



**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΑ  
ΤΡΟΦΙΜΑ»**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**ΓΑΪΤΑΝΗΣ ΣΤΑΥΡΟΣ**



**ΚΑΛΑΜΑΤΑ**  
**2013**

*η.503*



**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΑ  
ΤΡΟΦΙΜΑ»**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**ΓΑΪΤΑΝΗΣ ΣΤΑΥΡΟΣ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΒΑΡΖΑΚΑΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ**

**ΚΑΛΑΜΑΤΑ**

**2013**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT .....	7
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	8
ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΑ .....	10
Τροφική αλλεργία και αλλεργιογόνες τροφές.....	10
Μέθοδοι ανίχνευσης των αλλεργιογόνων στα τρόφιμα .....	11
ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΑΡΑΧΙΔΑΣ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ ΜΕ <i>ELISA</i> .....	12
Ορισμοί, σύμβολα και συντμήσεις.....	12
Αρχή της μεθόδου.....	14
Αντιδραστήρια.....	15
Συσκευές και βοηθητικά μέσα.....	16
Προετοιμασία του δείγματος – υποδειγματοληψία .....	17
Παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος .....	17
Προετοιμασία <i>ELISA</i> / συνθήκες.....	19
Εκτέλεση <i>ELISA</i> .....	23
Υπολογισμοί – Εκτίμηση αποτελεσμάτων .....	24

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων ελέγχου .....	25
Κατασκευή πρότυπης καμπύλης .....	25
Υπολογισμός της συγκέντρωσης δείγματος .....	26
Αποδοχή αποτελέσματος. Χαρακτηρισμός δείγματος. ....	26
<b>ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ .....</b>	<b>28</b>
Άρθρο 9 .....	28
Άρθρο 18 .....	29
Άρθρο 21 .....	30
Άρθρο 44 .....	31
Άρθρο 51 .....	32
Άρθρο 52 .....	33
Ουσίες ή προϊόντα που προκαλούν αλλεργίες ή δυσανεξίες.....	34
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>37</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>38</b>

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Διάταξη δειγμάτων.....	20
Πίνακας 2. Πλήθος λευκών δειγμάτων ανάλογα με τον αριθμό των άγνωστων δειγμάτων. .....	21
Πίνακας 3. Διάταξη δειγμάτων στη μικροπλάκα ELISA για 1 - 5 δείγματα. ....	21
Πίνακας 4. Διάταξη δειγμάτων στη μικροπλάκα ELISA για 6 - 8 δείγματα .....	22
Πίνακας 5. Διάταξη δειγμάτων στη μικροπλάκα ELISA για 9 - 12 δείγματα. ....	22
Πίνακας 6. Διάταξη δειγμάτων στη μικροπλάκα ELISA για 13 -15 δείγματα. ....	23

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αλλεργιογόνα τρόφιμα είναι εξαιρετικά επικίνδυνα για τη δημόσια υγεία, γι' αυτό και τα τελευταία χρόνια ανανεώνεται συνεχώς η νομοθεσία σε σχέση με την αναγραφή τους στις ετικέτες των προϊόντων. Επίσης γίνονται συνεχώς έρευνες για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό όλων των αλλεργιογόνων τροφίμων. Μια από τις σημαντικότερες διαδικασίες ανίχνευσης αλλεργιογόνων σε ένα τρόφιμο είναι η μέθοδος *ELISA*. Η *ELISA* αποτελεί το κυρίως στάδιο της μεθόδου, κατά την οποία το πρωτεϊνικό διάλυμα αραιώνεται κατάλληλα και προστίθεται σε μικροτριβλία τα οποία έχουν επίστρωση από αντίσωμα. Το ακινητοποιημένο αντίσωμα δεσμεύει την προς προσδιορισμό πρωτεΐνη και στη συνέχεια η τελευταία δεσμεύει ένα δεύτερο, βιοτινυλιωμένο αντίσωμα (σάντουιτς *ELISA*). Το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα συνδέεται με ένα σύμπλοκο στρεπταβιδίνης – ενζύμου. Το ένζυμο αυτό, στο τελευταίο στάδιο της *ELISA*, καταλύει την αντίδραση μετατροπής κάποιου υποστρώματος σε έγχρωμο προϊόν.

## **ABSTRACT**

Allergenic foods are extremely dangerous in public health, which is why in recent years continuously updated legislation in relation to the indication on the labels of products. Also are made continuously researches to detect and identify all the food allergens. One of the most important processes detecting allergen in a food is the method of ELISA. The ELISA is the essential step of the method, in which the protein solution is diluted appropriately and added to a microplate which are coated with antibody. The immobilized antibody binds to the protein assay, and then the latter engages a second biotinylated antibody (sandwich ELISA). The biotinylated antibody is linked to a streptavidin - enzyme. This enzyme, in the last stage of the ELISA, catalyzes the reaction converting a substrate to a colored product.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι να παρουσιαστούν τα αλλεργιογόνα τρόφιμα, η μέθοδος ανίχνευσής τους, και συγκεκριμένα η μέθοδος ανίχνευσης του φιστικιού με *ELISA*. Επίσης παρουσιάζεται και η Ευρωπαϊκή νομοθεσία που ισχύει για τα αλλεργιογόνα στα τρόφιμα.

Όρος επιβλαβείς αντιδράσεις που προκαλούνται από την κατανάλωση τροφίμων σε έναν οργανισμό, περιλαμβάνει δυο κατηγορίες: την τροφική υπερευαισθησία και την τροφική δυσανεξία.

Η τροφική δυσανεξία είναι μια επιβλαβής αντίδραση του οργανισμού από ένα τρόφιμο που προκαλείται από τοξικές, φαρμακολογικές ή μεταβολικές αντιδράσεις απέναντι στο τρόφιμο ή από χημικές ουσίες του τροφίμου. Οι τοξικές αντιδράσεις μπορούν να εμφανιστούν σε κάθε άτομο που εκτίθεται σε ορισμένη ουσία, και η τοξικότητα μπορεί φυσιολογικά να προκληθεί, είτε κατά τη διάρκεια επεξεργασίας του τροφίμου, είτε από εξωτερική μόλυνση.

Η τροφική υπερευαισθησία (γνωστή και ως τροφική αλλεργία) εμφανίζεται όταν το ανοσοποιητικό σύστημα αντιδρά επιθετικά απέναντι σε μια ουσία (ή τρόφιμο) που είναι συνήθως ακίνδυνη, διότι λανθασμένα την αναγνωρίζει ως επικίνδυνη. Η τροφική υπερευαισθησία περιλαμβάνει: α) τις αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχει η ανοσοσφαιρίνη E (*IgE*) και β) σε αυτές στις οποίες δε συμμετέχει. Ο μόνος γνωστός και αποδεδειγμένος ανοσολογικός μηχανισμός της τροφικής αλλεργίας είναι αυτός που έχει ως μεσολαβητή την ανοσοσφαιρίνη *IgE*, ενώ οι υπόλοιποι ανοσολογικοί μηχανισμοί μελετώνται ακόμα. Οι περισσότερες τροφικές αλλεργίες είναι τύπου I και χαρακτηρίζονται από μια ανοσοπαθολογική διαδικασία, η οποία επαναλαμβάνεται ακολουθώντας μια σχέση «αιτίου-αποτελέσματος». Οι αντιδράσεις με μεσολαβητή την ανοσοσφαιρίνη *IgE* εμφανίζονται αμέσως ή εντός δυο ωρών από την έκθεση στο αλλεργιογόνο, ενώ το αποτέλεσμά τους κυμαίνεται από ήπιο έως πολύ σοβαρό, ακόμα και επικίνδυνο για την ανθρώπινη ζωή.

Επειδή ο όρος αλλεργία συχνά χρησιμοποιείται λανθασμένα, καθώς περιλαμβάνει κάθε επιβλαβή αντίδραση του οργανισμού ανεξάρτητα από το μηχανισμό, καλό είναι να παραθέσουμε συνοπτικά τους παρακάτω ορισμούς:



- Αλλεργική αντίδραση είναι μια επιβλαβής αντίδραση του οργανισμού απέναντι σε μια ουσία, στην οποία παρεμβαίνει το ανοσοποιητικό σύστημα. Η ουσία που προκαλεί την αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος, μπορεί να έχει έλθει σε επαφή με το δέρμα ή τους βλεννογόνους του σώματος, ή να είναι αποτέλεσμα κατάποσης, έγχυσης ή εισπνοής.
- Τροφική αλλεργία είναι ένα είδος επιβλαβούς αντίδρασης του ανοσολογικού συστήματος που προκαλείται από ένα τρόφιμο.
- Η τροφική δυσανεξία ορίζεται ως μια επιβλαβής αντίδραση που προκαλείται από ορισμένο τρόφιμο ή συστατικό του, χωρίς να συμμετέχει το ανοσολογικό σύστημα.(Tsuji *et al.* 1993, 1995, Skerrit and Hill 1991,Bando *et al.* 1998, Koppelman *et al.* 1996, Keck-Gassenmeier *et al.* 1999, Koepfel *et al.* 1998,Moser *et al.* 1999,Holzhauser *et al.* 2000, Freemont *et al.* 1996)

## ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΑ

Η τροφική αλλεργία παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον όσον αφορά στην ασφάλεια των τροφίμων και την υποχρεωτική επισήμανση των αλλεργιογόνων τροφίμων. Μέχρι σήμερα υπάρχουν πολύ λίγες επικυρωμένες μέθοδοι ανίχνευσης για έναν περιορισμένο αριθμό αλλεργιογόνων τροφίμων.

### Τροφική αλλεργία και αλλεργιογόνες τροφές.

Η τροφική αλλεργία είναι ένα διαδεδομένο πρόβλημα της δημόσιας υγείας το οποίο συναντάται περισσότερο στις ανεπτυγμένες χώρες. Κατά τις τελευταίες δεκαετίες τα ποσοστά της τροφικής αλλεργίας αυξήθηκαν, με αποτέλεσμα να αποτελούν μεγάλη πρόκληση για τη βιομηχανία των τροφίμων. Ο όρος «τροφική αλλεργία» προσδιορίστηκε τα τελευταία χρόνια από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή Αλλεργιολογίας και Κλινικής ανοσολογίας. Οι ανεπιθύμητες αντιδράσεις στα τρόφιμα χωρίζονται σε τοξικές και σε μη τοξικές αντιδράσεις. Οι μη τοξικές αντιδράσεις χωρίζονται σε ανοσοδιαμεσολαβούμενες και σε μη ανοσοδιαμεσολαβούμενες. Πρόσφατα η Ευρωπαϊκή επιτροπή ανακοίνωσε έναν κατάλογο με αλλεργιογόνα, τα οποία θα πρέπει υποχρεωτικά να αναγράφονται στη συσκευασία προσυσκευασμένων τροφίμων άσχετα με την ποσότητα του αλλεργιογόνου στο τρόφιμο. Τα αλλεργιογόνα που υπάρχουν στον κατάλογο είναι:

1. Γάλα
2. Αυγά
3. Φιστίκι
4. Σόγια
5. Καρύδια
6. Δημητριακά που περιέχουν γλουτένη
7. Σουσάμι
8. Σέλινο
9. Ψάρια και θαλασσινά γενικότερα

Συνήθως οι αλλεργιογόνες τροφές είναι πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες των οποίων η μοριακή μάζα κυμαίνεται από 10 έως 70 *KDa*. Μόνο ένα ποσοστό των πρωτεϊνών στα

τρόφιμα είναι αλλεργιογόνες ουσίες.(Wigotzki *et al.* 2000, Gillespie *et al.* 1976, Besler *et al.* 2000, Blais and Phillippe 2000)

### **Μέθοδοι ανίχνευσης των αλλεργιογόνων στα τρόφιμα**

Η σήμανση των προϊόντων σχετικά με την παρουσία αλλεργιογόνων σε αυτά, προς το παρόν είναι ο πιο αποτελεσματικός τρόπος αποφυγής πρόσληψης των αλλεργιογόνων τροφίμων από αλλεργικά άτομα. Ως εκ τούτου, το πρόβλημα του προσδιορισμού των αλλεργιογόνων στα τρόφιμα αποτελεί μείζονα λόγο ανησυχίας τόσο της βιομηχανίας τροφίμων όσο και των αλλεργικών καταναλωτών. Όσον αφορά τα προαναφερθέντα αλλεργιογόνα υπάρχει σαφής ανάγκη για μεθόδους ανάλυσης οι οποίες θα πρέπει να είναι ακριβείς στον προσδιορισμό ακόμη και ιχνών των αλλεργιογόνων. Επίσης θα πρέπει οι μέθοδοι αυτές να είναι γρήγορες, αξιόπιστες αλλά και οικονομικές. Μέχρι σήμερα υπάρχει περιορισμένος αριθμός επικυρωμένων μεθόδων για μόνο μερικά από τα αλλεργιογόνα. Μια από αυτές τις μεθόδους είναι και η ανίχνευση αλλεργιογόνων με *ELISA*, η οποία περιγράφεται στο επόμενο κεφάλαιο.(Koch *et al.* 2003, Wigotzki *et al.* 2000, Taylor and Nordlee 1996, Acosta *et al.* 1999)

## ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΑΡΑΧΙΔΑΣ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ ΜΕ *ELISA*

### Ορισμοί, σύμβολα και συντμήσεις

**Αλλεργία (αλλεργική αντίδραση):** Η απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος ευαισθητοποιημένων ατόμων (αλλεργικών) σε φυσιολογικές – αβλαβείς ενώσεις, με τρόπο που να προκαλεί συμπτώματα στον οργανισμό. Οι αλλεργικές αντιδράσεις διακρίνονται σε αυτές που γίνονται μέσω της παραγωγής αντισωμάτων *IgE* (τύπου I) και σε αυτές τις οποίες δεν μεσολαβούν αντισώματα *IgE*.

**Αλλεργιογόνο:** Αντιγόνο που έχει την ιδιότητα να προκαλεί την παραγωγή αντισωμάτων *IgE*, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα την εκδήλωση αλλεργικής αντίδρασης.

**Αντιγόνο:** Ουσία η οποία αναγνωρίζεται ως ξένη από το ανοσοποιητικό σύστημα και προκαλεί την ανοσολογική απόκριση έναντι της (παραγωγή αντισωμάτων). Το αντιγόνο αντιδρά *in vivo* και *in vitro* παρουσιάζοντας εξειδίκευση για τα αντισώματα που έχουν παραχθεί.

**Αντίσωμα:** Πρωτεΐνη (ανοσοσφαιρίνη) που παράγεται και εκκρίνεται από τα Β λεμφοκύτταρα ως απόκριση στην αναγνώριση ενός ξένου μορίου (αντιγόνου). Το αντίσωμα έχει την ικανότητα να συνδέεται με το συγκεκριμένο αντιγόνο. Τα αντισώματα αναγνωρίζουν συγκεκριμένες περιοχές του αντιγόνου οι οποίες ονομάζονται επίτοποι.

**Αντίσωμα *IgE*:** Πρόκειται για μια από τις κατηγορίες αντισωμάτων. Τα αντισώματα *IgE* παράγονται από τον οργανισμό των ευαισθητοποιημένων ατόμων έναντι συγκεκριμένων αλλεργιογόνων. Η παραγωγή *IgE* είναι το πρώτο στάδιο για την εκδήλωση των συμπτωμάτων της αλλεργίας.

**Αντίσωμα μονοκλωνικό:** Το αντίσωμα που παράγεται από ένα τύπο κυττάρων, τα οποία αποτελούν κλώνο του ίδιου μητρικού κυττάρου. Κάθε μονοκλωνικό αντίσωμα παρουσιάζει πολύ μεγάλη εξειδίκευση έναντι συγκεκριμένου αντιγόνου. Τα μονοκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιούνται και για την ανίχνευση αντιγόνων.

**Αντίσωμα πολυκλωνικό:** Παράγεται από διαφορετικές σειρές (διαφορετικούς κλώνους) κυτάρων. Αποτελεί μίγμα ανοσοσφαιρινών, η κάθε μια από τις οποίες αναγνωρίζει διαφορετικό επίτοπο του ίδιου αντιγόνου. Παρουσιάζει πολύ μικρότερη εξειδίκευση σε σχέση με το μονοκλωνικό αντίσωμα.

**Βιοτίνη:** Η βιοτίνη είναι βιταμίνη, η οποία παρουσιάζει εξαιρετικά μεγάλη συγγένεια με την στρεπταβιδίνη και την αβιδίνη. Η ιδιότητα αυτή (ισχυρός δεσμός βιοτίνης – στρεπταβιδίνης) χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό ή τον προσδιορισμό βιομορίων.

**Βιοτινυλωμένο αντίσωμα:** Αντίσωμα το οποίο έχει συνδεθεί ομοιοπολικά με βιοτίνη.

**Διασταυρούμενη δραστηριότητα:** Η ικανότητα σύνδεσης ενός αντισώματος με αντιγόνο, άλλο από τον αναλύτη. Οφείλεται στην αναγνώριση επιτόπων που είναι κοινοί σε περισσότερα από ενός αντιγόνα (συνήθως αντιγόνα που προέρχονται από διαφορετικές πηγές).

**Εξειδίκευση αντισώματος:** η ικανότητα ενός αντισώματος να συνδέεται εξειδικευμένα σε περιοχή ενός αντιγόνου και όχι σε παρόμοιες δομές του ίδιου ή άλλου αντιγόνου.

**Επίτοπος:** Περιοχή του αντιγόνου η οποία αναγνωρίζεται (εξειδικευμένη αναγνώριση) από αντισώματα και συνδέεται με αυτά.

**ELISA: Enzyme – Linked Immunosorbent assay:** Invitro μέθοδος η οποία χρησιμοποιεί ένα σύμπλοκο ενζύμου – αντισώματος ή ενζύμου – αντιγόνου και κατάλληλο υπόστρωμα το οποίο, μετά τη δράση του ενζύμου, παράγει έγχρωμο ή φθορίζον προϊόν.

**Θ.Δ.:** Θερμοκρασία Δωματίου (13°C έως 27°C)

**Θ.Ψ.:** Θερμοκρασία Ψυγείου (2°C έως 8°C)

**Κοναραχίνη ή *Arahi 1 (conarahin)*:** Αποθηκευτική πρωτεΐνη (7S), σφαιρίνη η οποία αποτελεί το 20% των πρωτεϊνών του καρπού του φυτού *Arachis hypogaea*. Είναι μια από τις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες των αραχίδων και η ύπαρξή της σε τρόφιμα αποτελεί δείκτη παρουσίας αραχίδων ή προϊόντων που προέρχονται από αραχίδες.

**Στρεπταβιδίνη:** Πρωτεΐνη η οποία χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό ή τον προσδιορισμό βιομορίων, αξιοποιώντας την εξαιρετικά μεγάλη συγγένεια που έχει για τη βιοτίνη.

**Στρεπταβιδίνη/Υπεροξειδάση:** Σύμπλοκο μεταξύ στρεπταβιδίνης και υπεροξειδάσης.

**TMB:** 3, 3', 5, 5' Τετραμεθυλοβενζιδίνη. Χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα (δότης e<sup>-</sup>) στην ενζυμική αντίδραση αναγωγής του υπεροξειδίου του υδρογόνου με το ένζυμο υπεροξειδάση. Το προϊόν οξείδωσης της TMB έχει κυανό χρώμα, το οποίο, με την προσθήκη όξινου διαλύματος, μετατρέπεται σε σταθερό κίτρινο χρώμα.

**Υπεροξειδάση:** *Peroxidase*. Οξειδοαναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ένζυμο που καταλύει την αντίδραση: [Δότης e<sup>-</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → Οξειδωμένος δότης + 2H<sub>2</sub>O] (prEN 2009, Hengel 2007, Koivunen 2006, Mariager *et al.* 1994, Yeung and Collins 1996)

## Αρχή της μεθόδου

Αρχικά εκχυλίζεται η πρωτεΐνη από το προς ανάλυση δείγμα, με τη χρήση κατάλληλου διαλύματος εκχύλισης. Η *ELISA* αποτελεί το κυρίως στάδιο της μεθόδου, κατά την οποία το πρωτεϊνικό διάλυμα αραιώνεται κατάλληλα και προστίθεται σε μικροτριβλία τα οποία έχουν επίστρωση από αντίσωμα. Το ακινητοποιημένο αντίσωμα δεσμεύει την προς προσδιορισμό πρωτεΐνη και στη συνέχεια η τελευταία δεσμεύει ένα δεύτερο, βιοτινυλιωμένο αντίσωμα (σάντουιτς *ELISA*). Το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα συνδέεται με ένα σύμπλοκο στρεπταβιδίνης – ενζύμου. Το ένζυμο αυτό, στο τελευταίο στάδιο της *ELISA*, καταλύει την αντίδραση μετατροπής κάποιου υποστρώματος σε έγχρωμο προϊόν. Από το ένα στάδιο της *ELISA* στο επόμενο, μεσολαβούν εκπλύσεις έτσι ώστε κάθε μη δεσμευμένο υλικό να απομακρυνθεί από τα μικροτριβλία. Η ύπαρξη του τελικού έγχρωμου προϊόντος υποδηλώνει την παρουσία της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης (ανίχνευση). Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης. (Hengel *et al.* 2006)

## Αντιδραστήρια

Χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια που περιλαμβάνονται στο *kit*, καθώς και αντιδραστήρια που συνήθως αφορούν τα διαλύματα εκχύλισης, τα οποία παρασκευάζονται στο εργαστήριο. Το νερό που χρησιμοποιείται είναι τουλάχιστον απονισμένο. Τα αντιδραστήρια που περιλαμβάνονται στο *kit* είναι τα εξής:

- Πρότυπο δείγμα φιστικιού S1 σε συγκέντρωση 1ppm
- Πρότυπο δείγμα φιστικιού S2 σε συγκέντρωση 2ppm
- Πρότυπο δείγμα φιστικιού S3 σε συγκέντρωση 5ppm
- Πρότυπο δείγμα φιστικιού S4 σε συγκέντρωση 10ppm
- Πρότυπο δείγμα φιστικιού S5 σε συγκέντρωση 20ppm
- Τριμμένο μπισκότο
- *Peanut Spike Control* σε συγκέντρωση 0,5mg/ml
- Βιοτινυλιωμένο αντίσωμα Κοναραχίνης
- Στρεπταβιδίνη/Υπεροξειδάση
- TMB
- *StopSolution* (φωσφορικό οξύ) σε συγκέντρωση 25% v/v
- Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης (*wash solution concentrate* 10x)
- Συμπυκνωμένο διάλυμα αραίωσης (*diluntconcentrate* 5x)
- Μικροπλάκα 96 θέσεων (12 *strips* των 8 θέσεων). Σε κάθε μικροτριβλίο υπάρχει ακινητοποιημένο αντίσωμα έναντι της κοναραχίνης.

Τα αντιδραστήρια που δεν περιλαμβάνονται στο *kit* είναι τα παρακάτω:

- Απιονισμένο νερό
- Χλωριούχο νάτριο
- *Tris (hydroxymethyl) methylamine*
- Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος σε συγκέντρωση 5N το οποίο παρασκευάζεται με κατάλληλη αραίωση πυκνού HCl.
- Ζελατίνη Τελεόστεων Ιχθύων σε συγκέντρωση περίπου 45% w/v σε νερό

- Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης του οποίου το pH κυμαίνεται από 8,15 έως 8,25 και περιέχει 0,1N NaCl, 0.07M Tris και 10% w/v διάλυμα ζελατίνης. Παρασκευάζεται με διάλυση κατάλληλων ποσοτήτων χλωριούχου νατρίου, Tris και ζελατίνης σε νερό και η ρύθμιση του pH γίνεται σε πεχάμετρο (03 pH 02) με 5N HCl
- Διάλυμα έκπλυσης το οποίο παρασκευάζεται με 10 φορές αραιώση του αντίστοιχου πυκνού διαλύματος που περιέχεται στο *kit*.
- Διάλυμα αραιώσης το οποίο παρασκευάζεται με 5 φορές αραιώση του αντίστοιχου πυκνού διαλύματος που περιέχεται στο *kit*. (Pomsetal. 2005, Whitakeretal. 2005, Stephan O. and Vieths S. 2004, Ternel Biosystems2003, Koch 2003)

## Συσκευές και βοηθητικά μέσα

Οι συσκευές και τα βοηθητικά μέσα που χρησιμοποιούνται χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες.

1. Σε συσκευές και βοηθητικά μέσα που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος τα οποία είναι: Το ανακινούμενο υδατόλουτρο, η ψυχόμενη φυγόκεντρος, ο αναδευτήρας περιστροφικής κίνησης, ο αναδευτήρας τύπου vortex, ο ομογενοποιητής, ο ομογενοποιητής οικιακής χρήσης και το πεχάμετρο.
2. Σε συσκευές και βοηθητικά μέσα που χρησιμοποιούνται για τον ανοσοπροσδιορισμό στα οποία περιλαμβάνονται: Η συσκευή *ELISA* (φωτόμετρο) η οποία είναι συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή και ελέγχεται από λογισμικό, η πρότυπη μικροπλάκα η οποία χρησιμοποιείται για τον έλεγχο καλής λειτουργίας του φωτομέτρου και η συσκευή έκπλυσης μικροπλακών η οποία διαθέτει 2 κεφαλές των οκτώ ή δώδεκα θέσεων. Για κάθε μια κεφαλή υπάρχουν αντίστοιχες κάρτες που αντιστοιχούν σε προγράμματα έκπλυσης για 1,2,3 ή 4 εκπλύσεις.
3. Σε εξοπλισμό γενικής χρήσης ο οποίος περιλαμβάνει: Αυτόματες μηχανικές πιπέτες μεταβλητού όγκου, αυτόματες πολυκάναλες μηχανικές πιπέτες μεταβλητού όγκου, ηλεκτρονικό ζυγό, ψυγείο, καταψύκτη, πυριαντήριο και σύριγγα *gas-tight*.
4. Σε αναλώσιμα τα οποία είναι: Ρύγχη αυτόματων μηχανικών πιπετών, πλαστικοί σωλήνες προπυλενίου, πλαστικά δοχεία, πλαστικά μικροσωληνάρια τύπου



*Erppendorf, πλαστικά στηρίγματα και γυάλινα σκεύη.*(Poms et al. 2005, Whitaker et al. 2005, Stephan O. and Vieths S. 2004)

## **Προετοιμασία του δείγματος – υποδειγματοληψία**

Το εργαστηριακό δείγμα λαμβάνεται ολόκληρο και αλέθεται και ομογενοποιείται στον ομογενοποιητή. Η ομογενοποίηση του αρχικού δείγματος πρέπει να εκτελείται στον εργαστηριακό χώρο προετοιμασίας δειγμάτων, ο οποίος είναι διαφορετικός από τον χώρο που εκτελούνται τα υπόλοιπα δείγματα.

Προκειμένου να αποφευχθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω επιμόλυνσης, επιβάλλεται ο καθαρισμός των πάγκων και του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται. Ο καθαρισμός των γυάλινων σκευών και των ομογενοποιητών γίνεται με τη βοήθεια πλυντηρίου. Οι χρησιμοποιούμενοι πάγκοι καθαρίζονται και απολυμαίνονται με νερό και αιθανόλη. Όπου είναι δυνατόν, χρησιμοποιούνται πλαστικά αναλώσιμα μιας χρήσης. Συνιστάται η χρήση γαντιών μιας χρήσης.

Για κάθε άγνωστο δείγμα, όλη η διαδικασία (εκχύλιση – ανοσοπροσδιορισμός) εκτελείται εις διπλούν.(Poms *et al.* 2004, Johns and Jones 1916,Bruijnzeel-Koomen 1995, Sampson 1998, 1999, Emmett *et al.* 1999, Wuëthrich 2000)

## **Παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος**

Το στάδιο αυτό της ανάλυσης εκτελείται σε θερμοκρασία δωματίου. Σε κάθε ανάλυση, γίνεται εκχύλιση και από έναν αρνητικό μάρτυρα και ένα δείγμα ποιοτικού ελέγχου. Τα στάδια είναι:

- Προθέρμανση του ρυθμιστικού διαλύματος της εκχύλισης: Το ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης προθερμαίνεται στους 60°C στο υδατόλουτρο.
- Προετοιμασία του αρνητικού μάρτυρα: Ζυγίζονται 5g τριμμένου μπισκότου σε πλαστικό δοχείο μιας χρήσης και αναμιγνύονται με 50ml ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης. Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου, υπο ανάδευση στον

αναδευτήρα σε μέτρια ένταση για δεκαπέντε λεπτά. Μετά τα πρώτα 10 λεπτά ελέγχεται κατά πόσο το δείγμα έχει διαλυθεί/εναιωρηθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης. Αν κριθεί απαραίτητο, θερμαίνεται για τρία με πέντε λεπτά στους 60°C και συνεχίζεται η ανάδευση για όσο χρόνο υπολείπεται. Μετά το τέλος της επώασης μεταφέρουμε 1ml του δείγματος σε μικροσωληνάριο του 1.5ml και φυγοκεντρείται στη φυγόκεντρο για δεκα λεπτά. Μετά τη φυγοκέντριση παίρνουμε μια ποσότητα υπερκειμένου (0,5 – 0,8ml) και τη μεταφέρουμε σε νέο, καθαρό μικροσωληνάριο του 1,5ml. Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί αμέσως μετά ή σε θερμοκρασία ψυγείου για πέντε ημέρες το μέγιστο.

- Προετοιμασία του δείγματος ποιοτικού ελέγχου (QC): Το *peanutspikecontrol* αραιώνεται 1:10 σε ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης. Στη συνέχεια ζυγίζονται 5g τριμμένου μπισκότου και επιμολύνονται με 50μl από το αραιωμένο *peanutspikecontrol*. Η επιμόλυνση αυτή αντιστοιχεί σε θεωρητική τελική συγκέντρωση αραχίδας 0,5ppm. Το μείγμα ανακινείται καλά και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για τριάντα λεπτά. Ζυγίζονται 5g ομογενοποιημένου δείγματος, σε πλαστικό δοχείο μιας χρήσης και αναμιγνύονται με 50ml ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης. Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου, υπο ανάδευση στον αναδευτήρα σε μέτρια ένταση για δεκαπέντε λεπτά. Μετά τα πρώτα 10 λεπτά ελέγχεται κατά πόσο το δείγμα έχει διαλυθεί/εναιωρηθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης. Αν κριθεί απαραίτητο, θερμαίνεται για τρία με πέντε λεπτά στους 60°C και συνεχίζεται η ανάδευση για όσο χρόνο υπολείπεται. Μετά το τέλος της επώασης μεταφέρουμε 1ml του δείγματος σε μικροσωληνάριο του 1.5ml και φυγοκεντρείται στη φυγόκεντρο για δεκα λεπτά. Μετά τη φυγοκέντριση παίρνουμε μια ποσότητα υπερκειμένου (0,5 – 0,8ml) και τη μεταφέρουμε σε νέο, καθαρό μικροσωληνάριο του 1,5ml. Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί αμέσως μετά ή σε θερμοκρασία ψυγείου για πέντε ημέρες το μέγιστο.
- Ζύγιση του δείγματος: Ζυγίζονται 5g ομογενοποιημένου δείγματος, σε πλαστικό δοχείο μιας χρήσης και αναμιγνύονται με 50ml ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης. Για κάθε άγνωστο δείγμα γίνονται δυο εκχυλίσεις.
- Επώαση υπο ανάδευση: Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου, υπο ανάδευση στον αναδευτήρα σε μέτρια ένταση για δεκαπέντε λεπτά. Μετά τα πρώτα

10 λεπτά ελέγχεται κατά πόσο το δείγμα έχει διαλυθεί/εναιωρηθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης. Αν κριθεί απαραίτητο, θερμαίνεται για τρία με πέντε λεπτά στους 60°C και συνεχίζεται η ανάδευση για όσο χρόνο υπολείπεται.

- Μεταφορά του δείγματος / Φυγοκέντριση: Μετά το τέλος της επώασης μεταφέρουμε 1ml του δείγματος σε μικροσωληνάριο του 1.5ml και φυγοκεντρείται στη φυγόκεντρο για δεκα λεπτά.
- Μεταφορά υπερκειμένου: Μετά τη φυγοκέντριση παίρνουμε μια ποσότητα υπερκειμένου (0,5 – 0,8ml) και τη μεταφέρουμε σε νέο, καθαρό μικροσωληνάριο του 1,5ml.
- Φύλαξη υπερκειμένου: Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί αμέσως μετά ή σε θερμοκρασία ψυγείου για πέντε ημέρες το μέγιστο.(Poms et al. 2004, Johns and Jones 1916, Bruijnzeel-Koomen 1995, Sampson 1998, 1999, Emmett et al. 1999, Wuëthrich 2000)

## Προετοιμασία *ELISA* / συνθήκες

Η διάρκεια της *ELISA*, από την αραιώση των δειγμάτων έως τη μέτρηση στο φωτόμετρο, είναι 100 – 120 λεπτά, ανάλογα με τον συνολικό αριθμό των δειγμάτων. Από τη στιγμή που θα αρχίσει η *ELISA*, δεν μπορεί να υπάρξει προσωρινή διακοπή της διαδικασίας, αλλά αυτή πρέπει να συνεχιστεί μέχρι τέλους. Ο μέγιστος αριθμός σε μικροτριβλία είναι 48, ο οποίος ισοδυναμεί με το μισό *kit* και αντιστοιχεί σε 14, το μέγιστο, άγνωστα δείγματα. Τα δείγματα που μπαίνουν στα μικροτριβλία περιγράφονται παρακάτω. Ως άγνωστα δείγματα χαρακτηρίζονται όλα τα προς εξέταση τρόφιμα. Τα πρότυπα δείγματα φιστικιού χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Κατά την εκτέλεση της *ELISA* σε κάποια μικροτριβλία τοποθετούμε λευκό δείγμα το οποίο δεν είναι άλλο από το διάλυμα αραιώσης. Ο αρνητικός μάρτυρας είναι το δείγμα το οποίο χρησιμοποιείται για να καταδείξει ότι δεν υπήρξε επιμόλυνση κατά την εκτέλεση της μεθόδου. Το δείγμα ποιοτικού ελέγχου (QC) επιβεβαιώνει ότι η μέθοδος εκτελέστηκε κανονικά και ότι η μικρόπλακα και τα αντιδραστήρια είναι κατάλληλα προς χρήση. Η διάταξη των δειγμάτων αυτών καθορίζεται κατά τον σχεδιασμό της ανάλυσης. Για κάθε άγνωστο δείγμα αντιστοιχούν δυο θέσεις (ανάλυση εις διπλούν). Σε κάθε

μικρόπλακα ανεξαρτήτως του αριθμού των δειγμάτων καταλαμβάνονται οι εξής θέσεις (μικροτριβλία):

Πίνακας 1. Διάταξη δειγμάτων.

	Θέσεις (μικροτριβλία)
Πρότυπα δείγματα φιστικιού	$2 \times 4 = 8$
Αρνητικός μάρτυρας	2
Δείγμα ποιοτικού ελέγχου	2
Σύνολο	12

Ο συνολικός αριθμός των *strips* (των 8 θέσεων) που χρησιμοποιούνται εξαρτάται από τον αριθμό των άγνωστων δειγμάτων. Ανάλογα με τον αριθμό των άγνωστων δειγμάτων διαφοροποιείται και το πλήθος των λευκών δειγμάτων:

Πίνακας 2. Πλήθος λευκών δειγμάτων ανάλογα με τον αριθμό των άγνωστων δειγμάτων.

Αριθμός άγνωστων δειγμάτων (οι θέσεις που καταλαμβάνονται είναι διπλάσιες από τις αναγραφόμενες πιο κάτω)	Αριθμός χρησιμοποιούμενων strips (των 8 θέσεων)	Πλήθος λευκών δειγμάτων
1 – 5	3	2
6 – 8	4	4
9 – 12	5	4
13 – 15	6	6

Παρακάτω δίνονται παραδείγματα για τη διάταξη των δειγμάτων στη μικροπλάκα *ELISA*, όπου Δ1 – Δ14 είναι τα άγνωστα δείγματα, S1 – S4 είναι τα πρότυπα δείγματα φυστικιού, zero είναι το λευκό δείγμα, Bisc είναι ο αρνητικός μάρτυρας και QC το δείγμα ποιοτικού ελέγχου.

Πίνακας 3. Διάταξη δειγμάτων στη μικροπλάκα *ELISA* για 1 - 5 δείγματα.

	1	2	3
A	Δ1	Δ5	Δ5
B	Δ2	Zero	Zero
C	Δ3	S1	S1
D	Δ4	S2	S2
E	Δ1	S3	S3
F	Δ2	S4	S4
G	Δ3	Bisc	Bisc
H	Δ4	QC	QC

Πίνακας 4. Διάταξη δειγμάτων στη μικροπλάκα ELISA για 6 - 8 δείγματα

	1	2	3	4
A	Δ1	Δ8	Δ1	Δ8
B	Δ2	Zero	Δ2	Zero
C	Δ3	S1	Δ3	S1
D	Δ4	S2	Δ4	S2
E	Δ5	S3	Δ5	S3
F	Δ6	S4	Δ6	S4
G	Δ7	Bisc	Δ7	Bisc
H	QC	Zero	QC	Zero

Πίνακας 5. Διάταξη δειγμάτων στη μικροπλάκα ELISA για 9 - 12 δείγματα.

	1	2	3	4	5
A	Δ1	Δ8	Δ1	Δ8	Δ9
B	Δ2	Zero	Δ2	Zero	Δ10
C	Δ3	S1	Δ3	S1	Δ11
D	Δ4	S2	Δ4	S2	Δ12
E	Δ5	S3	Δ5	S3	Δ9
F	Δ6	S4	Δ6	S4	Δ10
G	Δ7	Bisc	Δ7	Bisc	Δ11
H	QC	Zero	QC	Zero	Δ12

Πίνακας 6. Διάταξη δειγμάτων στη μικροπλάκα ELISA για 13 -15 δείγματα.

	1	2	3	4	5	6
A	Δ1	Δ7	Δ1	Δ8	Δ7	Δ8
B	Δ2	Zero	Δ2	Δ9	Zero	Δ9
C	Δ3	S1	Δ3	Δ10	S1	Δ10
D	Δ4	S2	Δ4	Δ11	S2	Δ11
E	Δ5	S3	Δ5	Δ12	S3	Δ12
F	Δ6	S4	Δ6	Δ13	S4	Δ13
G	Zero	Bisc	Δ14	Zero	Bisc	Δ14
H	QC	Zero	Δ15	QC	Zero	Δ15

Πριν από την έναρξη της ανάλυσης, τα περιεχόμενα του *kita* φηνονται τουλάχιστον 30 λεπτά εκτός ψυγείου και εκτός συσκευασίας σε θερμοκρασία δωματίου για να αποκτήσουν την επιθυμητή θερμοκρασία. Η *ELISA* εκτελείται σε θερμοκρασία που διατηρείται στους 20°C. Το φωτόμετρο τίθεται σε λειτουργία τουλάχιστον 5 λεπτά πριν από τη στιγμή της μέτρησης των οπτικών πυκνοτήτων. (Nordlee *et al.* 1981, Olszewski *et al.* 1998, Herianet *et al.* 1993, Holzhauser and Vieths 1999, Koppelman *et al.* 1999, Leduc *et al.* 1999, Mills *et al.* 1997, Helbling *et al.* 1992, Mata *et al.* 1994, Oldaeus *et al.* 1991)

## Εκτέλεση *ELISA*

Με τη χρήση της κατάλληλης αυτόματης μηχανικής πιέτιδας και με βάση την προσχεδιασμένη διάταξη των δειγμάτων, σε κάθε μικροτριβλίο προστίθενται 100μl από: διάλυμα αραίωσης για τα λευκά δείγματα, πρότυπα διαλύματα φιστικιού, άγνωστα δείγματα, αρνητικό μάρτυρα και δείγμα ποιοτικού ελέγχου. Σε κάθε προσθήκη χρησιμοποιείται νέο καθαρό ρύγχος το οποίο στη συνέχεια απορρίπτεται. Στη συνέχεια ακολουθεί ανάδευση της μικροπλάκας η οποία είναι ήπια και γίνεται χειροκίνητα πάνω στην επίπεδη επιφάνεια του πάγκου εργασίας για 5 – 10 δευτερόλεπτα. Έπειτα ακολουθεί η έκπλυση κατά την οποία γίνεται απομάκρυνση του περιεχομένου από τα μικροτριβλία. Η

έκπλυση γίνεται αυτόματα με τη βοήθεια της συσκευής έκπλυσης μικροπλακών. Αφού απομακρυνθεί το περιεχόμενο, στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα έκπλυσης και η διαδικασία επαναλαμβάνεται τέσσερις επιπλέον φορές, έτσι ώστε συνολικά, μετά τη διαδικασία αυτή να έχουν πραγματοποιηθεί εναλλάξ πέντε απορροφήσεις και πέντε πληρώσεις, ακολουθούμενες από μια τελική (έκτη) απορρόφηση. Στη συνέχεια με τη χρήση πολυκάναλης μηχανικής πιπέτας, προστίθενται 50μlβιοτινυλιωμένο αντίσωμα κωναραχίνης σε όλες τις θέσεις. Ακολουθεί ήπια χειροκίνητη ανάδευση της μικροπλάκας στην επίπεδη επιφάνεια του πάγκου εργασίας για 5 – 10 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια γίνεται επώαση για 15 λεπτά και μετά απομακρύνουμε το περιεχόμενο των μικροτριβλίων και γίνεται έκπλυση όπως περιγράφεται πιο πάνω. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 50μl του συμπλόκου Στρεπταβιδίνη/Υπεροξειδάση με τη χρήση πολυκάναλης μηχανικής πιπέτας σε όλες τις θέσεις. Ακολούθως με τη χρήση αυτόματης πολυκάναλης μηχανικής πιπέτας προστίθενται 100μl TMB σε όλες τις θέσεις. Κατά τη διάρκεια της επώασης, στα θετικά δείγματα θα εμφανιστεί μπλε χρώμα. Εφαρμόζουμε ήπια χειροκίνητη ανάδευση ανάδευση της μικροπλάκας πάνω στην επίπεδη επιφάνεια του πάγκου εργασίας για 5 – 10 δευτερόλεπτα. Ακολουθεί η προσθήκη 50μl *stopsolution* με τη χρήση αυτόματης πολυκάναλης μηχανικής πιπέτας σε όλες τις θέσεις. Η μικροπλάκα αναδεύεται ήπια και το χρώμα μετατρέπεται από μπλε σε κίτρινο. Τελειώνοντας γίνεται η μέτρηση των οπτικών πυκνοτήτων, η οποία γίνεται το αργότερο 10 λεπτά μετά την προσθήκη του *stopsolution*. Γίνεται στη συσκευή *ELISA* χρησιμοποιώντας φίλτρο 450nm. (Koch *et al.* 2003, ISO 2003, Hlywka *et al.* 2000, Hefe *et al.* 1994)

## **Υπολογισμοί – Εκτίμηση αποτελεσμάτων**

Για τον χαρακτηρισμό ενός δείγματος ως θετικού ή αρνητικού εκτιμώνται τα αποτελέσματα των αντιδράσεων ελέγχου, κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς από τις συγκεντρώσεις των προτύπων δειγμάτων φιστικιού σε συνάρτηση των οπτικών πυκνοτήτων στα 450nm, υπολογίζεται η συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος και συγκρίνεται η υπολογισθείσα τιμή με το όριο ανίχνευσης της μεθόδου. . (Koch *et al.* 2003, ISO 2003, Hlywka *et al.* 2000, Hefe *et al.* 1994)



## Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων ελέγχου

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων ελέγχου λαμβάνονται υπόψη τα παρακάτω:

**Λευκό δείγμα:** Το λευκό δείγμα αναμένεται να δίνει τιμές  $OD_{450nm} < 0,192$ . Ο συντελεστής διακύμανσης (coefficient of variation) των λευκών δειγμάτων δε θα πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 15%. Σε αντίθετη περίπτωση, υποδηλώνεται είτε ανεπαρκής έκπλυση κατά την *ELISA*, είτε επιμόλυνση του υποστρώματος TMB. Στην περίπτωση αυτή η *ELISA* θα πρέπει να επαναληφθεί.

**Αρνητικός μάρτυρας:** Ο αρνητικός μάρτυρας αναμένεται να δίνει τιμές  $OD_{450nm} < 0,201$ . Τιμές μεγαλύτερες δηλώνουν επιμόλυνση από θετικό δείγμα κατά την εκτέλεση της μεθόδου. Όλη η διαδικασία (εκχύλιση – *ELISA*) θα πρέπει να επαναληφθεί.

**Δείγμα ποιοτικού ελέγχου:** Επειδή η μέθοδος είναι ποιοτική είναι σημαντικό να επαληθεύεται το όριο ανίχνευσης για κάθε ημέρα εργασίας. Το δείγμα ποιοτικού ελέγχου είναι μπισκότο εμβολιασμένο με *Peanut Spike Control* σε επίπεδο συγκέντρωσης που αντιστοιχεί στο όριο ανίχνευσης της μεθόδου ( $=0,5\text{mg}$  φιστικιού/kg). Η Παρασκευή του γίνεται όπως περιγράφεται πιο πάνω, κάθε φορά που εκτελείται η μέθοδος και πρέπει να δίνει τιμές  $OD_{450nm}$  οι οποίες να βρίσκονται εντός των προκαθορισμένων ορίων του διαγράμματος ελέγχου ποιότητας. Στην περίπτωση που κατά τον έλεγχο εμφανιστεί απόκλιση από τα όρια του διαγράμματος ελέγχου, διακόπτονται οι αναλύσεις των δειγμάτων μέχρι να βρεθεί η αιτία και να επιλυθεί το πρόβλημα. (Koch et al. 2003, ISO 2003, Hlywka et al. 2000, Hefe et al. 1994, EFSA 2003)

## Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη από τις συγκεντρώσεις των πρότυπων δειγμάτων φιστικιού S1, S2, S3 και S4, συγκεντρώσεων 1, 2, 5 και 10 ppm αντίστοιχα, συναρτήσει των  $OD_{450nm}$  που αντιστοιχούν σε αυτές. Η καμπύλη είναι πρώτου βαθμού της μορφής  $Y = aX + b$ . Η πρότυπη καμπύλη θα πρέπει να δίνει συντελεστή συσχέτισης

(correlationcoefficient)  $r^2 \geq 0.98$ .(Kochetal. 2003, ISO 2003, Hlywkaetal. 2000, Hefeetal. 1994, EFSA 2003)

### **Υπολογισμός της συγκέντρωσης δείγματος**

Από την πρότυπη καμπύλη και την OD450nm κάθε δείγματος υπολογίζεται η αντίστοιχη συγκέντρωση. Η συγκέντρωση εκφράζεται σε ppmφιστικιού, δηλαδή σε mg φιστικιού ανα kgτροφίμου. (Koch et al. 2003, ISO 2003, Hlywka et al. 2000, Hefe et al. 1994, EFSA 2003)

### **Αποδοχή αποτελέσματος. Χαρακτηρισμός δείγματος.**

Ένα άγνωστο δείγμα χαρακτηρίζεται ως θετικό εφόσον:

- Οι αντιδράσεις ελέγχου είναι σύμφωνες με ό,τι προβλέπει η μέθοδος.
- Και οι δυο επαναλήψεις του άγνωστου δείγματος έχουν δώσει τιμές μεγαλύτερες από το όριο ανίχνευσης.
- Οι δυο επαναλήψεις παρουσιάζουν συντελεστή διακύμανσης (*coefficientofvariation*) μικρότερο ή ίσο του 20%.

Ένα άγνωστο δείγμα χαρακτηρίζεται ως αρνητικό εφόσον:

- Οι αντιδράσεις ελέγχου είναι σύμφωνες με ό,τι προβλέπει η μέθοδος.
- Και οι δυο επαναλήψεις του αγνωστου δείγματος έχουν δώσει τιμές μικρότερες ή ίσες από το όριο ανίχνευσης.
- Οι δυο επαναλήψεις παρουσιάζουν συντελεστή διακύμανσης μικρότερο ή ίσο του 20%

Σε κάθε άλλη περίπτωση το δείγμα δεν μπορεί να χαρακτηριστεί και απαιτείται η επανάληψη της μεθόδου. Σε περίπτωση που και πάλι δεν μπορεί να χαρακτηριστεί το δείγμα, για τους ίδιους λόγους, και πριν από οποιαδήποτε άλλη ενέργεια, διερευνούνται όλα τα στάδια της μεθόδου και αντικαθίστανται όλα τα αντιδραστήρια

συμπεριλαμβανομένων των αντιδραστηρίων του kit.(Kochetal. 2003, ISO 2003, Hlywkaetal. 2000, Hefeetal. 1994, EFSA 2003)

## **ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ**

Στο κεφάλαιο αυτό παρατίθενται τα άρθρα της ευρωπαϊκής νομοθεσίας, τα οποία αναφέρονται στα τρόφιμα που περιέχουν αλλεργιογόνες ουσίες.

**ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) αριθ. 1169/2011 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 25ης Οκτωβρίου 2011 σχετικά με την παροχή πληροφοριών για τα τρόφιμα στους καταναλωτές, την τροποποίηση των κανονισμών του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου (ΕΚ) αριθ. 1924/2006 και (ΕΚ) αριθ. 1925/2006 και την κατάργηση της οδηγίας 87/250/ΕΟΚ της Επιτροπής, της οδηγίας 90/496/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της οδηγίας 1999/10/ΕΚ της Επιτροπής, της οδηγίας 2000/13/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, των οδηγιών της Επιτροπής 2002/67/ΕΚ και 2008/5/ΕΚ και του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 608/2004 της Επιτροπής.**

### **Άρθρο 9**

Κατάλογος υποχρεωτικών ενδείξεων

1. Σύμφωνα με τα άρθρα 10 έως 35 και με την επιφύλαξη των εξαιρέσεων που προβλέπονται στο παρόν κεφάλαιο, είναι υποχρεωτική η αναγραφή των ακόλουθων ενδείξεων:

α) η ονομασία του τροφίμου·

β) ο κατάλογος των συστατικών·

γ) κάθε συστατικό ή τεχνολογικό βοήθημα που απαριθμείται στο παράρτημα II ή προέρχεται από ουσία ή προϊόν που απαριθμείται στο παράρτημα II και το οποίο προκαλεί αλλεργίες ή

δυσανεξίες και χρησιμοποιείται στην παραγωγή ή Παρασκευή ενός τροφίμου και εξακολουθεί να υπάρχει στο τελικό προϊόν, ακόμη και σε τροποποιημένη μορφή·

δ) η ποσότητα ορισμένων συστατικών ή κατηγοριών συστατικών·

ε) η καθαρή ποσότητα του τροφίμου·

στ) η ημερομηνία ελάχιστης διατηρησιμότητας και η τελική ημερομηνία ανάλωσης («ανάλωση έως»)

ζ) τυχόν ιδιαίτερες συνθήκες αποθήκευσης και/ή συνθήκες χρήσης·

η) το όνομα ή η εμπορική επωνυμία και η διεύθυνση του υπευθύνου επιχείρησης τροφίμων που αναφέρεται στο άρθρο 8 παράγραφος 1·

θ) η χώρα καταγωγής ή ο τόπος προέλευσης όπως προβλέπεται

στο άρθρο 26·

ι) οδηγίες χρήσης, εφόσον η παράλειψή τους θα δυσχέραινε τη

σωστή χρήση του τροφίμου·

ια) για τα ποτά με περιεκτικότητα σε αιθυλική αλκοόλη μεγαλύτερη από 1,2% κατ' όγκον, η αναγραφή του αποκτηθέντος κατ' όγκον αλκοολικού τίτλου·

ιβ) διατροφική δήλωση. (Η πρόσβαση στο δίκαιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, FAO 1999)

## **Άρθρο 18**

### **Κατάλογος των συστατικών**

1. Του καταλόγου των συστατικών προηγείται κατάλληλος τίτλος ή ένδειξη που συνίσταται στη λέξη «συστατικά» ή περιέχει τη λέξη αυτή. Ο εν λόγω κατάλογος περιλαμβάνει όλα τα συστατικά του τροφίμου, κατά φθίνουσα σειρά περιεκτικότητας ως προς το βάρος, όπως καταγράφηκαν κατά τη στιγμή της χρησιμοποίησής τους στην παρασκευή του τροφίμου.

2. Τα συστατικά αναφέρονται με το ειδικό τους όνομα, εφόσον έχουν, σύμφωνα με τους κανόνες που προβλέπονται στο άρθρο 17 και στο παράρτημα VI.

3. Όλα τα συστατικά που περιέχονται υπό τη μορφή τεχνολογικώς επεξεργασμένων νανοϋλικών αναγράφονται σαφώς στον κατά λογο των συστατικών. Τα ονόματα αυτών των συστατικών ακολουθούνται από τη λέξη «νανο» σε παρένθεση.

4. Οι τεχνικοί κανόνες για την εφαρμογή των παραγράφων 1 και 2 του παρόντος άρθρου και καθορίζονται στο παράρτημα VII.

5. Για την επίτευξη των στόχων του παρόντος κανονισμού, η Επιτροπή, μέσω κατ' εξουσιοδότηση πράξεων σύμφωνα με το άρθρο 51, προσαρμόζει τον ορισμό των τεχνολογικά επεξεργασμένων νανοϋλικών που εμφανίζονται στο άρθρο 2 παράγραφος 2 στοιχείο κ) στην τεχνική και επιστημονική πρόοδο ή στους ορισμούς που συμφωνούνται σε διεθνές επίπεδο. (Η πρόσβαση στο δίκαιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, FAO 1999)

## **Άρθρο 21**

Επισήμανση ορισμένων ουσιών ή προϊόντων που προκαλούν αλλεργίες ή δυσανεξίες

1. Με την επιφύλαξη των κανόνων που θεσπίζονται δυνάμει του άρθρου 44 παράγραφος 2, οι ενδείξεις που προβλέπονται στο άρθρο 9 παράγραφος 1 στοιχείο γ) πληρούν τις ακόλουθες απαιτήσεις:

α) αναγράφονται στον κατάλογο των συστατικών σύμφωνα με τους κανόνες του άρθρου 18 παράγραφος 1, με σαφή αναφορά της ονομασίας της ουσίας ή του προϊόντος όπως περιλαμβάνεται στο παράρτημα II· και

β) η ονομασία της ουσίας ή του προϊόντος όπως περιλαμβάνεται στο παράρτημα II τονίζεται με είδος χαρακτήρων που κάνει σαφή διάκριση της ονομασίας από το υπόλοιπο του καταλόγου των συστατικών, παραδείγματος χάριν μέσω της γραμματοσειράς, της μορφής ή του χρώματος του φόντου. Αν δεν υπάρχει κατάλογος συστατικών, η αναγραφή των ενδείξεων που προβλέπονται στο άρθρο 9 παράγραφος 1 στοιχείο

γ) περιλαμβάνει τη λέξη «περιέχει», ακολουθούμενη από την ονομασία της ουσίας ή του προϊόντος όπως περιλαμβάνεται στο παράρτημα II. Σε περίπτωση που διάφορα συστατικά ή τεχνολογικά βοηθήματα τροφίμων προέρχονται από μία μόνη ουσία ή προϊόν που

απαριθμείται στο παράρτημα II, διευκρινίζεται στην επισήμανση για κάθε σχετικό συστατικό ή τεχνολογικό βοήθημα. Η αναγραφή των ενδείξεων που αναφέρονται στο άρθρο 9 παράγραφος 1 στοιχείο γ) δεν απαιτείται σε περιπτώσεις όπου η ονομασία του τροφίμου αναφέρεται σαφώς στην εν λόγω ουσία ή προϊόν.

2. Προκειμένου να διασφαλίζεται καλύτερη πληροφόρηση για τους καταναλωτές και να λαμβάνονται υπόψη οι τελευταίες επιστημονικές προόδους και οι τεχνικές γνώσεις, η Επιτροπή επανεξετάζει συστηματικά και, εφόσον είναι απαραίτητο, ενημερώνει τον κατάλογο του παραρτήματος II με κατ' εξουσιοδότηση πράξεις, σύμφωνα με το άρθρο 51. Εφόσον, στην περίπτωση εμφάνισης κινδύνου για την υγεία των καταναλωτών, επιτακτικοί λόγοι επείγοντος το απαιτούν, η διαδικασία του άρθρου 52 εφαρμόζεται στις κατ' εξουσιοδότηση πράξεις που θεσπίζονται σύμφωνα με το παρόν άρθρο. (Η πρόσβαση στο δίκαιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, FAO 1999)

## **Άρθρο 44**

Εθνικά μέτρα για τα μη προσυσκευασμένα τρόφιμα

1. Για τα τρόφιμα που προσφέρονται μη προσυσκευασμένα για πώληση στον τελικό καταναλωτή ή σε μονάδες ομαδικής εστίασης ή για τα τρόφιμα που συσκευάζονται στον τόπο πώλησης, εφόσον το ζητήσει ο αγοραστής, ή προσυσκευάζονται για άμεση πώληση,

α) η παροχή των ενδείξεων που ορίζονται στο άρθρο 9 παράγραφος 1 στοιχείο γ) είναι υποχρεωτική·

β) η παροχή άλλων ενδείξεων που προβλέπονται στα άρθρα 9 και 10 δεν είναι υποχρεωτική, εκτός εάν τα κράτη μέλη θεσπίζουν εθνικά μέτρα που απαιτούν την παροχή ορισμένων ή όλων αυτών των ενδείξεων ή στοιχείων αυτών των ενδείξεων.

2. Τα κράτη μέλη μπορούν να θεσπίζουν εθνικά μέτρα σχετικά με τον τρόπο διάθεσης των ενδείξεων ή των στοιχείων των ενδείξεων που ορίζονται στην παράγραφο 1 και, εφόσον συντρέχει λόγος, τη μορφή έκφρασης και παρουσίασής τους.

3. Τα κράτη μέλη γνωστοποιούν χωρίς καθυστέρηση στην Επιτροπή το κείμενο των μέτρων που αναφέρονται στην παράγραφο 1 στοιχείο β) και στην παράγραφο 2. (Η πρόσβαση στο δίκαιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, FAO 1999)

## Άρθρο 51

### Άσκηση της εξουσιοδότησης

1. Η εξουσία να εκδίδει κατ' εξουσιοδότηση πράξεις ανατίθεται στην Επιτροπή υπό τους όρους που θεσπίζονται στο παρόν άρθρο.

2. Η εξουσία να εκδίδει κατ' εξουσιοδότηση πράξεις που αναφέρεται στο άρθρο 9 παράγραφος 3, το άρθρο 10 παράγραφος 2, το άρθρο 12 παράγραφος 3, το άρθρο 13 παράγραφος 4, το άρθρο 18 παράγραφος 5, το άρθρο 19 παράγραφος 2, το άρθρο 21 παράγραφος 2, το άρθρο 23 παράγραφος 2, το άρθρο 30 παράγραφος 6, το άρθρο 31 παράγραφος 2, το άρθρο 36 παράγραφος 4 και το άρθρο 46 ανατίθεται στην Επιτροπή για διάστημα πέντε ετών μετά τη 12η Δεκεμβρίου 2011. Η Επιτροπή συντάσσει έκθεση σχετικά με τις εξουσίες που της έχουν ανατεθεί το αργότερο εννέα μήνες πριν από τη λήξη του διαστήματος των πέντε ετών. Η ανάθεση εξουσιών ανανεώνεται σιωπηρά για διαστήματα ίδιας διάρκειας, εκτός εάν το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο ή το Συμβούλιο αντιταχθεί σε αυτήν την ανανέωση το αργότερο τρεις μήνες πριν από τη λήξη κάθε διαστήματος.

3. Η ανάθεση εξουσιών που αναφέρεται στο άρθρο 9 παράγραφος 3, το άρθρο 10 παράγραφος 2, το άρθρο 12 παράγραφος 3, το άρθρο 13 παράγραφος 4, το άρθρο 18 παράγραφος 5, το άρθρο 19 παράγραφος 2, το άρθρο 21 παράγραφος 2, το άρθρο 23 παράγραφος 2, το άρθρο 30 παράγραφος 6, το άρθρο 31 παράγραφος 2, το άρθρο 36 παράγραφος 4 και το άρθρο 46 μπορεί να ανακληθεί ανά πάσα στιγμή από το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο ή το Συμβούλιο. Η απόφαση ανάκλησης περατώνει την εξουσιοδότηση που καθορίζεται στην απόφαση αυτή. Αρχίζει να ισχύει την επομένη ημέρα από τη δημοσίευση της απόφασης στην Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης ή οιαδήποτε



μεταγενέστερη ημερομηνία την οποία ορίζει σαφώς η απόφαση. Δεν θίγει την εγκυρότητα τυχόν κατ' εξουσιοδότηση πράξεων που ισχύουν ήδη.

4. Η Επιτροπή, μόλις εκδώσει πράξη κατ' εξουσιοδότηση, την κοινοποιεί πάραυτα στο Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και στο Συμβούλιο.

5. Μια κατ' εξουσιοδότηση πράξη που έχει εκδοθεί σύμφωνα με το άρθρο 9 παράγραφος 3, το άρθρο 10 παράγραφος 2, το άρθρο 12 παράγραφος 3, το άρθρο 13 παράγραφος 4, το άρθρο 18 παράγραφος 5, το άρθρο 19 παράγραφος 2, το άρθρο 21 παράγραφος 2, το άρθρο 23 παράγραφος 2, το άρθρο 30 παράγραφος 6, το άρθρο 31 παράγραφος 2, το άρθρο 36 παράγραφος 4 και το άρθρο 46 τίθεται σε ισχύ μόνο εάν το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο ή το Συμβούλιο δεν έχει εκφράσει την αντίθεσή του εντός προθεσμίας δύο μηνών από την κοινοποίηση της εν λόγω πράξης στο Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και το Συμβούλιο ή εάν, πριν από τη λήξη της προθεσμίας αυτής, τόσο το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο όσο και το Συμβούλιο, έχουν ενημερώσει την Επιτροπή ότι δεν σκοπεύουν να διατυπώσουν αντιρρήσεις. Το διάστημα αυτό παρατείνεται κατά δύο μήνες με πρωτοβουλία του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου ή του Συμβουλίου. (Η πρόσβαση στο δίκαιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, FAO 1999)

## **Άρθρο 52**

### **Διαδικασία επείγοντος**

1. Οι κατ' εξουσιοδότηση πράξεις που εκδίδονται σύμφωνα με το παρόν άρθρο τίθενται σε ισχύ αμέσως και εφαρμόζονται εφόσον δεν έχει διατυπωθεί αντίρρηση σύμφωνα με την παράγραφο 2. Η κοινοποίηση στο Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και στο Συμβούλιο κατ' εξουσιοδότηση πράξης εκθέτει τους λόγους για τους οποίους γίνεται χρήση της διαδικασίας του επείγοντος.

2. Το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο ή το Συμβούλιο μπορούν να διατυπώσουν αντιρρήσεις σχετικά με κατ' εξουσιοδότηση πράξη σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρεται στο άρθρο 51 παράγραφος 5. Σε αυτήν την περίπτωση, η Επιτροπή καταργεί χωρίς καθυστέρηση την πράξη μετά την κοινοποίηση στην οποία προβαίνει το Ευρωπαϊκό

Κοινοβούλιο ή το Συμβούλιο όσον αφορά την απόφασή του να προβάλει αντιρρήσεις.(Η πρόσβαση στο δίκαιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, FAO 1999)

### **Ουσίες ή προϊόντα που προκαλούν αλλεργίες ή δυσανεξίες**

1. Δημητριακά που περιέχουν γλουτένη, δηλαδή: σιτάρι, σίκαλη, κριθάρι, βρώμη, όλυρα, σιτηρό *kamut* ή υβριδικές ποικιλίες τους, και προϊόντα με βάση τα δημητριακά αυτά, εκτός από:

α) σιρόπια γλυκόζης με βάση το σιτάρι, συμπεριλαμβανομένης της δεξτρόζης και τα προϊόντα τους, στον βαθμό που η επεξεργασία την οποία έχουν υποστεί δεν είναι πιθανό να αυξήσει το επίπεδο αλλεργιογένεσης που εκτιμήθηκε από την EAAT για το σχετικό προϊόν από το οποίο προέρχονται.

β) μαλτοδεξτρίνες με βάση το σιτάρι και τα προϊόντα τους, στον βαθμό που η επεξεργασία την οποία έχουν υποστεί δεν είναι πιθανό να αυξήσει το επίπεδο αλλεργιογένεσης που εκτιμήθηκε από την EAAT για το σχετικό προϊόν από το οποίο προέρχονται.

γ) σιρόπια γλυκόζης με βάση το κριθάρι.

δ) σιτηρά που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αλκοολούχων αποσταγμάτων, συμπεριλαμβανομένης της αιθυλικής αλκοόλης γεωργικής προέλευσης.

2. Καρκινοειδή και προϊόντα με βάση τα καρκινοειδή.

3. Αυγά και προϊόντα με βάση τα αυγά.

4. Ψάρια και προϊόντα με βάση τα ψάρια, εκτός από:

α) ζελατίνη ψαριών που χρησιμοποιείται ως φορέας σκευασμάτων βιταμινών ή καροτενοειδών.

β) ζελατίνη ψαριών ή ιχθυόκολλα που χρησιμοποιείται ως διαλυτικό μέσο σε μπύρες και οίνους.

5. Αραχίδες (αράπικα φιστίκια) και προϊόντα με βάση τις αραχίδες.

6. Σόγια και προϊόντα με βάση τη σόγια, εκτός από:

α) πλήρως ραφινρισμένο σογιέλαιο και λίπη που προέρχονται από σόγια και τα προϊόντα τους, στον βαθμό που η επεξεργασία την οποία έχουν υποστεί δεν είναι πιθανό να αυξήσει το επίπεδο αλλεργιογένεσης που εκτιμήθηκε από την ΕΑΑΤ για το σχετικό προϊόν από το οποίο προέρχονται·

β) τοκοφερόλες που έχουν αναμειχθεί με φυσικό τρόπο (E306), φυσική D-άλφα τοκοφερόλη, φυσική D-άλφα οξική τοκοφερόλη, φυσική D-άλφα ηλεκτρική τοκοφερόλη από σπέρματα σόγιας·

γ) φυτοστερόλες και φυτοστερολεστέρες που προέρχονται από φυτικά έλαια από σπέρματα σόγιας·

δ) φυτοσιανολεστέρα που παράγεται από στερόλες φυτικών ελαίων από σπέρματα σόγιας.

7. Γάλα και προϊόντα με βάση το γάλα (συμπεριλαμβανομένης της λακτόζης), εκτός από:

α) τον ορό γάλακτος που χρησιμοποιείται για την παραγωγή αλκοολούχων αποσταγμάτων συμπεριλαμβανομένης της αιθυλικής αλκοόλης γεωργικής προέλευσης·

β) λακτιτόλη.

8. Καρποί με κέλυφος, δηλαδή: αμύγδαλα (*Amygdalus communis* L.), φουντούκια (*Corylus avellana*), καρύδια (*Juglans regia*), καρύδια κάσιους (*Anacardium occidentale*), καρύδια πεκάν [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch], καρύδια Βραζιλίας (*Bertholletia excelsa*), φυστίκια (*Pistacia vera*), καρύδια μακαντάμια ή καρύδια Κουίνσλαντ (*Macadamia ternifolia*) και προϊόντα με βάση τα ανωτέρω, εκτός από καρπούς με κέλυφος χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αλκοολούχων αποσταγμάτων συμπεριλαμβανομένης της αιθυλικής αλκοόλης γεωργικής προέλευσης.

9. Σέλινο και προϊόντα με βάση το σέλινο.

10. Σινάπι και προϊόντα με βάση το σινάπι.

11. Σπόροι σησαμιού και προϊόντα με βάση τους σπόρους σησαμιού.

12. Το διοξείδιο του θείου και οι θειώδεις ενώσεις σε συγκεντρώσεις άνω των 10mg/kg ή 10mg/litre εκπεφρασμένα ως SO<sub>2</sub> που υπολογίζονται στα προϊόντα που προσφέρονται έτοιμα για κατανάλωση ή που ανασυστάθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

13. Λούπινο και προϊόντα με βάση το λούπινο.

14. Μαλάκια και προϊόντα με βάση τα μαλάκια.(Aalberse 2000, Breiteneder and Ebner 2000, Besler M. *et al.*2000, Hourihane *et al.*1997, Hansen and Bindslev-Jensen 1992, Norgaard and Bindslev-Jensen 1992, Malmheden *et al.*1994, Nordlee and Taylor 1995, Holzhauser *et al.* 1998)

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο προσδιορισμός αλλεργιογόνων ουσιών στα τρόφιμα είναι πολύ σημαντικός για τη δημόσια υγεία. Τα τελευταία χρόνια αυξάνονται ολοένα και περισσότερο οι έρευνες για αλλεργιογόνα τρόφιμα και βλέπουμε ότι δίνεται μεγάλη προσοχή στον τομέα αυτό. Κατά τη διάρκεια εκπόνησης της πρακτικής μου άσκησης στη διεύθυνση τροφίμων του Γενικού Χημείου του Κράτους, παρατήρησα ότι ο Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων έκανε συνεχείς ελέγχους είτε σε τρόφιμα που κυκλοφορούν ήδη στην Ελληνική αγορά, είτε σε νεοεισαχθέντα τρόφιμα για το αν περιέχουν ή όχι αλλεργιογόνες ουσίες. Τα περισσότερα δείγματα που ελέγχονταν ήταν κατά κύριο λόγο σοκολάτες και προϊόντα που ανέφεραν ότι δεν περιέχουν γλουτένη. Τα περισσότερα από αυτά τα τρόφιμα δεν ακολουθούσαν τη νομοθεσία, μιας και περιείχαν ίχνη κάποιου αλλεργιογόνου και δεν αναγραφόταν στην ετικέτα τους. Στην περίπτωση αυτή γινόταν ανάκληση της παρτίδας μέχρι να γίνουν οι απαραίτητες διορθωτικές ενέργειες. Κάτι άλλο πολύ σημαντικό που παρατήρησα είναι ότι γίνονται προσπάθειες μέσω ερευνών να μειωθούν τα όρια ανίχνευσης των αλλεργιογόνων ουσιών ώστε να είναι 100% ασφαλή.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aalberse R.C., (2000) *J. Allergy Clin. Immunol.* 106, 228.
- Acosta M.R., Roux K.H., Teuber S.S., Sathe S.K., (1999) *J. Agric. Food Chem.* 47 4053.
- Bando N., Tsuji H., Hiemori M., Yoshizumi K., Yamanishi R., Kimoto M., Ogawa T., (1998) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 44 655.
- Besler M., Ortolani C., Vieths S., (2000) *Internet Symposium on Food Allergens*, 2 (Suppl. 4) 1 [<http://www.food-allergens.de>].
- Besler M., Steinhart H., Paschke A., (2000) *Internet Symposium on Food Allergens*, 2 171 [<http://www.food-allergens.de>]. Τελευταία επίσκεψη 25/9/2013
- Blais B.W., Phillippe L.M., (2000) *Food Agric. Immunol.* 12 243.
- Breiteneder H., Ebner C., (2000) *J. Allergy Clin. Immunol.* 106, 27.
- Bruijnzeel-Koomen C., Ortolani C., Aas K., Bindslev-Jensen C., Bjoerksten B., Wuethrich B., (1995) *Allergy* 50 623.
- Codex Alimentarius Commission, *Food Labelling ^ Complete Texts. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, FAO/WHO, Rome, 1999.*
- Emmett S.E., Angus F.J., Fry J.S., Lee P.N., (1999) *Allergy* 54, 380.
- Freemont S., Kanny G., Bieber S., Nicolas J.P., Moneret-Vautrin D.A., (1996) *Allergy* 51 749.
- Gillespie D.N., Nakajima S., Gleich G.J., (1976) *J. Allergy Clin. Immunol.* 57 302.
- Hansen T.K., Bindslev-Jensen C., (1992) *Allergy* 47, 610.
- Hefe S.L., Bush R.K., Yunginger J.W., Chu F.S., (1994) *J. Food Protect.* 57 419.
- Helbling A., Lopez M., Lehrer S.B., (1992) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 99 452.

- Hengel A.J., Capelletti C., Brohee M. and Anklam E. (2006) Validation of two commercial lateral flow devices for the detection of peanut proteins in cookies: Interlaboratory study. *Journal of AOAC Int.* 89 2, 462 – 468
- Herian A.M., Taylor S.L., Bush R.K.,(1993) *J. Food Sci.* 58 385.
- Hlywka J.J., Hefe S.L., Taylor S.L., (2000) *J. Food Protect.* 63 252.
- Holzhauser A., Vieths S., (1999) *J. Agric. Food Chem.* 47 4209.
- Holzhauser A., Vieths S., (1999) *J. Agric. Food Chem.* 47 603.
- Holzhauser T., Dehne L.I., Hoffmann A., Haustein D., Vieths S., *Lebensm Z.* (1998) *Unters. Forsch. A* 206 1.
- Holzhauser T., Wangorsch A., Vieths S., (2000) *Eur. Food Res. Technol.* 211 360.
- Hourihane J.O'B., Kilburn S.A., Nordlee J.A., Hefe S.L., Taylor S.L., Warner J.O., (1997) *J. Allergy Clin. Immunol.* 100, 596.
- ISO 11843-4: 2003, Capability of detection – Part 4: Methodology of comparing the minimum detectable value with a given value.
- Johns C.O. and Jones D.B. (1916) The proteins of the peanut, *Archis Hypogae*. *The journal of biological chemistry*, 77 – 87.
- Keck-Gassenmeier B., Benet S., Rosa C., Hischenhuber C., (1999) *Food Agric. Immunol.* 11 243.
- Koch P., Schappi G.F., Poms R.E., Anklam E. and Battaglia R. (2003) Comparison of commercially available ELISA kits with human sera-based detection methods for peanut allergens in foods. *Food additives and contaminants* 20 9, 797 – 803.
- Koeppel E., Stadler M., Luethy J., Huebner P., *Lebensm Z.*(1998) *Unters. Forsch. A* 206 399.
- Koivunen M.E. and Krogsrud R.L (2006) Techniques used in clinical laboratories. *Labmeicine* 37, 8, 490 – 497.

Koppelman S.J., Bleeker-Marcelis H., van Duijn G., Hessing M., (1996) *World Ingredients* 12 35.

Koppelman S.J., Knulst A.C., Koers W.J, Penninks A.H., Peppelman H., Vlooswijk R., Pigmans I., van Duijn G., Hessing M.,(1999) *J. Immunol. Methods* 229 107.

Leduc V., Demeulemester C., Polack B., Guizard C., Le Guern L., Peltre G., (1999) *Allergy* 54 464.

Malmheden Yman I., Eriksson A., Everitt G., Yman L., Karlsson T.,(1994) *Food Agric. Immunol.* 6, 167.

Mariager B., Solve M., Eriksen H., Brogen C.H., (1994) *Food Agric. Immunol.* 6 73.

Mata E., Favier C., Moneret-Vautrin D.A., Nicolas J.P., Han-Ching L., Gueant J.L., (1994) *Allergy* 49 442.

Mills C., Potts A., Plumb G.W., Lambert N., Morgan M.R. A,(1997) *Food Agric. Immunol.* 9 37.

Moser M.A., Kniel B., Schmitz-Winnenthal J.,(1999) *Getreide Mehl Brot* 53 6.

Nordlee J.A., Taylor S.L., Jones R.T., Yunginger J.W., (1981) *J. Allergy Clin. Immunol.* 68 376.

Nordlee J.A., Taylor S.L., (1995) *Food Technol.* 49,129.

Norgaard A., Bindslev-Jensen C., (1992) *Allergy* 47, 503.

Oldaeus G., Bjorksten B., Einarsson R., Kjellman N.I.M.,(1991) *Pediatr. Allergy Immunol.* 2 156.

Olszewski A., Pons L., Moutete F., Aimone-Gastin I., Kanny G., Moneret-Vautrin D.A., Gueant J.L.,(1998) *Clin. Exp. Allergy* 28 850.

Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission relating to the evaluation of allergenic foods for labeling purposes (Request No. EFSA – Q – 2003 – 016) (adopted on 19 February 2004)



Performance tested validation report, Biokits peanut assay kit for the estimation of peanut content in foodstuffs by enzyme immunoassay. AOAC-RI, Tepnel Biosystems Feb. 2003, Cat. No. 902048Q.

Poms R.E., Agazzi M.E., Bau A., Brohee M., Capelletti C., Norggaard J.V. and Anklam E. (2005) Inter-Laboratory validation study of five different commercial ELISA test kits for the determination of peanut proteins in bisquits and dark chocolate. *Food additives and contaminants* 22 2, 104 – 112.

Poms R.E., Agazzi M.E., Bau A., Brohee M., Capelletti C., Norggaard J.V. and Anklam E. (2005) Inter-Laboratory validation study of five different commercial ELISA test kits for the determination of peanut residues in cookie and dark chocolate. *Joint research centre, IRMM.*

Poms R.E., Klein C.L. and Anklam E. (2004) Methods for allergen analysis in food: a review. *Food additives and contaminants* 21, 1 – 31.

prEN 15633-1: 2009 “Foodstuffs – Detection of food allergens by immunological methods – Part 1: General considerations

Sampson H.A., (1998) *Allergy* 53 (Suppl. 46) 125.

Sampson H.A., (1999) *Allergy Clin. Immunol.* 103, 717.

Skerrit J.H., Hill A.S.,(1991) *J. AOAC Int.* 74 257.

Stephan O. and Vieths S. (2004) Development of a real-time PCR and a sandwich ELISA for detection of potentially allergenic trace amounts of peanut (*Arachis hypogaea*) in processed foods. *J. Agric. Food Chem* 52, 3754 – 3760.

Taylor S.L., Nordlee J.,(1996) *Food Technol.* 50 231.

Tsuji H., Bando N., Kimoto M., Okada N., Ogawa T., (1993) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 39 389.

Tsuji H., Okada N., Yamanishi R., Bando N., Kimoto M., Ogawa T.,(1995) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59 150.

Van Hengel A.J. (2007) Declaration of allergens on the label of food products purchased on the European market. *Trends in food science & technology* 18, 96-100.

Van Hengel A.J. (2007) Food allergen detection methods and the challenge to protect food – allergic consumers. *Anal. Bioanal. Chem* 389, 111 – 118.

Whitaker T.B., Williams K.M., Trucksess M.W. and Slate A.B. (2005) Immunochemical analytical methods for the determination of peanut proteins in foods. *Journal of AOAC Int.* 88 1, 161 – 174

Wigotzki M., Schubert S., Steinhart H., Paschke A.,(2000) Internet Symposium on Food Allergens 2 1.

Wigotzki M., Steinhart H., Paschke A., (2000) Food Agric. Immunol. 12 217.

Wuëthrich B., (2000) Invest. Allergol. Clin. Immunol. 10 59.

Yeung J.M., Collins P.G.,(1996) AOAC J. Int. 79 1411.

Η πρόσβαση στο δίκαιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης <http://eur-lex.europa.eu> Τελευταία επίσκεψη 29/9/2013