

***„ Устойчива наука за безопасна храна „
27 октомври 2021 г.***

qPCR методи за детекция на алергени в храни

Станимира Арсова, Красимира Василева, Елена Кузова, Цвета Георгиева

НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ОБЩЕСТВЕНО ЗДРАВЕ И АНАЛИЗИ

Бул. „ Акад. Иван Евстр. Гешов „ 15
1431 София
България

* Хранителните алергии са сериозен здравен проблем, засягащ милиони хора по света. Те представляват специфична имунна реакция на организма към определен компонент на храната, обикновено протеин. Единствения начин за тяхното овладяване е пълното им изключване от дневното меню.

* Въведеният контрол по хранителната верига се изпълнява на база на законодателството за етикетиране на храните (**Регламент 1169/2011**), където се спазва принципът „нулев толеранс,, и законодателството по безопасност на храните (**Регламент 178/2002**).

* Спазвайки основните изисквания за етикетиране на храните, алергените трябва да бъдат отбелязани с удебелен шрифт, големи букви или друг стил на писане, за да се различават от останалите съставки.

* Най-разпространените методи за детекция на алергени в храни са имуносорелбентен анализ (ELISA), мас-спектрометрия и ДНК анализ.

* Обект на настоящата научна работа е актуалния в днешно време Real-time PCR анализ, като са изследвани храни, съдържащи от най-разпространените алергенни съставки: **глутен, фъстъци и горчица**.

* Общите аспекти, засягащи ДНК анализа на алергени са подробно описани в БДС EN 15634-1:2020.



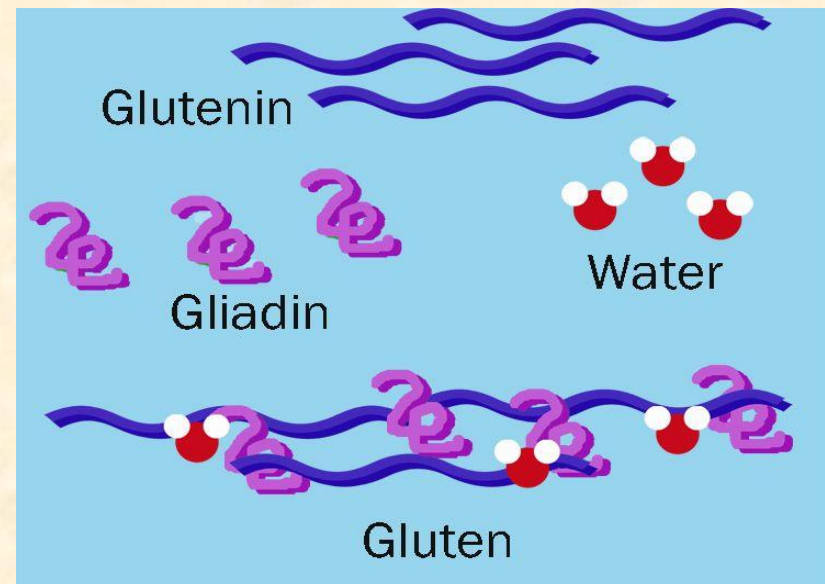


* Глутенът представлява съвкупност от няколко водонеразтворими белтъци, които се срещат основно в житните култури, като пшеница, ръж и ечемик.

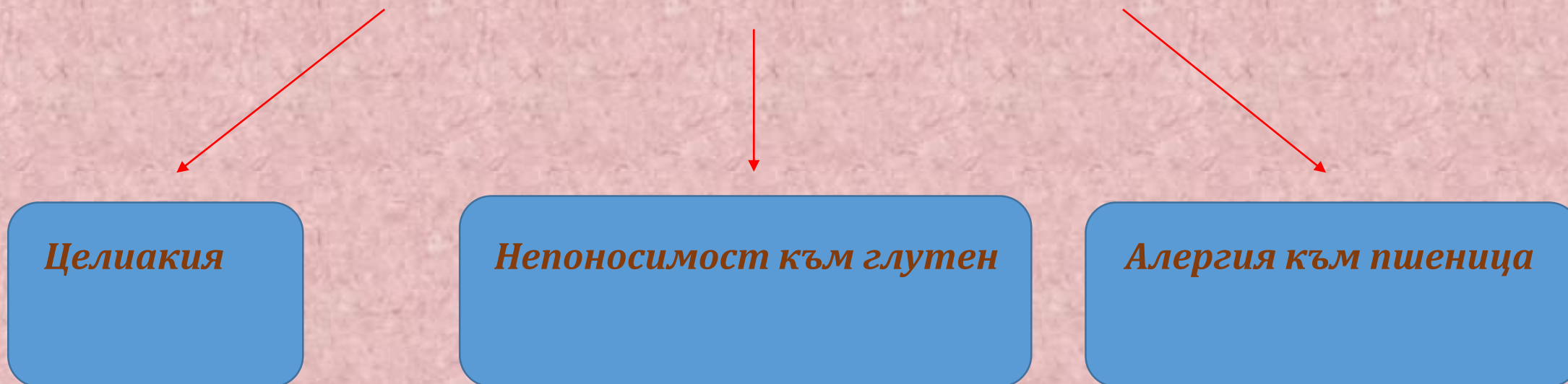
* В пекарството именно глутенът прави тестото еластично, помага му да втаса, запазва формата му и придава текстура на крайния продукт.

* Белтъците **глиадин** и **глутенин** съставляват около 80 % от белтъчното съдържание в ендосперма на пшеницата и са главните причинители на здравословни проблеми при чувствителни индивиди.

* Съществуват няколко вида зърна и семена, които са естествено без глутен и включват: ориз, овес, киноа, лен, просо, сорго, тапиока, елда, амарант.



Рискове , свързани с консумацията на глютен



* Целиакия, известна още и като глютенена ентеропатия, е най-тежката форма на непоносимост към глутена и засяга около 1% от населението. Представлява автоимунно разстройство, при което имунната система атакува глутена, както и лигавицата на червата. Това уврежда чревната стена и може да причини недостиг на хранителни вещества, анемия, тежки проблеми с храносмилането и повишен риск от много заболявания.

* Алергията към пшеница е реакция към протеините, открити в пшеницата и обикновено се проявява в рамките на секунди или минути след ядене. Ако човек е алергичен към пшеница например, организмът реагира негативно на храната, което причинява симптоми като сърбеж по кожата, очите и гърлото. В случай на непоносимост към глютен, от друга страна, реакциите обикновено се проявяват повече в стомашно-чревния тракт (например с подуване на корема и коремна болка).

Спазването на безглутенова диета започва да се откроява като тенденция в редица европейски държави. Това обаче не е толкова лесно, тъй като поради своите вискозно-еластични характеристики глутенът често бива добавян към различни преработени храни.

Интересен факт:

Холандски учени разработват CRISPR- Ca9 методика за модифициране на глутена в пшеницата така, че продуктите от нея да могат да се консумират от страдащи от целиакия и от хора, нетолерантни към глутен. Проектът е все още в начален етап и се основава на локализиране и разрушаване на токсичните антигени в глутена, наречени *епитопи*, без това да вреди на уникалните характеристики, придавани на тестените изделия именно от глутена.



Фъстъци (*Arachis hypogaea*)

- * Фъстъчената алергия е една от най-тежките широко разпространени хранителни алергии, която обикновено се отключва в детска възраст и не бива надрасната.
- * Фъстъчено-алергичните реакции засягат неблагоприятно кожата, дихателните пътища и стомашно-чревния тракт . Честите симптоми включват остра уртикария, остро повръщане, оток на ларинкса, хипотония и дисритмия. Алергията към фъстъци е много опасна, тъй като поглъщането на дори следи от фъстъци може да предизвика животозастрашаващи реакции в рамките на минути. Фъстъците, заедно с дървесните ядки, причиняват повечето фатални или почти фатални анафилаксии, свързани с храната, а алергията към фъстъци води до 100–200 смъртни случая всяка година в САЩ.
- * Към днешна дата *Подкомитетът по номенклатура на алергените на СЗО / IUIS* признава 16 фъстъчени алергена, като за основни причинители на алергии се приемат *Ara h1, Ara h2 и Ara h3* .
- * Установено е, че за европейските държави най-висока честота има алергията към протеина *Ara h2*.

Горчица

* Горчицата се използва широко в различни храни/хранителни продукти за подобряване на вкуса и хранителната стойност, които впоследствие повишават риска от реакции на свръхчувствителност.

* Има два основни вида синапено семе: бяло (*Sinapis alba* L или жълта горчица) и кафяво (*Brassica juncea* L или ориенталска горчица). Синапис алба, известен като жълта горчица, обикновено се консумира като горчичен сос и се добавя като скрита подправка в много сосове и дресинги за салати в Европа

* Горчицата съдържа дразнещи молекули (*изотиоцианати и капсаицин*), които затрудняват диагностицирането на алергия към горчица. Те могат да причинят неимунни реакции при някои индивиди, подобни на IgE-медирирана алергия. Смята се, че тези реакции са отговорни за някои фалшиво положителни резултати, получени при кожни алергични тестове към горчица.

* Поради висок риск от къстосан контакт, хората алергични към горчица, трябва да избягват консумацията на сухи билки и подправки.



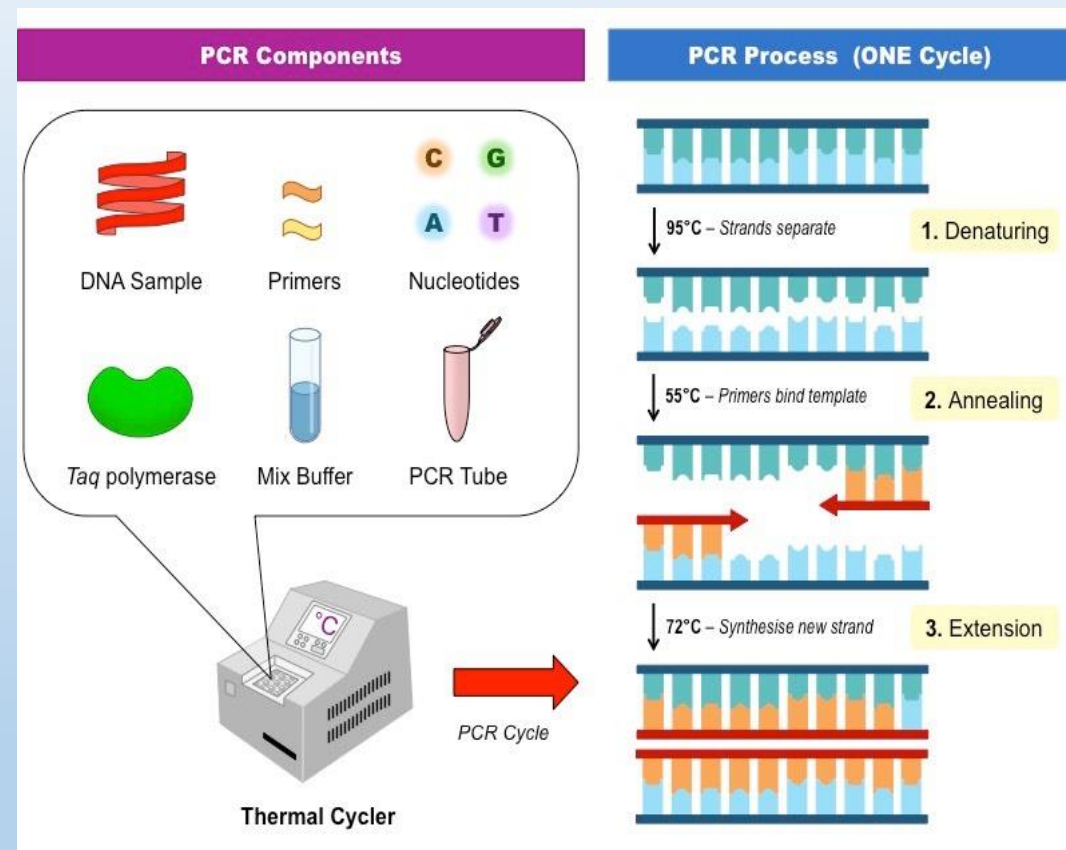
- * Основните алергени в горчицата са *Sin a 1* (жълта горчица) и *Bra j 1* (индийска горчица). Двата протеина имат подобна структура. *Sin a 1* е устойчив на топлина и ензимно разграждане. Проучване, публикувано през 2005 г., показва корелирана алергия към горчица и сенсibiliзация към пращец от гъби (89%) и акари (68,4%). Изследователите също така установяват, че всички участници, алергични към горчица, са чувствителни към други растения от семейство *Brassicaceae*.
- * Контролът на зачестилите алергични реакции налага потребителите стриктно да прочитат етикетите на хранителните продукти и да избягват такива, съдържащи алергенната съставка.
- * Много полезно за хората с хранителни алергии е приемането на храносмилателния ензим *папаин*, срещаш се в зрелите плодове на папаята. Има данни, че намалява автоимунната реакция при консумацията на съдържащи алергени храни, когато алергените са протеини или пептиди.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ АНАЛИЗИ

- * Обект на изследване на настоящия анализ са следните проби: 1 проба глутеново брашно (междулабораторно изпитване), една проба снакс с фъстъци , една проба бисквити с фъстъци ,една проба печени белени фъстъци и една проба едрозърнеста горчица.
- * Извършена е екстракция по микрометод с използването на NucleoSpin® Food кит и по две повторения от всяка проба.
- * Качеството на екстрахираната ДНК е доказано на база спектрофотометричен анализ и гел – електрофореза .
- * Добивът на ДНК е в диапазона 50 ng/μl – 100 ng/μl. , а качеството на изолираната ДНК е между 1,7 и 2,0. Тези данни показват, че екстрахираната ДНК е с достатъчна концентрация и чистота за последващ PCR анализ.

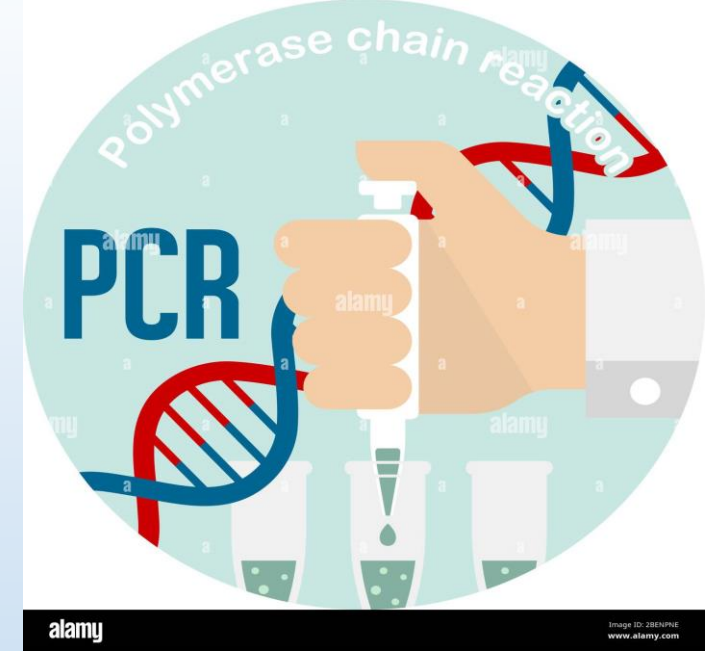
Полимеразна верижна реакция (PCR)

- * Полимеразната верижна реакция (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) е експериментален метод от молекулярната биология, генното инженерство и молекулната диагностика.
- * Това е техника за създаване на много копия на един ДНК регион *инвитро* (в епруветка), извършва се амплификация.
- * PCR тестовете на алергени не са насочени към протеин, а към специфична нуклеотидна последователност на ДНК на алергенната съставка.
- * По този начин те са силно специфични и могат да се използват за идентификация едновременно на няколко вида алергена в обработени проби от храна.



Предимства на метода:

- * ДНК анализа може да се използва за проверка или изясняване на резултат от ELISA и също за откриване на потенциално алергенни продукти, за които в момента няма тест ELISA.
- * Този метод може да бъде много подходящ за хранителни продукти, съдържащи хидролизирани протеини или в случаите на ниско ниво на замърсяване с алергени.
- * ДНК е изключително стабилна молекула, която остава незасегната от стандартната обработка на храни.
- * PCR е изключително точен метод, което означава, че е в състояние да преодолее всеки проблем с кръстосаната реактивност, при който други методи се оказват неефективни.

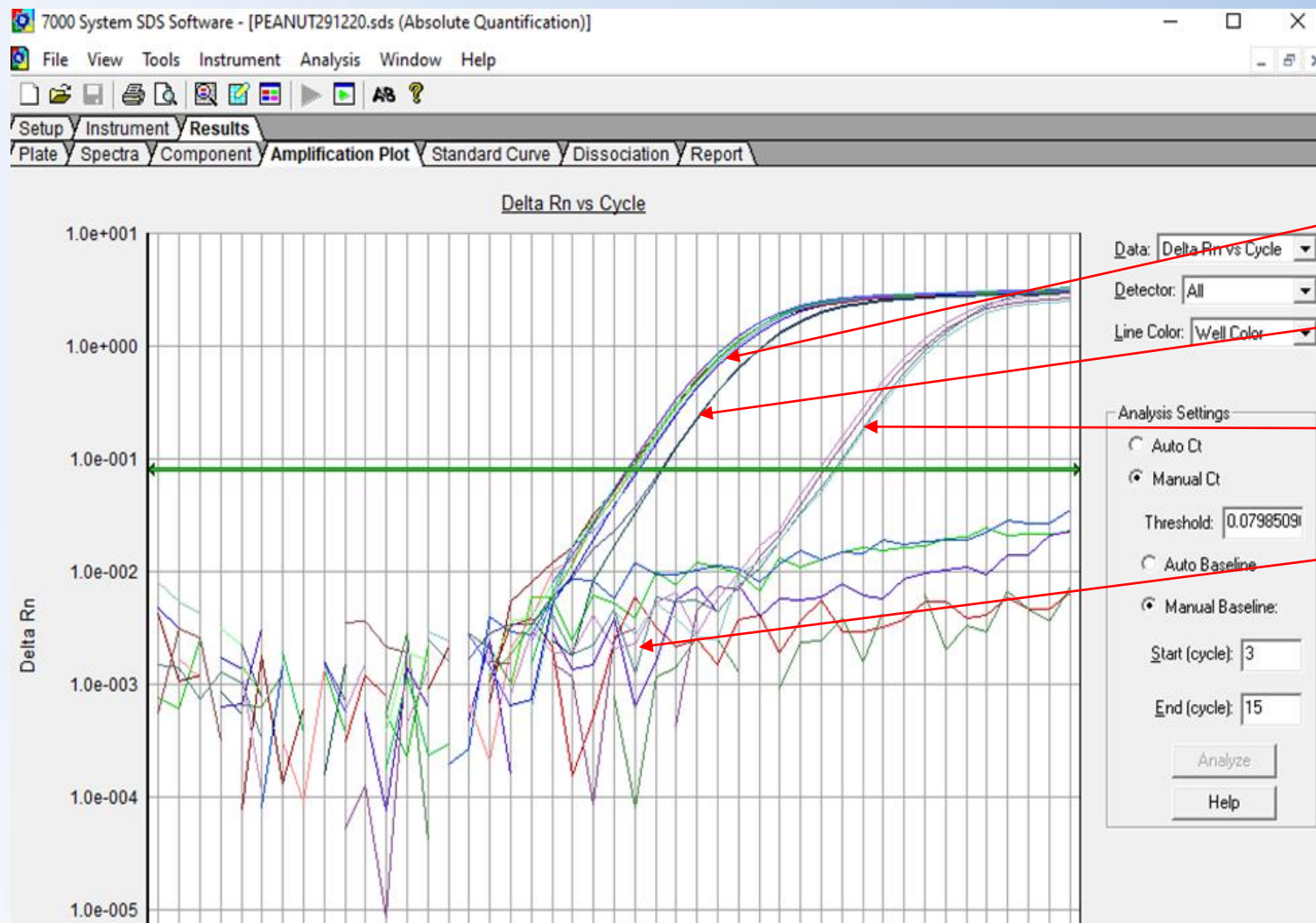


Real-time PCR-ABI 7300



За целите на настоящата научна работа е използван PCR в реално време (Real-time PCR). Методът позволява да наблюдаваме промяната на флуоресценцията при всеки цикъл в реално време, като сигналът на флуоресцентните сонди е правопрпорционален на умножените ДНК вериги. Апаратът е с изключително висока чувствителност и точност.

Получени резултати : Качествен анализ на фъстъци (*Ara h2*)



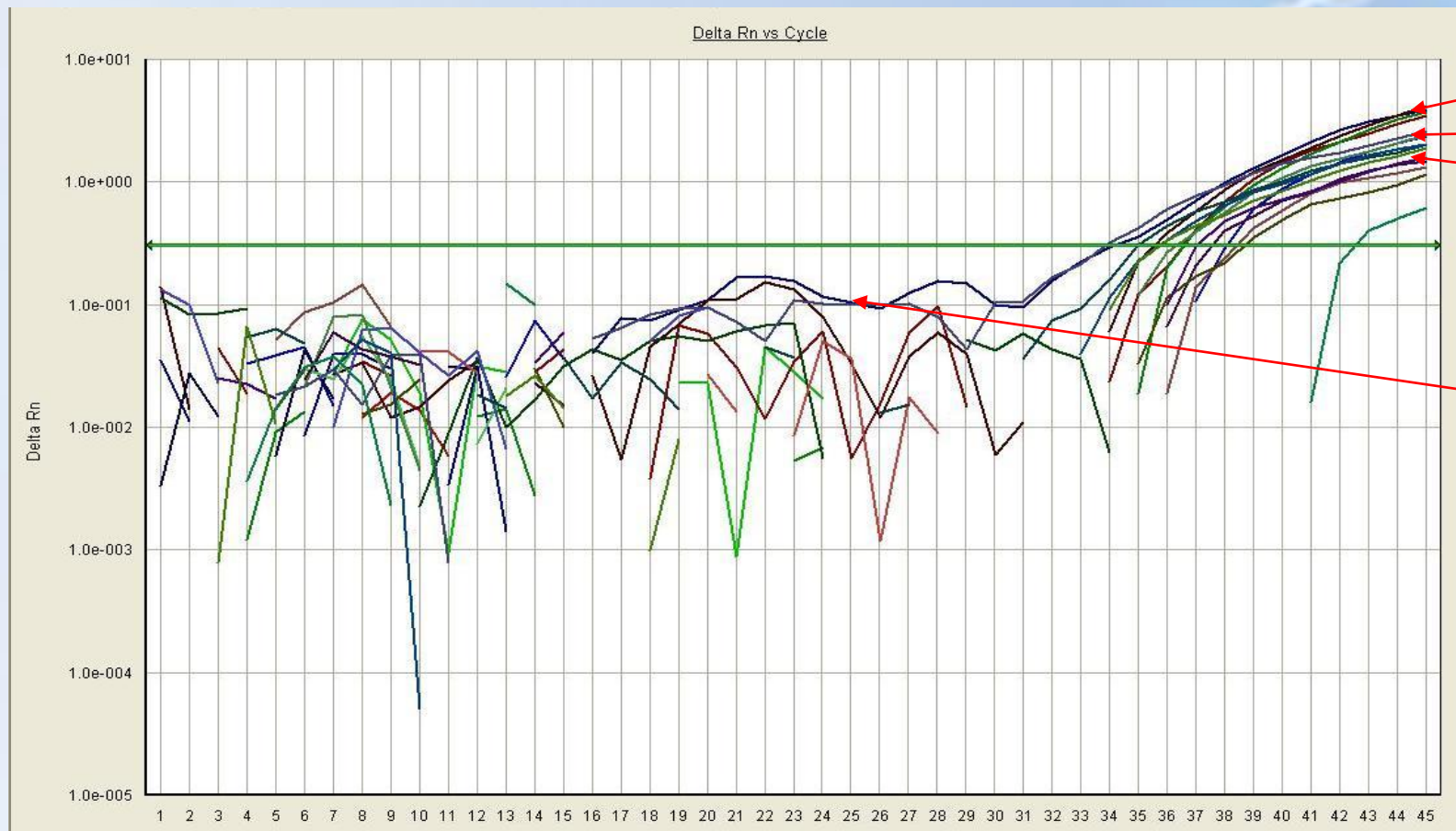
Изследвани проби- снакс,
бисквити, фъстъци

QUANTARD (референтен
материал с концентрация
40 mg/kg.)

Позитивни контроли

Негативни контроли,
външна амплификационна
контрола

Качествен анализ на горчица (*Sin a1*)



Изследвана проба-
едрозьрнеста
горчица

Quantard

Позитивни
контроли

Негативни контроли,
външна
амплификационна
контрола

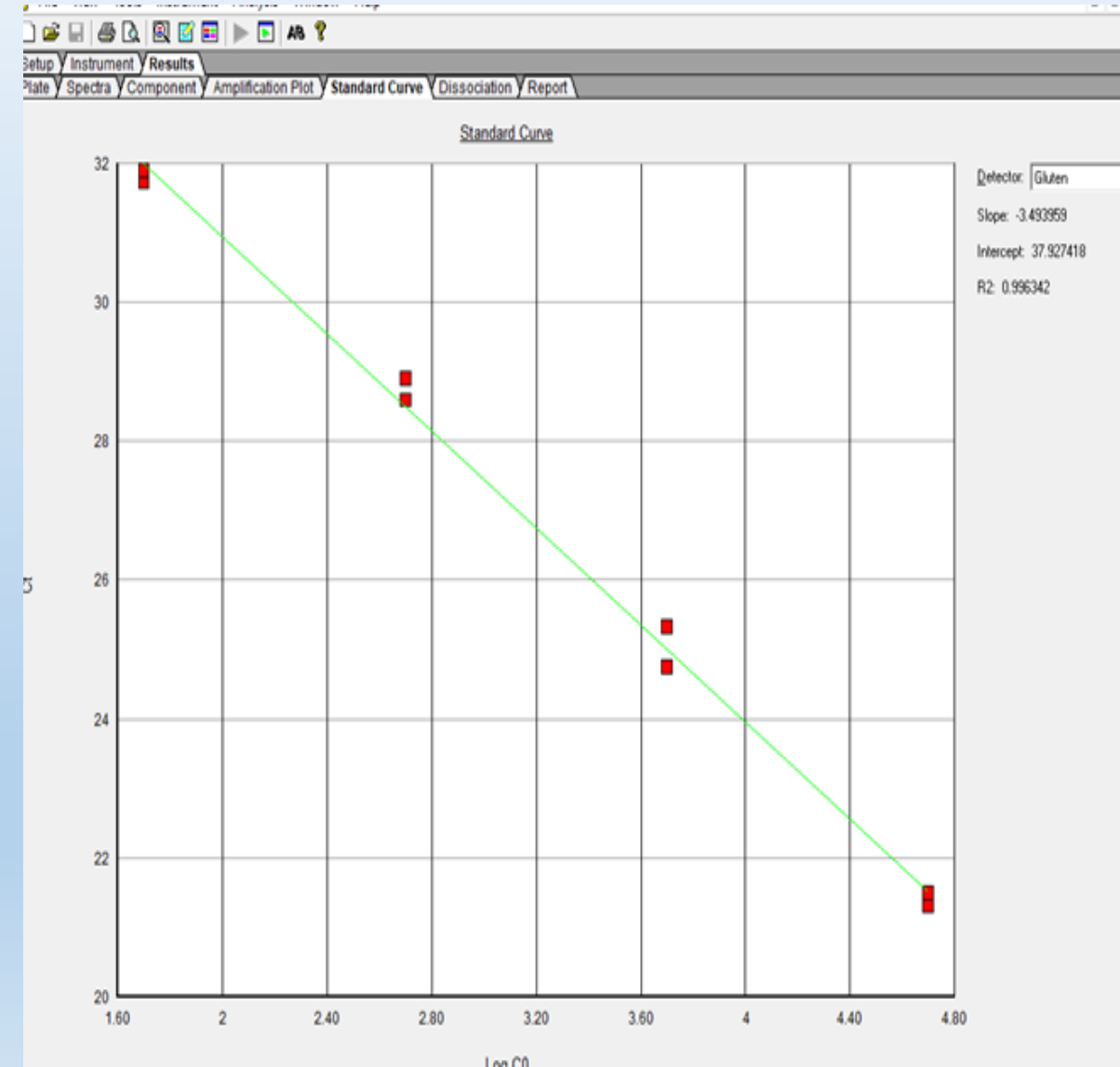
- * Анализирайки получените амплификационни криви можем да отчетем ясен позитивен сигнал за всеки един от изследваните маркери.
- * Доказва се присъствието на търсените алергенни съставки в избраните хранителни продукти.
- * Налице е успешно извършен качествен анализ на глютен, фъстъци, горчица. Методът е верифициран в две повторения в отделни дни и с две различни екстракции от всяка проба. Получените резултати са идентични.
- * Ето защо q PCR анализът на алергени следва да бъде въведен в рутинната лабораторна практика с цел засилен контрол по хранително-вкусовата верига и опазване здравето на потребителя.

Количествено определяне на глутен

Обобщен доклад на пробите T1 и T2:

File View Tools Instrument Analysis Window Help										
Setup Instrument Results										
Plate Spectra Component Amplification Plot Standard Curve Dissociation Report										
Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	Tm
A1	NTC	Gluten	NTC	Undet.						
A1	NTC	IAC	NTC	Undet.						
A2	NTC	Gluten	NTC	Undet.						
A2	NTC	IAC	NTC	41.96						
A3	T1	Gluten	Unknown	17.15	0.065	884857.06	847536.96	36550.457		
A3	T1	IAC	Unknown	Undet.	0.012					
B1	POS control	Gluten	Unknown	28.92	0.129	379.55	403.82	34.313		
B1	POS control	IAC	Unknown	Undet.						
B2	POS control	Gluten	Unknown	28.73	0.129	428.08	403.82	34.313		
B2	POS control	IAC	Unknown	40.20						
B3	T1	Gluten	Unknown	17.28	0.065	811808.13	847536.96	36550.457		
B3	T1	IAC	Unknown	35.21	0.012					
C1	POS quantard	Gluten	Unknown	26.33	0.628	2081.67	1620.75	651.845		
C1	POS quantard	IAC	Unknown	31.81	1.002					
C2	POS quantard	Gluten	Unknown	27.22	0.628	1159.82	1620.75	651.845		
C2	POS quantard	IAC	Unknown	33.23	1.002					
C3	T1	Gluten	Unknown	17.22	0.065	845945.69	847536.96	36550.457		
C3	T1	IAC	Unknown	35.22	0.012					
D1	S1	Gluten	Standard	21.31	0.135	50000.00				
D1	S1	IAC	Unknown	32.71	0.063					
D2	S1	Gluten	Standard	21.50	0.135	50000.00				
D2	S1	IAC	Unknown	32.80	0.063					
D3	T2	IAC	Unknown	34.35	0.134					
D3	T2	Gluten	Unknown	16.33	0.087	1.52e+006	1.62e+006	92123.147		
E1	S2	Gluten	Standard	24.76	0.401	5000.00				
E1	S2	IAC	Unknown	32.19	0.104					
E2	S2	Gluten	Standard	25.32	0.401	5000.00				
E2	S2	IAC	Unknown	32.05	0.104					
E3	T2	IAC	Unknown	34.30	0.134					
E3	T2	Gluten	Unknown	16.17	0.087	1.69e+006	1.62e+006	92123.147		
F1	S3	Gluten	Standard	28.59	0.217	500.00				
F1	S3	IAC	Unknown	31.37	0.092					
F2	S3	Gluten	Standard	28.90	0.217	500.00				
F2	S3	IAC	Unknown	31.50	0.092					
F3	T2	IAC	Unknown	34.10	0.134					
F3	T2	Gluten	Unknown	16.19	0.087	1.66e+006	1.62e+006	92123.147		
G1	S4	Gluten	Standard	31.74	0.111	50.00				
G1	S4	IAC	Unknown	31.36	0.103					
G2	S4	Gluten	Standard	31.89	0.111	50.00				
G2	S4	IAC	Unknown	31.21	0.103					

Стандартна крива на глутен:



Проведеният анализ за количествено определяне на глутен е в рамките на междудулабораторно сравнително изпитване (МСИ). Резултатите демонстрират сходни данни с приписаната стойност на пробата, предоставена от МСИ, а именно :

$$T1 = 53,87 \text{ mg/kg}$$

$$(МСИ) = 58,3 \text{ mg/kg}$$

$$T2 = 63,27 \text{ mg/kg}$$

For a final calculation of mg allergenic substance / kg food sample following formula is introduced:

$$X \left[\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right] = \frac{10 \cdot \left(\frac{Cp \text{ sample}}{s} \right)}{\left(\frac{Cp \text{ QUANTARD}}{s} \right)} * c \text{ QUANTARD}$$

s = slope

c = concentration

Cp QUANTARD = Ø of double assay

Заключение:

- * Оптимизираният протокол на ДНК екстракция с NucleoSpin® Food кит води до изолирането на ДНК от преработени хранителни матрици със задоволителен добив и чистота.**
- * В процеса на валидиране са въведени точни, бързи и високо специфични методи за откриване на фъстъци, горчица и околичествяване на глютен чрез Real-time PCR, което е новаторство за България.**
- * Категоричните резултати могат да послужат за бъдещо разработване на PCR анализа като един надежден заместител на ELISA методите и комерсиализирането му в изпитвателната дейност на акредитираните лаборатории.**

БЛАГОДАРЯ ЗА ВНИМАНИЕТО!

