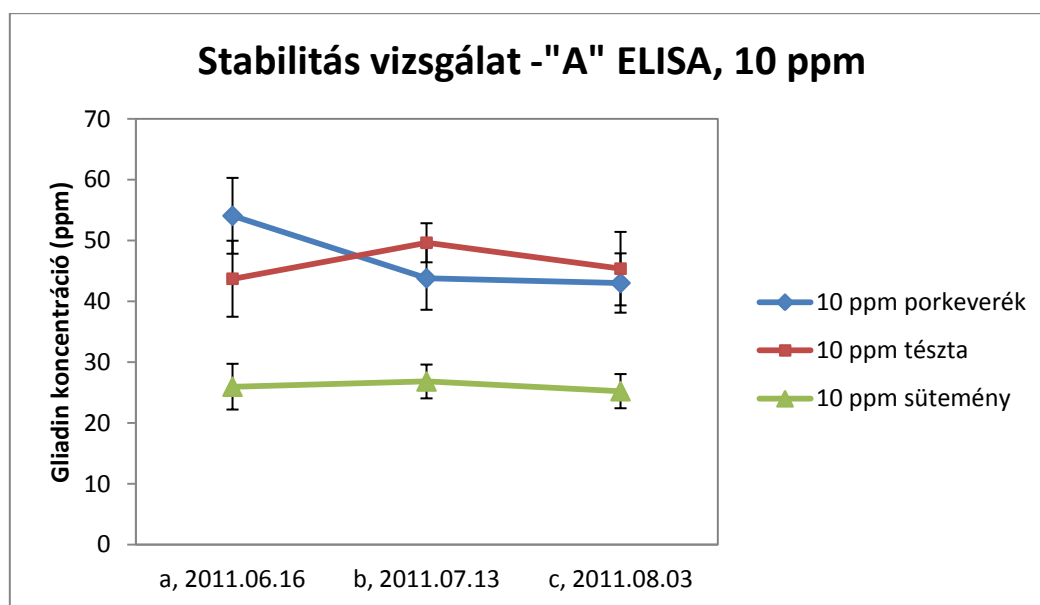
Ennek több lehetséges oka is van. Az egyik, hogy a modelltermékekhez szükséges 10 illetve 50 ppm gliadin koncentrációnak megfelelő standard liszt mennyiségét annak száraz sikér tartalmából számítottam ki. A rendelkezésre álló jelenlegi mérési protokollok szerint a száraz sikér megközelítőleg 1:1 arányban tartalmazza a gliadin és glutenin fehérje alegységeket. Tehát már a hozzáadott standard liszt mennyiségének meghatározásánál bekövetkezhetett a hiba, ha a standard lisztben a gliadin és glutenin fehérjék aránya az 1:1-től eltér. Továbbá okozhatta a jóval nagyobb koncentrációk visszamérését az ELISA módszereket előkészítő extrakció során más fehérjék kioldása is a standard lisztes modelltermékből. Ugyanis a standard lisztben a gliadin mellett jelen vannak más fehérjecsoportok, amelyek rendelkezhetnek olyan vagy hasonló epitóppal, mint a gliadin, amelyeket az ELISA módszereknél gliadin meghatározásra alkalmazott antitestek szintén megköthetnek.

A jelenség igazolására a későbbi kutatásokban vizsgálni fogjuk az alkalmazott gliadin források összetételét elválasztás technikai módszerekkel.

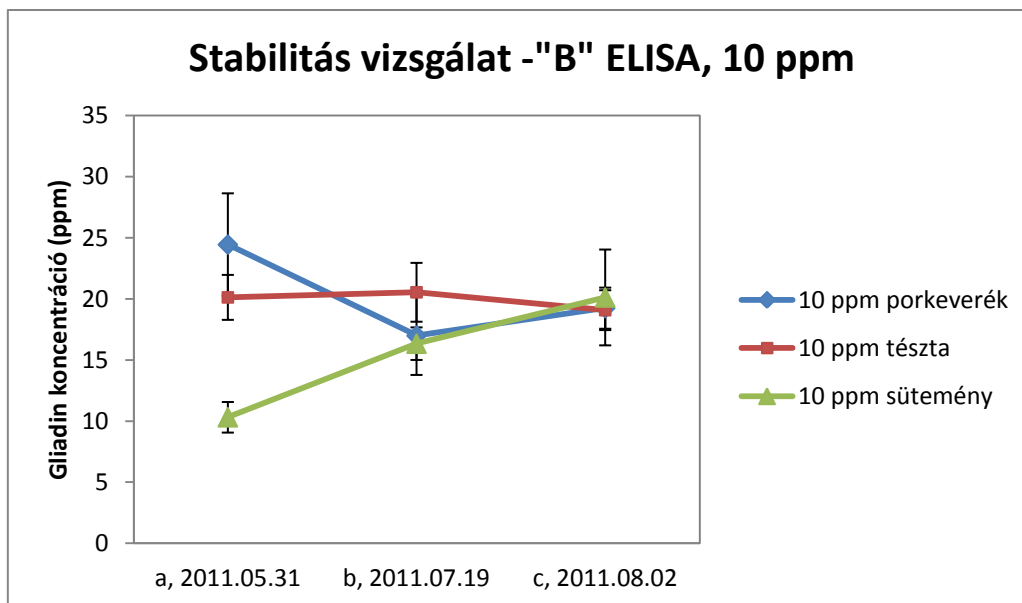
6.2.5 A standard liszttel készült modelltermék gliadintartalmának stabilitás-vizsgálata

A modelltermék referenciaanyagként történő alkalmazásának szintén feltétele a tárolás és szállítás alatti stabilitás. Tehát igazolnom kell, hogy a standard liszttel készült modelltermékek egy adott mintájára az idő függvényében ugyanazzal az immunanalitikai módszerrel vizsgálva statisztikailag azonos gliadin koncentrációt kapok. Az általam készített referenciaanyag-jelölt mintákat szobahőmérsékleten, sötétben tároltam. Ezeket a mintákat havonta megmértem a kétféle ELISA módszerrel, majd statisztikai módszerek segítségével igazoltam a minták stabilitását.

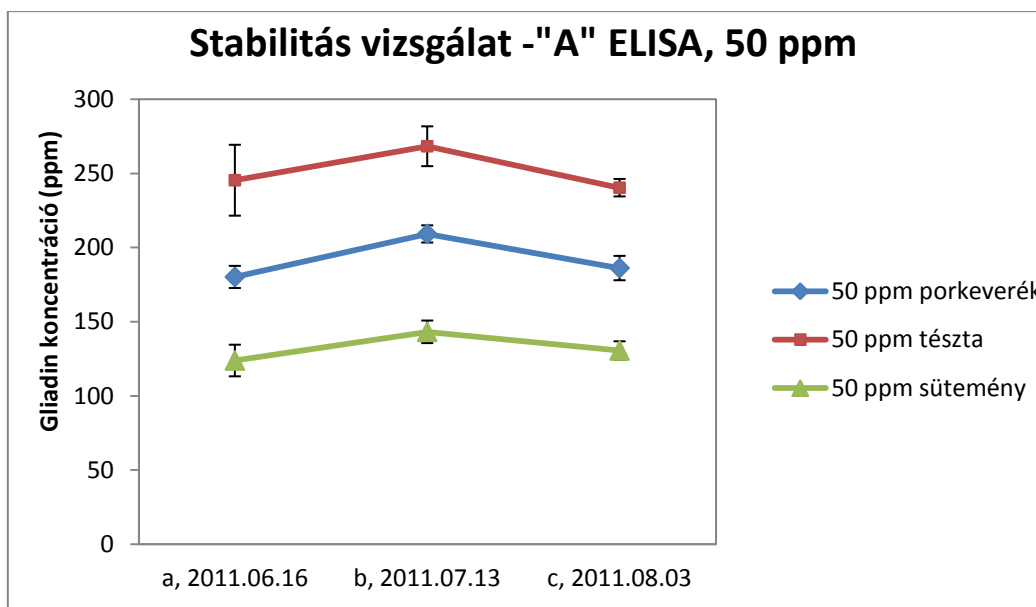
A 27-30. ábráig láthatók az egyes eltérő gliadin tartalmú modelltermék minták gliadin koncentrációjának változásai az idő múlásával.



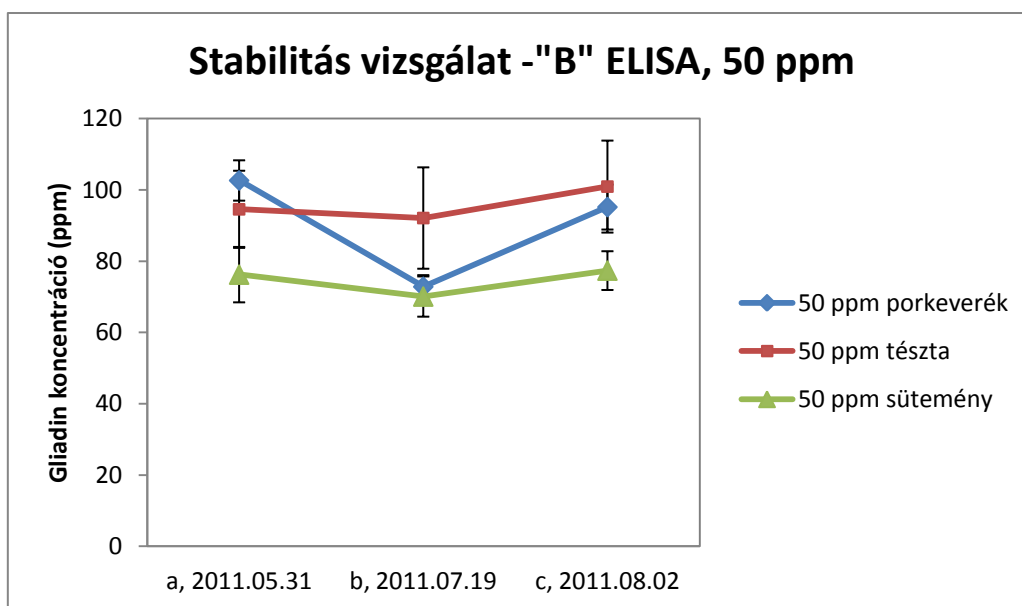
27. ábra: 10 ppm-es minták stabilitás vizsgálata "A" ELISA módszerrel



28. ábra: 10 ppm-es minták stabilitás vizsgálata "B" ELISA módszerrel



29. ábra: 50 ppm-es minták stabilitás vizsgálata "A" ELISA módszerrel



30. ábra: 50 ppm-es minták stabilitás vizsgálata "B" ELISA módszerrel

A négy ábra alapján a porkeverék mutat jelentős koncentrációváltozásokat negatív irányba mindkét ELISA módszer esetében. A liofilezett tészta mindkét koncentrációnál, mindkét módszer esetében, minden időpontban stabil. A sütemény a négy ábra alapján három esetben teljesen stabil az idő függvényében, de a „B” ELISA kittel végzett mérés esetén növekvő tendenciát mutat, amelynek magyarázatára további vizsgálatok szükségesek.

A előző bekezdésben említettek igazolására elvégzem az egy-egy hónapban mért azonos minták szórásának felhasználásával az F-próbát (háromféle párba állítás lehetséges, egyet itt, kettőt a 6. mellékletben, 15. és 16. táblázatokban lehet megtekinteni). Az F-próba eredményétől függően eltérő t-próbákkal folytattam az értékelést, amelyek segítségemre lesznek a minták stabilitásának eldöntésében. A 11. táblázatban 2011 májusa 2011 júliusa között a két kittel végzett mérések összehasonlítására láthatók a próbák eredményei, pirossal a 95%-os konfidenciaszinten szignifikánsan különböző eredmények.

Minták	„A” ELISA		„B” ELISA	
	F-próba	t-próba	F-próba	t-próba
0 ppm porkeverék	0,39	0,28	0,23	0,39
0 ppm tészta	0,59	0,20	0,0179	0,44
0 ppm sütemény	0,74	0,21	0,0133	0,51
10 ppm porkeverék	0,82	0,09	0,70	0,0289
10 ppm tészta	0,30	0,12	0,61	0,77
10 ppm sütemény	0,48	0,65	0,61	0,00001
50 ppm porkeverék	0,48	0,0016	0,39	0,0001
50 ppm tészta	0,37	0,13	0,99	0,79
50 ppm sütemény	0,43	0,0029	0,21	0,09

11. táblázat: Standard lisztrel készült termék stabilitására vonatkozó statisztikai táblázat

Összességében a két módszer eredményei alapján kijelenthető, hogy standard liszttel készült porkeverékek gliadintartalma instabil. A liofilezett tészták mindegyike stabil gliadintartalmú, bár nagyok a szórásaik, amelyből az következik, hogy a két időpontban mért nagyobb koncentráció-különbség esetén sem észlelünk szignifikáns különbséget. A sütemények esetében egy-két szignifikáns különbség volt észlelhető az összes többi stabilnak tekinthető és a szórás értékek is kisebbek, mint a liofilezett tésztánál. Ezek alapján referenciaanyag jelöltnek a standard liszttel készült sütemény a továbbiakban is alkalmas lehet.

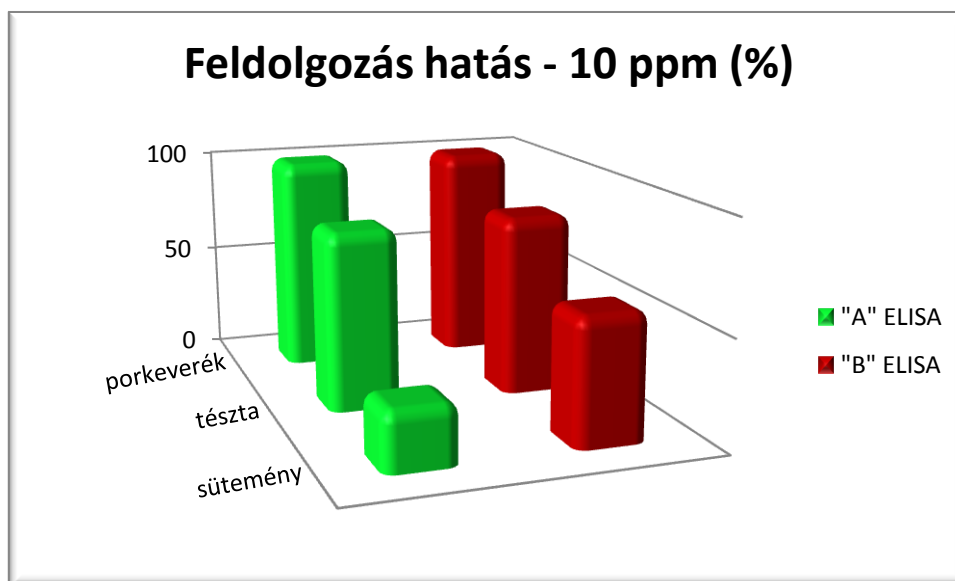
6.2.6 A feldolgozási folyamatok egyes lépéseinek a mérhető gliadin tartalomra gyakorolt hatásának szemléltetése

Az általam előállított referenciaanyag feldolgozott, reális élelmiszermatrixban tartalmaz deklarált mennyiségben standard lisztet, amely összetevői között szerepel az allergén fehérje is. Mivel az irodalomban ilyen típusú mintamatrixot még nem vizsgáltak, fontos tudnunk a mátrixhatás, tésztakészítés (hidratáció) és a hőkezelés analitikai eredményekre gyakorolt hatását. Két különböző ELISA teszt állt rendelkezésemre, amelyek segítségével vizsgáltam, hogy ezen hatások a mért koncentrációkban hogyan jelentkeznek.

Mindkét koncentrációsinten (10 és 50 ppm) tanulmányoztam a standard liszttel készült porkeverékeket, liofilezett tésztákat és a süteményeket is. Megvizsgáltam, hogy a porkeverék eredményeihez képest %-osan hogyan változtak a tészták illetve a sütemények visszanyerés értékei

Minták	"A" ELISA		"B" ELISA	
	Átlag	Szórás	Átlag	Szórás
10 ppm porkeverék	54,06	6,24	24,45	4,20
10 ppm tészta	43,71	6,25	20,13	1,84
10 ppm sütemény	25,97	3,76	10,32	1,25

12. táblázat: 10 ppm-es eltérő feldolgozottsági szintű mintákra kapott átlageredmények és szórásaik

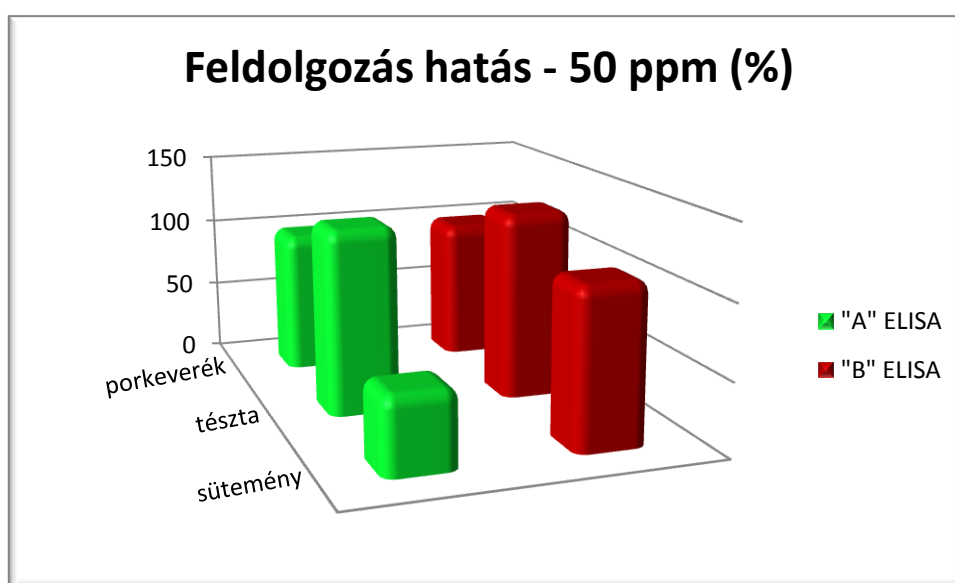


31. ábra: Feldolgozás hatása az analitikai eredményekre a 10 ppm-es mintáknál

A 10 ppm-es minták vizsgálatakor kapott eredmények alapján (31. ábra) jól látható, hogy a tészta gliadin koncentrációja kisebb, mint a porkeveréké, valamint a technológia szempontból fontos lépés, a sütés után drasztikus csökkenés áll be a mérhető gliadintartalomban. Elmondható továbbá, hogy a sütemény mért gliadin értékeiben bekövetkezett csökkenés mértéke nem ugyanolyan az ELISA tesztek esetében.

Minták	"A" ELISA		"B" ELISA	
	Átlag	Szórás	Átlag	Szórás
50 ppm porkeverék	180,16	7,47	72,85	3,27
50 ppm tészta	245,40	23,90	92,13	14,22
50 ppm sütemény	123,81	10,66	70,10	5,64

13. táblázat: 50 ppm-es eltérő feldolgozottsági szintű mintákra kapott átlageredmények és szórásaik



32. ábra: Feldolgozás hatása az analitikai eredményekre a 50 ppm-es mintáknál

Az előzőekkel ellentétben az 50 ppm-es mintákkal végzett mérések esetében (32. ábra) a két ELISA módszernél a tészta mért gliadin tartalma nagyobb, mint a porkeveréké (ez valószínűleg mérési hiba). A sütemény allergén fehérjetartalma csökkent a sütés hatására. Ezen csökkenés mértékének változatossága ebben az esetben is jól látható.

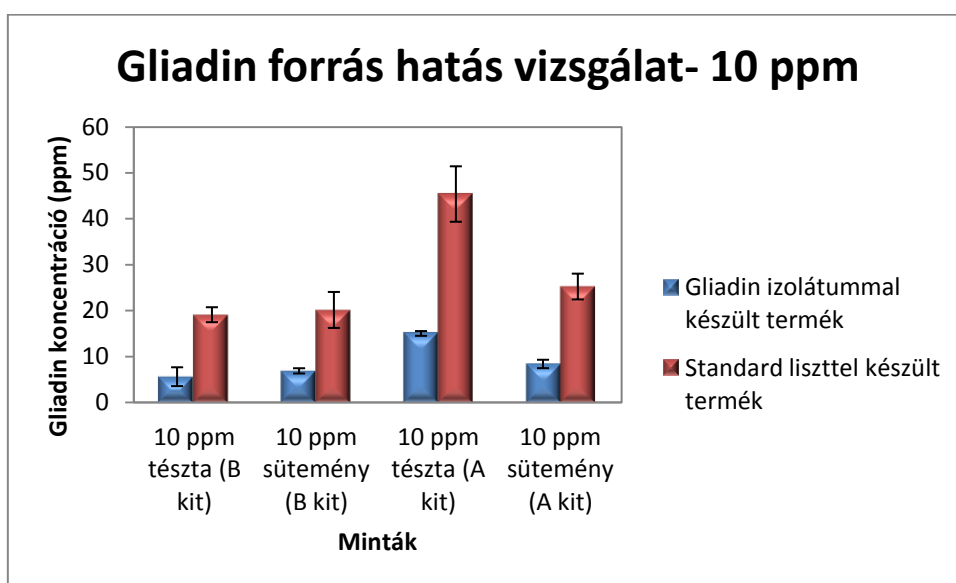
A változások, a mérhető koncentrációk csökkenése több önálló, illetve egymással összefüggő, egymás mellett lejátszódó folyamat együttes eredménye lehet:

- A mérendő fehérje hődenaturációja a sütés hőmérsékletén (180 °C) jelentős lehet.
- A szerkezetváltozás következtében megváltozhat a fehérjék oldhatósága, mely elsősorban az alkalmazott módszerek mintaelőkészítésének kidolgozásánál jelenti majd a fejlesztés szükségességét. Láthatóan ugyanis a mérhető komponenstartalom oly mértékben csökken, hogy ez a validálás eszközeivel nem kezelhető, a módszer véletlen szórásánál lényegesen nagyobb mértékű változást jelent. Mivel az egyes tesztek mintaelőkészítési lépései eltérnek, a csökkenés mértékében mutatkozó változatosság oka lehet az extrakciók különbözősége.
- Magasabb hőmérséklet hatására a fehérjék és más összetevők között reakciók játszódhatnak le, nagyobb méretű és eltérő fizikai-kémiai tulajdonságú komplexek alakulnak ki. Értелеmszerűen ezek is befolyásolhatják a fehérjék extrahálhatóságát, melynek módszertani következményeit az előző pontban említettem.
- A hőkezelés okozhatja a mérendő fehérje szerkezetének olyan irányú változását, mely az allergénaktivitás változásával jár. Egyes irodalmak pl. kimutattak fehérjehidrolízis hatására bekövetkező allergén aktivitás-változást. Ez itt is elképzelhető, hiszen ha a konformációs csoport szerkezete változik, az antitest-antigén kapcsolódás is gátolt lehet. Ez már analitikai fejlesztés kérdése, hiszen az immunanalitikai elven működő tesztek lényegét érinthetik.
- A fentiek mellett felmerülhet még, hogy ha az analitikában alkalmazott módszereknél immunkativitás változást mérünk, ehhez hasonló hatás a szervezetben is jelentkezhet. Tehát hogy pontosan milyen fehérjét, illetve allergén hatást mérünk adott analitikai módszerrel, az önmagában is szép kutatási téma, és természetesen összefügg az ezen a területen folyó diagnosztikai módszerek fejlesztésével és érinti a klinikai vizsgálatok tervezését is. Természetesen ezzel foglalkoznak egyes kutatócsoportok.
- A fehérje szerkezetmódosulása mellett okozhatja még a detektálható fehérje koncentráció csökkenését a mintaelőkészítés (pl. extrakció), valamint az alkalmazott analitikai módszer hibája (pl. alkalmazott antitest).

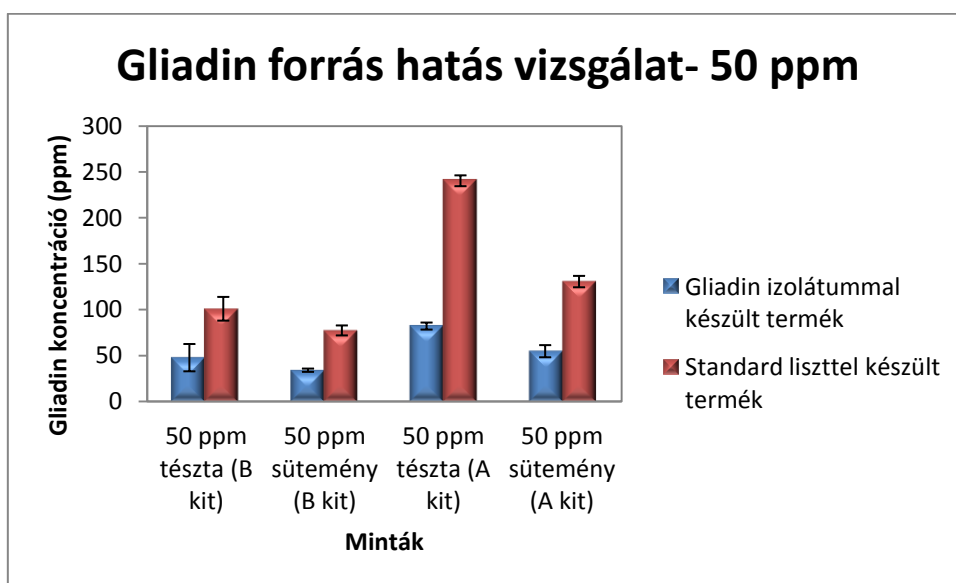
Azon jelenség oka, hogy a 10 ppm-es tészták koncentrációértékei kisebbek, míg az 50 ppm-es tészták mért eredményei nagyobbak mint a porkeveréké, nem ismert. Ennek feltárása további kutatásokat igényel.

6.3 Gliadin forrás hatásának vizsgálata a mérhető gliadin tartalomra

A korábbi és az általam kifejlesztett gliadint meghatározott mennyiségben tartalmazó referenciaanyag jelölt modelltermékek segítségével lehetőségem nyílt annak vizsgálatára, hogy a különböző gliadin források használata hatással van-e a mérhető allergén fehérjetartalomra.

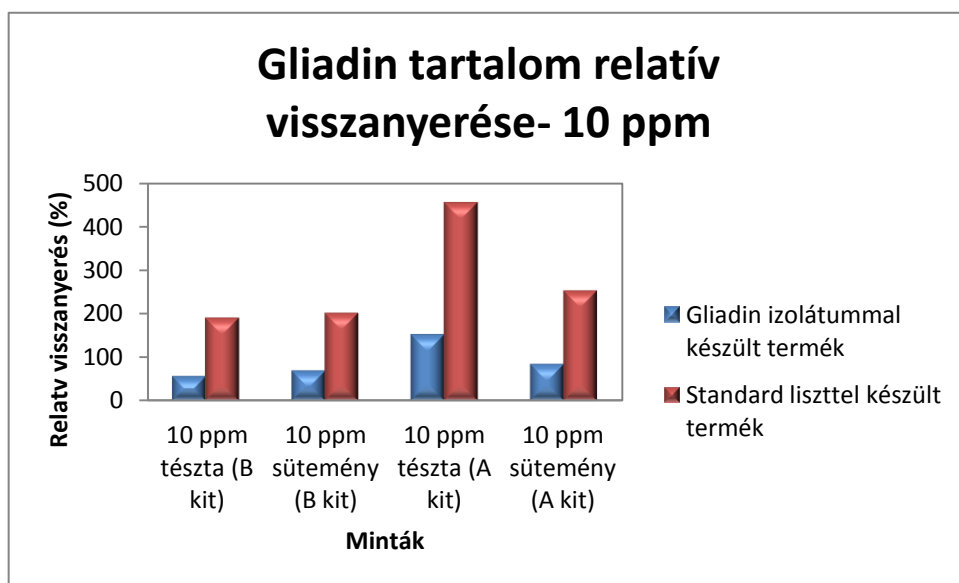


33. ábra: 10 ppm-es különböző gliadin forrású minták összehasonlítása

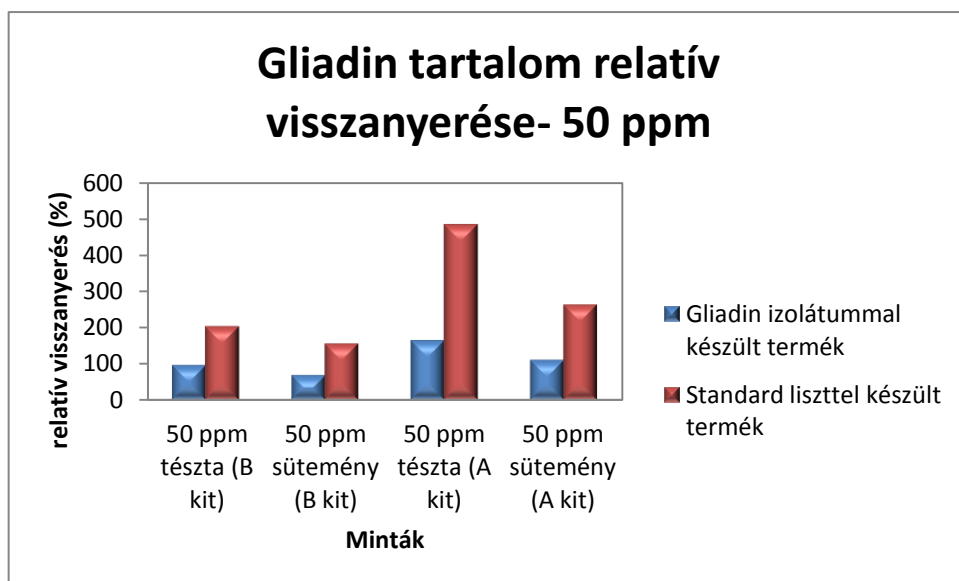


34. ábra: 50 ppm-es különböző gliadin forrású minták összehasonlítása

A 33. és 34. ábrán egyértelműen látszik, hogy szignifikáns különbség van a gliadin izolátummal, illetve a standard liszttel készült (ugyanolyan elméleti gliadin koncentrációval rendelkező) modelltermékek detektálható allergén-tartalma között. A standard liszttel készült termékek esetében többszörös gliadintartalmat detektálunk az elméleti gliadin koncentrációhoz képest. Ezt számos tényező okozhatja: a lisztben lévő kísérő komponensek zavaró hatása, keresztreakciók, extrakció során zavaró komponensek közül való kioldódás, a szükséges standard liszt mennyiségének száraz sikejéből való számítás, a gliadin:glutenin 1:1 arányú összetételének feltételezése stb. A relatív visszanyerés ábrázolása:



35. ábra: A 10 ppm elméleti gliadin koncentráció %-os visszanyerése



36. ábra: Az 50 ppm elméleti gliadin koncentráció %-os visszanyerése

Az ábrákon (35. és 36. ábra), a gliadin izolátummal készült termékek elméleti gliadin tartalmának visszanyerése többnyire 100% alatti mindkét módszer esetében, míg a standard lisztes mintánál 200% körüli, illetve ennél magasabb visszanyeréseket is tapasztaltam.

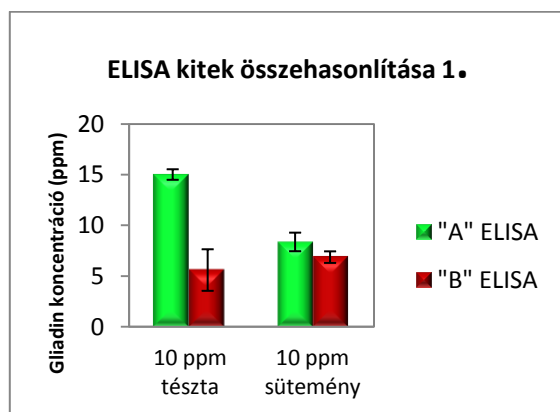
Megfigyelhető, hogy a standard liszttel készült minták két módszer szolgáltatott eredményei az elméleti koncentrációk közötti 5-szörös különbséget szinte tökéletesen visszaadják (a 10 ppm-es mintákra mért koncentráció értékek 5-szöröse az 50 ppm-es mintákra kapott koncentráció értékek, egy kivétellel), míg ez a gliadin izolátumosnál csak 50%-os arányban teljesül a két kit esetében (14. táblázat).

Minta-típusok	Az 50 ppm és 10 ppm elméleti gliadin koncentrációjú mintákra a két módszer által kapott eredmények hányadosa (50 ppm /10 ppm)			
	Standard liszttel készült minták		Gliadin izolátummal készült minták	
	"A" ELISA	"B" ELISA	"A" ELISA	"B" ELISA
porkeverék	4,33	4,95	-	-
tészta	5,30	5,29	5,47	8,54
sütemény	5,18	3,84	6,55	4,96

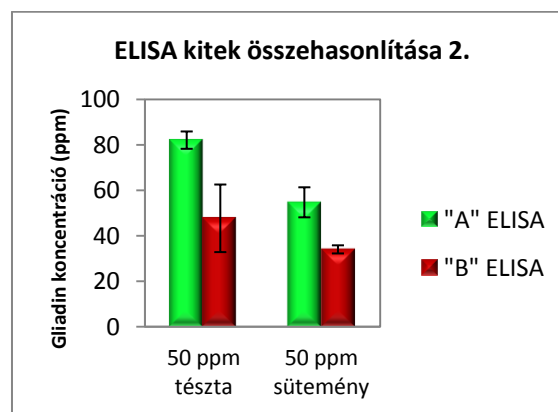
14. táblázat: Egy adott mintatípus elméleti gliadin koncentrációinak 5-szörös különbségének visszanyerése a módszerekkel kapott eredmények hányadosával

6.4 A kétféle ELISA kit által szolgáltatott azonos mintára vonatkozó eredmények összevetése

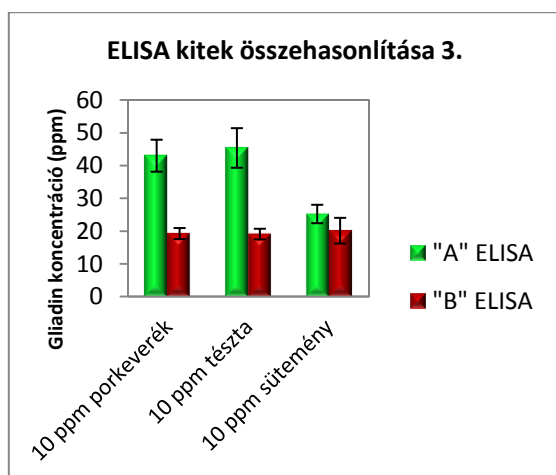
Kísérleteim során sikerült kifejlesztenem egy olyan feldolgozott (hőkezelt) élelmiszer mátrixot, mely homogén eloszlásban, deklarált mennyiségben tartalmazott gliadin fehérjét. Az irodalomban nem találhatók olyan kísérletek, ahol gliadin tartalmú feldolgozott mátrixszal végeztek ELISA tesztek, így ennek eredményei újdonságnak számítanak. A különböző ELISA kitek gyártóinak segítségével lehetőségem nyílt arra, hogy ugyanazon mintákat vizsgálhassam két különböző ELISA módszerrel.



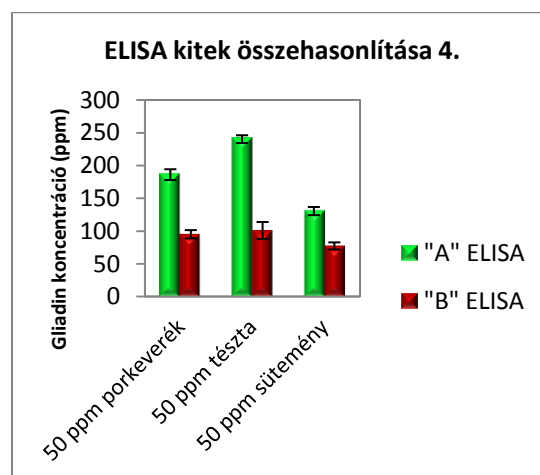
37. ábra: 10 ppm-es gliadin izolátummal készült minták eredményei a két kittel



38. ábra: 50 ppm-es gliadin izolátummal készült minták eredményei a két kittel



39. ábra: 10 ppm-es standard lisztrel készült minták eredményei a két kittel



40. ábra: 50 ppm-es standard lisztrel készült minták eredményei a két kittel

A 37-40. ábrákon megállapítható, hogy a kétféle módszer egy-két kivételtől eltekintve megközelítőleg azt a tendenciát mutatja, hogy az A kit által szolgáltatott eredmények kétszeresei a B kit által szolgáltatottak. Továbbá a standard lisztrel készült mintákra egységesen nagyobb gliadin koncentrációt mutatnak a módszerek, a gliadin izolátummal készült mintákhoz képest.

Az élelmiszerek gluténtartalmának meghatározása élelmiszerbiztonsági szempontból kiemelten fontos kérdés. A vizsgálataim eredményei azt mutatják, hogy a jelenleg kereskedelmi forgalomban kapható ELISA módszerek változatos eredményeket szolgáltatnak mind az egyes mintatípusok, mind az egyes koncentrációk esetében. Ezen probléma megoldása a betegek biztonságának, a gyártók támogatásának és a szabályozás betarthatóságának érdekében a jövőbeni kutatások részét kell képezze.

6.5 Konklúzió

Kutatómunkám eredményeit összegezve elmondható, hogy a korábbi kutatáshoz képest sikerült kifejlesztenem egy újabb modellterméket, amely feldogozott mátrixban adott mennyiségben tartalmazza az összes búzafehérje alegységet. Ezen modelltermék a mindennapi életben előforduló élelmiszerminták összetételét jobban tükrözi, mivel gliadinforrásként lisztet alkalmaztam. A bemérendő sikermennyiség meghatározására a szárazsíkér tartalmat mértem szabványos módszerrel. Megjegyzem, hogy a modelltermék készítésénél továbbra is a valamennyi kitnél – egyébként helytelenül – alkalmazott 1:1 gliadin/glutenin arányt használtam, egyébként a visszamérés meghatározása, a referenciaanyaggal kapott eredmények helyessége nem ellenőrizhető. Az ebből származó

analitikai hiba jellemzése a fehérjeösszetétel pontos ismeretét igényli, mely munkám folytatásának meghatározó célkitűzései között szerepel.

A modelltermék gliadintartalmának homogén eloszlása az új modelltermékben is megvalósult. Vizsgáltam a feldolgozási folyamat mérhető gliadintartalomra gyakorolt hatását. Azt tapasztaltam, hogy a sütés hatására a mérhető gliadintartalom csökkent a tésztához, illetve a porkeverékhez képest. A jelenség pontos háttere még nem tisztázott, okozhatja fehérjedenaturáció, hőkezelés hatására bekövetkező kémiai reakciók, megváltozott oldhatóság vagy immunaktivitás.

Továbbá a standard lisztrel készült modelltermék esetén nagyobb koncentráció eredményeket detektáltam az immunanlitikai módszerekkel, mint a gliadin izolátummal készült esetében. Ennek egyik lehetséges oka a gliadin mellett a lisztben lévő egyéb komponensek.

Összességében elmondható, hogy sikerült olyan feldolgozott modellmátrixot létrehozni, mely referenciaanyagként használható gliadin, mint allergén fehérje mennyiségi meghatározására, a biológiai variabilitás meghatározásához, analitikai módszerek fejlesztéséhez, illetve validálásához.

7 Összefoglalás

Munkámban élelmiszertermékek gliadin, illetve sikértartalmának immunanalitikai módszerekkel történő meghatározásával kapcsolatos fejlesztésekkel foglalkoztam. Fő célkitűzésem a jelenleg rendelkezésre álló módszerek jellemzése, valódi élelmiszermátrixokban történő alkalmazhatóságának vizsgálata, illetve az ebből adódó korlátok és megoldandó problémák azonosítása volt. A kutatás fő iránya a korábban fejlesztett, meghatározott gliadintartalmú, gliadin-izolátummal készült termékhez képest, a mindennapi életben előforduló realisabb élelmiszermátrixt jelentő feldolgozott referenciaanyag laboratóriumi szintű kidolgozása volt. Az új termékben gluténforrásként standard búzalisztet alkalmaztam, melynek előnye a gliadin izolátum használatával szemben, hogy a liszt minden egyéb fehérjéje komponensét tartalmazza. A kutatómunka egy EU keretprogram támogatásával futó nemzetközi együttműködéshez (MoniQA NoE) kapcsolódik.

A reális mintamátrix modellezésére gluténmentes liszt alapú, rögzített összetételű sütött tésztákat (süteményeket) alkalmaztam. Kísérlettervet építettem fel a modelltermék gliadintartalmának homogenitás, visszanyerés és stabilitás vizsgálatára. Emellett a modelltermék előállítás egyes lépéseinek analitikai eredményekre gyakorolt hatását tanulmányoztam a különböző feldolgozási lépésekben (keverés, tésztakészítés, sütés) vett minták analízisével. A vizsgálatokat két, kereskedelmi forgalomban kapható gliadin meghatározására alkalmas immunanalitikai módszer segítségével végeztem, melyekkel kapott eredmények összehasonlító elemzését szintén elvégeztem. Munkám jelenlegi fázisának összegzéseként igyekeztem következtetéseket levonni a korábban csak gliadint tartalmazó és az általam előállított komplex búza-fehérjemátrix beépítésével készült modelltermékekkel kapott analitikai eredmények között tapasztalható eltérést. Az eredmények értékelése statisztikai módszerek használatával történt.

Munkám legfontosabbnak tartott eredménye, hogy sikerült kifejlesztenem olyan feldolgozott modellterméket, mely a gliadint meghatározott mennyiségben tartalmazza. Ennek módszere a standard liszt száraz siker tartalmának szabványok szerinti meghatározása volt, melyből számíthattam a szükséges liszt mennyiséget a kívánt elméleti gliadin koncentráció eléréséhez. A búzafehérjék homogén eloszlása megvalósult. A modelltermék stabilitása is kielégítőnek bizonyult, bár értelemszerűen csak két hónap állt rendelkezésemre ennek vizsgálatára. A gliadin izolátummal készült modelltermék gliadintartalmának mennyiségi eredményeihez hasonlítva a standard lisztes termékre magasabb koncentrációkat mértem, Ennek oka egyrészt a gliadintartalom számításának ismert pontatlansága lehet, másrészt

elképzhető, hogy a komplex fehérjemátrix tartalmaz az alkalmazott antitestekkel reagáló egyéb frakciókat is. Ez az immunanalitika alkalmazásának egyik legnagyobb jelenlegi problémája, melyek tisztázásához hozzájárulhat a munkámban fejlesztett referenciaanyag fehérjeösszetételének pontos elemzése. A referenciaanyag segítségével tulajdonképpen először nyílt lehetőség különböző kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kitek analitikai szempontból korrekt összehasonlító elemzésére reális élelmiszer mátrix esetében. Bár mennyiségi értelemben a mért értékek között jelentős eltérést kaptam, a mért értékek tendenciája az egyes gyártási fázisban mért eredmények esetében azonos volt. A visszanyerési értékekből és a mérések ismétléséből számítható analitikai teljesítményjellemzők (pontosság, precizitás) azt mutatják, hogy az alkalmazott immunanalitikai módszerek változatos eredményeket szolgáltatnak az azonos mintatípusok esetében, valamint minden módszer különbségeket mutat az eltérő mátrixú és feldolgozottsági szintű minták között. Ezen eltérések hátterében alapvetően az analitikai módszereknél alkalmazott eltérő antitest (vagyis eltérő specifitás) áll. Emellett természetesen, a különböző mintaelőkészítési eljárások, a fehérjedenaturáció különböző mértékű megjelenése (pl. az oldhatóságváltozás, a konformációváltozásból adódó immunaktivitás csökkenés, kölcsönhatás más komponensekkel) is magyarázatul szolgálhat. Az okok pontos tisztázása és a hatások mértékének megállapítása a jövő feladata.

A fenti jelenségek azonosítása, hátterének feltárása mind a módszerek validálása, mind alkalmazási területeinek meghatározása szempontjából, sőt ezen túlmutatóan a táplálkozástani hatások tisztázása okából is szükséges. A hatások tipizálásával, direkt és indirekt analitikai eszközök és módszertan alkalmazásával legalább részben azonosítani kívánjuk a mért fehérje koncentrációk eltérésének okait. Ehhez valószínűsíthetően az immunanalitikai módszerek mellett más mérés technikák, RP-HPLC, HPLC-MS használatának bevezetése is szükséges lehet. Emellett tervezzük allergiát kiváltó fehérje komponensek búza fajtákban lévő mennyiségi eltérésének, variabilitásának vizsgálatát és az ebből eredő analitikai hiba nagyságrendjének megállapítását.

Eredményeink hozzájárulhatnak a jelenleg széleskörűen alkalmazott immunanalitikai módszerek validálási protokolljának, valamint az analitikai módszertan és annak meghatározó részét képező mintaelőkészítési lépések fejlesztéséhez.

8 Irodalomjegyzék

- [1] <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Allergies>
- [2] Sohi D K, Warner J O. Understanding allergy. *Pediatrics and Child Health*. 2008; 18 (7): 301-308
- [3] Scott H S, Donald Y M L. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2008. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009; 123 (2): 319-327
- [4] Bohle B, Vieths S. Improving diagnostic tests for food allergy with recombinant allergens. *Methods*. 2004; 32: 292-299
- [5] Scott H S, Hugh A S. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010; 125 (2): 116-125
- [6] Ortolani C, Pastrello E A. Food allergies and food intolerances. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2006; 20 (3): 467-483
- [7] Besler M. Determination of allergens in foods. *Internet Symposium on Food Allergens, Trends in analytical chemistry*. 2001; 662-672
- [8] Taylor S L, Helge S L. Food Allergies and Other Food Sensitivities. *Food technology*. 2001; 55 (9): 470-475
- [9] Hugh A S. Food allergy. Immunopathogenesis and clinical disorders. *The Journal Of Allergy And Clinical Immunology*. 1999; 103 (5): 717-728
- [10] Falus A, Búzás E, Rajnavölgyi É. *Az immunológia alapja*. Semmelweis Kiadó. 2007
- [11] Erdei A, Gergely J, Rajnavölgyi É, László G, Sármay G. *Immunbiológia*. Medicina Könyvkiadó Rt. 2006; 48-51, 68-76, 329-337
- [12] <http://www.eufic.org/article/hu/egeszseg-es-eletmod/elelmiszerallergia-es-intolerancia/artid/kozeppontban-elelmiszer-allergenek/>
- [13] Hischenhuber C, Crevel R, Jarry B, Mäki M, Moneret-Vautrin D A, Romano A, Troncone R, Ward R. Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Aliment Pharmacol & Therapeutics*. 2006; 23: 559–575
- [14] Battais F, Courcoux P, Denery-Papini S, Kanny G, Moneret-Vautrin D A, Popineau Y. Food allergy to wheat: differences in immunoglobulin E-binding proteins as a function of age or symptoms. *Journal of Cereal Science*. 2005; 42: 109–117
- [15] Bindslev-Jensen C, Ortolani C, Ottolenghi A, Pastorello E A, Pravettoni V, Robino A, Scibilia J, Scovena E, Zisa G. Wheat allergy: A double-blind, placebo-controlled study in adults. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006; 117: 433-439

- [16] Takács K. Főbb gabonaallergének immunanalitikai kimutatása, Doktori értekezés, 2008
- [17] Dr Tömösközi S. Fehérjék izolálása és tisztítása, biokémiai laborgyakorlat jegyzet 2007/08 1. félév
- [18] Stephen P J. National Institutes of Health Consensus Development Conference on Celiac Disease. June 28–30, 2004; *Gastroenterology*. 2005, 128 (4): 1-9
- [19] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=celiac>
- [20] Martucci S, Biagi F, Di Sabatino A, Corazza G R. *Digestive and Liver Disease*. 2002, 34: 150-153
- [21] K. E. A. Lundin *Digestive and Liver Disease*, Volume 34, Issue 3, March 2002, 238-242
- [22] Kati K, Andrew S L, Simon J M, Henry A, Fabienne C, Luigi G, Paul J C, Ludvig M S, Jukka P, and the Members of the European Genetics Cluster on Celiac Disease. HLA Types in Celiac Disease Patients not Carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) Heterodimer: Results From the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Human Immunology*. 2003; 64 (4): 469-477
- [23] 40/2008. (IV. 3.) FVM-SZMM együttes rendelet az élelmiszerek jelöléséről szóló 19/2004. (II. 26.) FVM-ESzCsM-GKM együttes rendelet módosításáról. *Magyar Közlöny*. 2008. évi 55.szám
- [24] Codex Standard For Foods For Special Dietary Use For Persons Intolarent To Gluten. Codex Alimentarius. Codex Stan 118-1979.Revised in 2008
- [25] A Bizottság 41/2009/EK Rendelete (2009. január 20.) a lisztérzékenységekben szenvedőknek szánt élelmiszerek összetételéről és címkézéséről. Az Európai Unió Hivatalos Lapja, L16/3. 2009
- [26] Panshin A, Shihmanter E, Weisman Y, Örvell C, Lipkind M. Variability of antigenic epitopes of the fusion protein of Newcastle disease virus 1998; 21 (1): 51-63.
- [27] <http://www.landfood.ubc.ca/courses/fnh/301/protein/protq4.htm>
- [28] Herbert W. Chemistry of gluten, *Food Microbiology*. 2007; 24 (2): 115-119
- [29] Hetty C van den Broeck, Ludovicus J W J G, Marinus J M S, Ingrid M van der Meer, Rob J H. Dough quality of bread wheat lacking a-gliadins with celiac disease epitopes and addition of celiac-safe avenins to improve dough quality. *Journal of Cereal Science*, 2011; 53 (2): 206-216
- [30] Oszvald M. A búza tartalékfehérjék tulajdonságainak in vitro és in vivo vizsgálata rizs modell rendszerben, Doktori értekezés, 2007
- [31] Lásztity, R. *The Chemistry of Cereal Proteins*, CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo 1996

- [32] Skerritt J H, Hill A S, Andrews J L. Antigenicity of Wheat Prolamins: Detailed Epitope Analysis using a Panel of Monoclonal Antibodies. *Journal of Cereal Science*. 2000; 32 (3): 259-279
- [33] Nicole H P, Paul R H, Gunnar H, Fast and efficient characterization of an anti-gliadin monoclonal antibody epitope related to celiac disease using resin-bound peptides. *Journal of Immunological Methods*. 2011; 365 (1-2): 174-182
- [34] Herbert W. Comparative investigations of gluten proteins from different wheat species. 1999
- [35] Demeulemester C, Giovannacci I, Leduc V. 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. 2006; 219-243
- [36] Taylor S L, Nordlee J A. Detection of Food Allergens. *Food Technology*. 1996; 50 (5): 231-234, 238
- [37] Koppelman S J, Hefle S L. *Detecting allergens in food*. Woodhead Publishing in Food Science and Technology. 2006
- [38] [<http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC419/ToolBox/elisa3.jpg>]
- [39] Geertruida A P-T, Jakob K, Aart van Amerongen. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey; *Anal Bioanal Chem* 2009; 393:569–582
- [40] [http://www.iah.bbsrc.ac.uk/press_release/2008/images/LFD.jpg]
- [41] Becker W-M, Reese G. Immunological identification and characterization of individual food allergens, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2001; 756 (1-2): 131-140
- [42] *Molekuláris biológia és diagnosztika jegyzet, 2010/2011 1. félév*
- [43] Török K. Gliadin meghatározásra alkalmas ELISA módszerek összehasonlítása, a validálás feltételrendszerének javítása, *Diplomamunka*, 2010
- [44] [http://intmedweb.wfubmc.edu/grand_rounds/1999/Image15.jpg]
- [45] [http://www.immbio.hu/hu/oktatas/immunologia_alapjai/gyakorlatok_2010/gyak_2010_06_hun.pdf]
- [46] R van Eckert, Bond J, Rawson P, Klein Ch L, Stern M, Jordan T W. Reactivity of gluten detecting monoclonal antibodies to a gliadin reference material. *Journal of Cereal Science*. 2010; 51 (2): 198-204
- [47] Abbott M, Hayward S, Ross W, Godefroy S B, Ulberth F, A J van Hengel, Roberts J, Akiyama H, Popping B, Yeung J M, Wehling P, Taylor S L, Poms R E, Delahaut P.

- Validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods: Community guidance and best practices *Journal of AOAC International*. 2009; 93 (2): 442–450
- [48] Linda M, Angelo V. Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens. *Trends in Analytical Chemistry*. 2009; 28 (5): 581-591
- [49] Food Allergens. MoniQA Position Paper. 2007: 27-28
- [50] Langó T, Abonyi T. Ionizáltsági állapot hatásának vizsgálata az LC/ESI-MS alapú mennyiségi meghatározásra, BSc szakdolgozat, 2009
- [51] Jorge R M, Manuel L, María C M, Enrique M, Juan P A. A highly sensitive real-time PCR system for quantification of wheat contamination in gluten-free food for celiac patients, *Food Chemistry*, 2011; 128 (3): 795-801
- [52] Poms R E, Anklam E. Effects of Chemical, Physical, and Technological Processes on the Nature of Food Allergens. *Journal of AOAC International*. 2004; 87 (6): 1466-1474
- [53] Sathe S K, Teuber S S, Roux K H. Effects of food processing on the stability of food allergens. *Biotechnology Advances*. 2005; 23: 423-429
- [54] Wal J-M. Thermal processing and allergenicity of foods. *Allergy*. 2003; 58: 727-729
- [55] Moreno F J. Gastrointestinal digestion of food allergens: Effect on their allergenicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2007; 61: 50-60
- [56] Weqscheider W. Validation of Analytical Methods. Ed. Günzler H. Accreditation and Quality Assurance in Analytical Chemistry. Springer. 1996; 135-158
- [57] Tömösközi S. Laboratóriumok minőségbiztosítása, validálás. Előadás jegyzet. 2007
- [58] Poms R, Emons H, Anklam E. 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. 2006; 348-356
- [59] RIDASCREEN Fast Gliad. Használati útmutató
- [60] RIDASCREEN Gliadin. Használati útmutató
- [61] RIDASCREEN Gliadin Competitive. Használati útmutató
- [62] AgraQuant Gluten Assay (4-120 ppm). Használati útmutató
- [63] Haven Gluten-check Kit. Használati útmutató
- [64] Haven Gluten Kit. Használati útmutató
- [65] ELISA Systems Gliadin. Használati útmutató
- [66] BIOKITS Gluten Assay Kit. Használati útmutató
- [67] Veratox Quantitative Gliadin Test. Használati útmutató
- [68] Alert for Gliadin. Használati útmutató
- [69] Wheat Protein ELISA Kit (Gliadin). Használati útmutató

- [70] http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/general_data/amino_acid_structures.asp
- [71] Scaravelli E, Brohée M, Marchelli R, van Hengel, A J. Development of three real-time PCR assays to detect peanut allergen in processed food products. European Food Research and Technology. 2008; 227:857-869
- [72] Adonyi Zs. Gliadin tartalmú referenciaanyag kidolgozása allergén analitikai módszerek fejlesztéséhez. TDK dolgozat. 2010
- [73] Kemény S, Deák A. Kísérletek tervezése és értékelése. Műszaki Könyvkiadó. 2000
- [74] MSZ ISO 5531, A búzaliszt nedvessikér-tartalmának meghatározása.1993
- [75] MSZ ISO 6645, A búzaliszt szárazsikér-tartalmának meghatározása.1993

1. Az egyes antitestek által felismert szekvenciák a különböző siker fehérje alegységekben

 α/β -gliadin [32]

γ -gliadin [32]

ω -prolamin [32]

Antibody	Alpha/Beta	Gamma	Omega	LM ₁ GS	HM ₁ GS
Selective for α , β and γ -gliadins					
22123	—	DCQVMRQQC	—	QQCSP, CQQLP	—
22205	—	—	—	CQQLPQ	—
22722	—	—	—	—	—
23009	—	DCQVMRQQC	—	CQQLPQ, QQCSPV	—
				GQCVSQ	
40406	—	DCQVMRQQC	—	CQQLPQ	GQGSRP
					GYPTS
80207	—	—	—	SPVAMPQRL	AAQLPAMCR
					VDQQLAGR
Binding γ and ω -gliadins, cross-reacting with B-LM ₁ GS					
12208	—	DCQVMRQQC	—	QQCSP, CQQLP	—
				GQCVSQ	
12224	—	RQQL, CQQL	—	CQQL, QQCS	—
80818	PQPFPSQQP	FPQQPQQP	FPFPQQP	LPQIPQQSR	—
			FPQ-----		
Major reaction with LM ₁ -GS, cross-reaction with gliadin					
21817	—	—	—	W/SQQQPLP	—
81405	YPQFPQ	QQPYFPQQPQ	PFRQLPKYI	IRAIYSII	YDPTSPQQ
	---S---	AIRSLVLQT	PQQPFPEES	GLERNQQ	
	-S-P-QP		PHQPQQFYA	QPFQWQQ	
				PLYRTT	
				VMTSIALRI	
82123	—	—	—	PFSQQQ	—
82208	QPFPPQQP	QPFPPQP	PQQPFPRQP	—	TSLQHTGQR
	---R---		-----L--		GQGQQPRQW
			-----Q--		----PGQRQ
			-----LK-Q		

Az első 3 csoport legjelentősebb epitópjai [32]

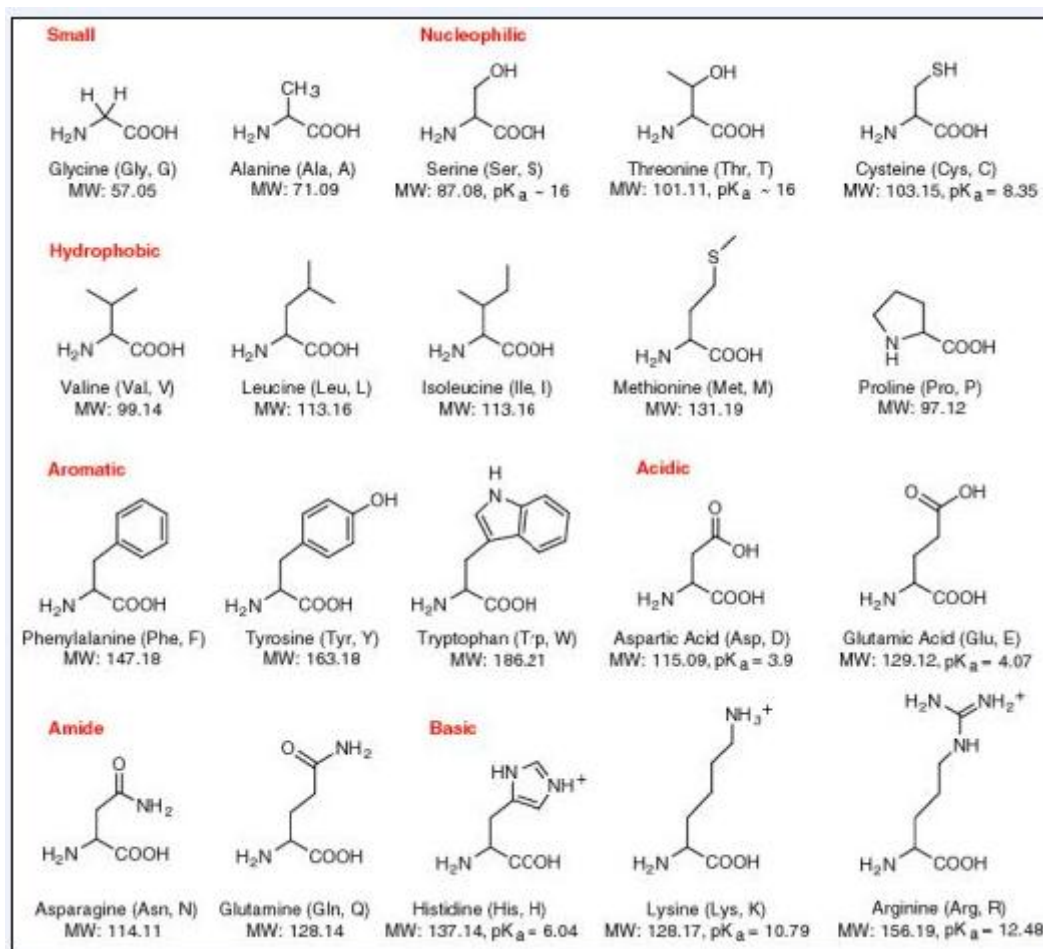
Antibody	Alpha/Beta	Gamma	Omega	LM,GS	HM,GS
23609	—	—	—	—	QRPGQGQQP -----G -Q-----RP
23724	—	QPQQPF	QPQQPF	—	QQPGQGQQ -R----- --A-----S -----R -----P --S----- --S--A-- --S-----S -LS-----R
30413	—	—	—	—	QRPGQGQQP -----G -Q-----RP
41201	—	—	—	—	QQGYPTS -S----- -P----- -Q-H----- -Q-H--A- GQGQGYYP R----- GK----- GQGQGHYP
80105	—	—	—	—	FGGQQ
80410	—	—	—	—	QEPGQGQG CERELQESS RQGSYYPGQ
80414	—	—	—	—	QQGYYP LQQLQGIF
80603	SFQPSQNP	QTFPQQQT -----T--P	QTFPPSQP	QTFPQQQT PSFSQQQPF	QQPATQLPT ATQLPTVCR TSPQQPGQL -----E -----S--L -----S--W ---L-L--G -----ES-- YYLTSPPQS -DP-----P PGV---R-G PSVTCPPQV GYYPGVTS PSVTSSQG PSVTSS PGETTPLQQ

A negyedik csoport legjelentősebb epitópjai [32]

Antibody	Alpha/Beta	Gamma	Omega	LM,GS	HM,GS
24311	QQQFPF	—	—	QQSFPF --Q-L-	—
24504	—	—	FPQQPQP	FSQQQPF	—
40116 consensus repeat variants	(bound degenerate forms of consensus repeat for each gliadin/ LM,GS) PQPQFFFPQPY LWQIPEQSR QQQQQ	QPQQPF QQPQQ, PFSQ ----IG-- NPLQPQQPF F----- I-Q----- V-----	FPQQFPQ --G----- ----SW- ----S----- QQPLFSQQ ---P-----	QQQFPF ---P--S PSFWQQQPF	QFAQGQGG
41223	LWQIPEQSR FPPQQPYFQ YPQPQPFPS YPSGQGSFQ FPH----- QFS-----	xxFSQQPQQT FPQ----- xxYP-----PL QFSQPQQF xxFPQQPQQPL QFPFPQP QPFSWQPQQ	xPFPQPQQPF x-----N xPPL----- xxFP-----IG xxSQQQQPPFWQ QLFPQQFSF xVLPQQPFFS	QPPFWQQQF xERFWQQQL xxxWQQQLPPQ xPFSQQQQFV	

Az 5. csoport legjelentősebb epitópjai [32]

2. A fehérjéket felépítő aminosavak



Aminosavak szerkezete és jelöléseik [70]

3. Validált módszerek analitikai teljesítményjellemzői definiálva

1. Szelektivitás, azonosság, specifikusság

A szelektivitás, az azonosság és a specifikusság azt mutatják meg, hogy a módszer milyen mértékben képes az adott alkotó (alkotók csoportjának) meghatározására egyéb alkotók jelenlétében. A módszer szelektív, ha több komponenst is mér, de a komponenseket megkülönbözteti. Specifikusságról pedig 100 %-os szelektivitás esetén beszélhetünk [57].

2. Kimutatási határ (Limit of Detection, LoD)

A kimutatási határ az a legkisebb koncentráció vagy mennyiség, amit a módszerrel megbízhatóan detektálni lehet. A kimutatási határ megadásánál probléma, hogy a detektálás valószínűsége nem ugrásszerűen változik 0-tól 1-re, hanem egy tartományon belül [57].

3. Meghatározási tartomány (Limit of Quantification, LoQ)

A meghatározási határ az a legkisebb koncentráció, amely még elfogadható pontossággal és precizitással határozható meg. Meghatározása történhet ismert koncentrációjú

minták segítségével felvett koncentráció és szórás összefüggés segítségével, vagy a kimutatási határból való becsléssel [57].

4. Mérési tartomány (Working range)

A mérési tartomány a mennyiségi meghatározás azon tartománya, amelyben az adott alkotó az analitikai feladatnál elvárt pontossággal és precizitással határozható meg. Alsó határa a meghatározási határ, felső határát a követelmények illetve az analitikai függvény tulajdonságai határozzák meg. Meghatározása az adott alkotót különböző koncentrációban tartalmazó minták elemzésével történik. Az alkotó analitikai jele és a koncentráció között nem feltétlenül szükséges lineáris összefüggés [57].

5. Lineáris tartomány (Linear range)

Az analitikai mérőgörbe abban a tartományban lineáris, ahol adott megbízhatósággal egyenesnek tekinthető. Meghatározása a lineáris regressziós együttható meghatározásával, regresszió-analízissel, vagy F-próba végzésével történhet. A munkatartomány linearitása nem feltétlenül követelmény [57].

6. Érzékenység (Sensitivity)

Az érzékenység a módszer válaszjelében bekövetkező legkisebb érzékelhető változáshoz tartozó koncentráció-különbség. Értéke a kalibrációs görbe meredekségével egyezik meg és a legkisebb négyzetek módszerével vagy kísérletileg különböző koncentrációjú minták segítségével határozható meg. Nem lineáris kalibrációs függvény esetén az érzékenység változik a koncentráció függvényében [57].

7. Pontosság, helyesség (Accuracy, Trueness)

A módszer pontossága, helyessége a kapott érték és a valódi érték egyezésének mértéke. A pontosság meghatározásának legjobb módszere, ha megfelelő hiteles referenciaanyagot elemzünk a módszerrel és összevetjük az elemzési eredményt a deklarált értékkel. Ha megfelelő referenciaanyag nem áll rendelkezésre, a helyesség becslése úgy is elvégezhető, hogy a mintához az elemzés megfelelő fázisában hozzáadjuk a vizsgált komponens ismert mennyiségét és vizsgáljuk a visszanyerést. A helyességet egy elfogadott módszer vagy más független eljárás eredményeivel történő összehasonlítás vagy laboratóriumok közötti összehasonlító vizsgálat alapján is meghatározhatjuk [57].

8. Precizitás (Precision)

A precizitás a mérés, a vizsgálat véletlenszerű változásait jellemző adat. Jellemzésére a szórás, a korrigált empirikus szórás valamint a relatív szórás alkalmazható. A precizitás különböző körülmények között is meghatározható:

- Ismétlőképesség: precizitás az ismétlőképesség körülményei között: azonos készülék, azonos személyzet, rövid idő
- Reprodukálhatóság: precizitás a reprodukálhatóság körülményei között:
 - Azonos módszer, eltérő laboratórium eltérő személyzet, hosszabb idő. Erre akkor van szükség, ha egy módszert több laboratórium is használ
 - Azonos módszer, azonos készülék, eltérő analitikus, hosszabb vizsgálati időszak [57].

9. Mérési bizonytalanság (Measurement uncertainty)

A mérési bizonytalanság egy szórás vagy konfidencia-intervallum, mely kifejezi az eredmények lehetséges tartományát. Tartalmaz minden előforduló hatást, a bizonytalansági tényezőket a hibaterjedés szabályai szerint kombinálja. A mérési bizonytalanság meghatározásánál számos paramétert kell figyelembe venni: pl. a precizitást, a szórást, a valódi értéktől való eltéréseket és ezek bizonytalanságát, a kalibráció bizonytalanságát, valamint egyéb tényezőket (pl.: hőmérséklet, idő, stb.) [57].

10. Robosztusság (Robustness, Ruggedness)

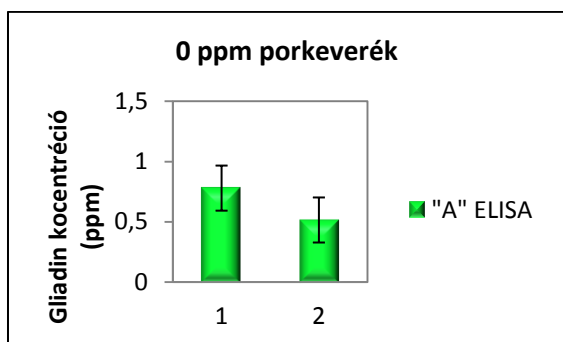
A robosztusság-vizsgálat az analitikai módszer egyes lépései során bekövetkező véletlen ingadozások szerepét vizsgálja a pontosságra, az ismétlőképességre, a visszanyerésre, valamint a módszert jellemző egyéb paraméterekre. A vizsgálat célja, hogy megismerjük a módszer kritikus lépéseit, a kritikus faktorokat és az így szerzett ismeretek segítségével javítsuk a módszert [57].

4. Az ELISA kitékkel vizsgált minták táblázata

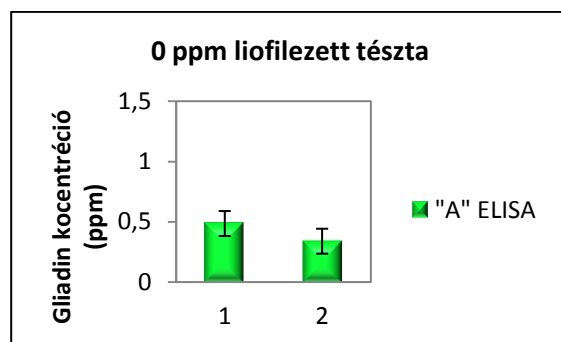
Minták	Romer Labs		R-Biopharm	
	Gliadin izolátummal készült modeltermék	Standard liszttel készült modeltermék	Gliadin izolátummal készült modeltermék	Standard liszttel készült modeltermék
1	0 ppm sütemény	0 ppm porkeverék	0 ppm porkeverék	0 ppm porkeverék
2	0 ppm sütemény	0 ppm porkeverék	0 ppm porkeverék	0 ppm porkeverék
3	10 ppm liofilezett tészta	0 ppm liofilezett tészta	0 ppm liofilezett tészta	0 ppm liofilezett tészta
4	10 ppm liofilezett tészta	0 ppm liofilezett tészta	0 ppm liofilezett tészta	0 ppm liofilezett tészta
5	10 ppm liofilezett tészta	0 ppm sütemény	0 ppm sütemény tészta	0 ppm sütemény
6	10 ppm liofilezett tészta	0 ppm sütemény	0 ppm sütemény tészta	0 ppm sütemény
7	10 ppm liofilezett tészta	10 ppm porkeverék	10 ppm porkeverék	10 ppm porkeverék
8	10 ppm liofilezett tészta	10 ppm porkeverék	10 ppm porkeverék	10 ppm porkeverék
9	10 ppm liofilezett tészta	10 ppm porkeverék	10 ppm porkeverék	10 ppm porkeverék
10	10 ppm liofilezett tészta	10 ppm porkeverék	10 ppm porkeverék	10 ppm porkeverék
11	10 ppm liofilezett tészta	50 ppm porkeverék	50 ppm porkeverék	50 ppm porkeverék
12	50 ppm liofilezett tészta	50 ppm porkeverék	50 ppm porkeverék	50 ppm porkeverék
13	50 ppm liofilezett tészta	50 ppm porkeverék	50 ppm porkeverék	50 ppm porkeverék
14	50 ppm liofilezett tészta	50 ppm porkeverék	50 ppm porkeverék	50 ppm porkeverék
15	50 ppm liofilezett tészta	10 ppm liofilezett tészta	10 ppm liofilezett tészta	10 ppm liofilezett tészta
16	50 ppm liofilezett tészta	10 ppm liofilezett tészta	10 ppm liofilezett tészta	10 ppm liofilezett tészta
17	50 ppm liofilezett tészta	10 ppm liofilezett tészta	10 ppm liofilezett tészta	10 ppm liofilezett tészta
18	50 ppm liofilezett	10 ppm liofilezett tészta	10 ppm liofilezett tészta	10 ppm liofilezett tészta
19	50 ppm liofilezett	10 ppm liofilezett tészta	10 ppm liofilezett tészta	10 ppm liofilezett tészta
20	50 ppm liofilezett	50 ppm liofilezett tészta	50 ppm liofilezett tészta	50 ppm liofilezett tészta

21	10 ppm sütemény	50 ppm liofilezett tészta	50 ppm liofilezett tészta	50 ppm liofilezett tészta
22	10 ppm sütemény	50 ppm liofilezett tészta	50 ppm liofilezett tészta	50 ppm liofilezett tészta
23	10 ppm sütemény	50 ppm liofilezett tészta	50 ppm liofilezett tészta	50 ppm liofilezett tészta
24	10 ppm sütemény	50 ppm liofilezett tészta	50 ppm liofilezett tészta	50 ppm liofilezett tészta
25	10 ppm sütemény	10 ppm sütemény	10 ppm sütemény	10 ppm sütemény
26	10 ppm sütemény	10 ppm sütemény	10 ppm sütemény	10 ppm sütemény
27	10 ppm sütemény	10 ppm sütemény	10 ppm sütemény	10 ppm sütemény
28	10 ppm sütemény	10 ppm sütemény	10 ppm sütemény	10 ppm sütemény
29	10 ppm sütemény	10 ppm sütemény	10 ppm sütemény	10 ppm sütemény
30	50 ppm sütemény	10 ppm sütemény	10 ppm sütemény	10 ppm sütemény
31	50 ppm sütemény	10 ppm sütemény	50 ppm sütemény	50 ppm sütemény
32	50 ppm sütemény	50 ppm sütemény	50 ppm sütemény	50 ppm sütemény
33	50 ppm sütemény	50 ppm sütemény	50 ppm sütemény	50 ppm sütemény
34	50 ppm sütemény	50 ppm sütemény	50 ppm sütemény	50 ppm sütemény
35	50 ppm sütemény	50 ppm sütemény	50 ppm sütemény	50 ppm sütemény
36	50 ppm sütemény	50 ppm sütemény	50 ppm sütemény	50 ppm sütemény
37	50 ppm sütemény	50 ppm sütemény		
38	50 ppm sütemény	50 ppm sütemény		

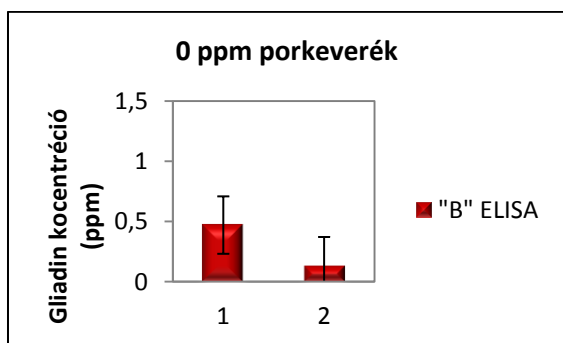
5. Az Eredmények és értékelés rész további diagramjai



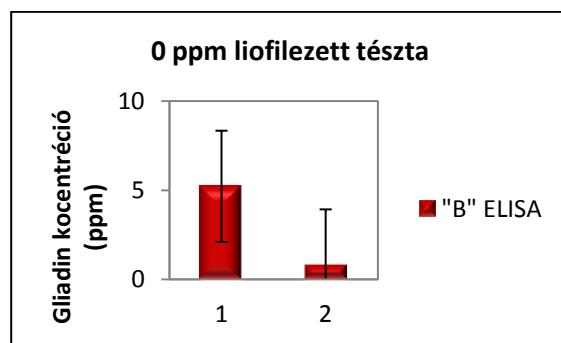
41. ábra: 0 ppm-es porkeverék allergénmentességének igazolása, „A” ELISA



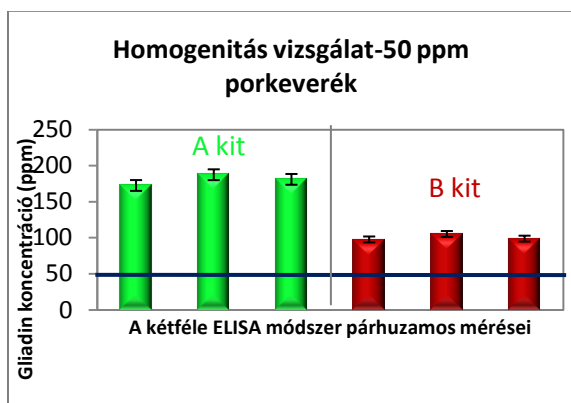
42. ábra: 0 ppm-es liofilezett tészta allergénmentességének igazolása, „A” ELISA



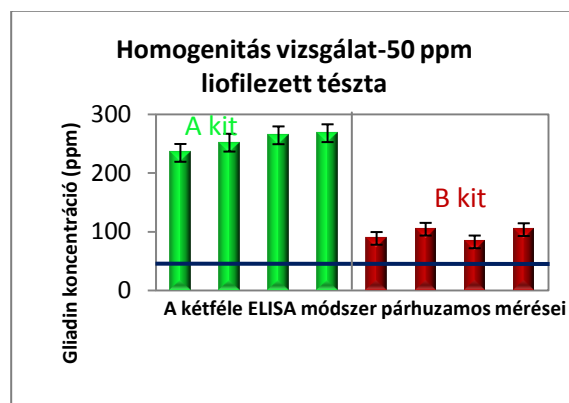
43. ábra: 0 ppm-es porkeverék allergénmentességének igazolása, „B” ELISA



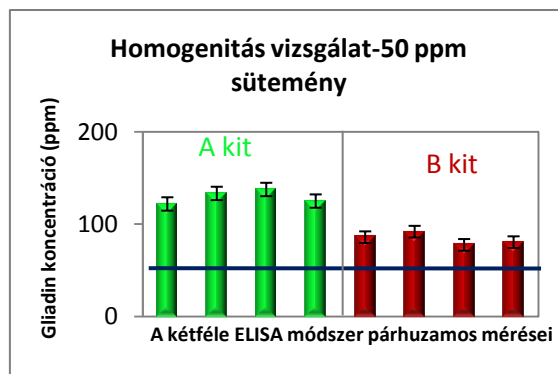
44. ábra: 0 ppm-es liofilezett tészta allergénmentességének igazolása, „B” ELISA



45. ábra: 50 ppm gliadin tartalmú porkeverék homogenitás vizsgálata



46. ábra: 50 ppm gliadint tartalmazó liofilezett tészta homogenitásának vizsgálata



47. ábra: 50 ppm gliadin tartalmú sütemény homogenitás vizsgálata

6. Az Eredmények és értékelés rész további táblázatai

Minták	Romer Labs		R-Biopharm	
	F-próba	t-próba	F-próba	t-próba
10 ppm porkeverék	0,76	0,07	0,29	0,10
50 ppm porkeverék	0,90	0,40	0,81	0,16
10 ppm tészta	0,90	0,72	0,97	0,45
50 ppm tészta	0,12	0,74	0,95	0,31
10 ppm sütemény	0,59	0,73	0,06	0,0002
50 ppm sütemény	0,31	0,24	0,37	0,77

15. táblázat: Standard liszttel készült termék stabilitására vonatkozó statisztikai táblázat 2.

Minták	Romer Labs		R-Biopharm	
	F-próba	t-próba	F-próba	t-próba
10 ppm porkeverék	0,94	0,86	0,45	0,33
50 ppm porkeverék	0,40	0,0058	0,31	0,0016
10 ppm tészta	0,32	0,28	0,68	0,39
50 ppm tészta	0,33	0,0212	0,96	0,44
10 ppm sütemény	0,93	0,35	0,02	0,0471
50 ppm sütemény	0,72	0,0125	0,79	0,07

16. táblázat: Standard liszttel készült termék stabilitására vonatkozó statisztikai táblázat 3.