



**NACIONALNI LABORATORIJ ZA
ZDRAVJE, OKOLJE IN HRANO**

Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

ALERGENI V ŽIVILIH

Določanje in pregled stanja v RS

Mojca Žefran, univ.dipl.kem., spec.

Vsebina

- Uvod (alergija vs. preobčutljivost, alergena živila)
- Pregled zakonodaje
- Tehnike določevanja alergenov
- Analitika alergenov na NLZOH
- Pregled stanja živil glede označevanja alergenov v RS
- Zaključek



Kaj je alergija na hrano?

- Fiziološka reakcija na določeno sestavino živila, ko telesni imunski sistem prepozna sicer neškodljivo sestavino živila za škodljivo;
- Protitelesa IgE (imunoglobulin E) reagirajo s sestavino iz hrane, posledično se sproščajo histamini, ki povzročajo izpuščaje, astmo, otekanje, anafilaktični šok, diarejo,... Nekateri alergijski reakcije so zakasnjene in ne vključujejo IgE . IgE protitelesa igrajo običajno vlogo zaščite pred infekcijami.
- Po oceni ima alergije in preobčutljivosti na hrano 4-5 % otrok in 2-3 % odraslih.



Kaj je preobčutljivost na hrano?

- Preobčutljivost na hrano vključuje različne za zdravje škodljive odzive organizma na živila:
 - **alergijske reakcije:**
 - IgE reakcije na različne beljakovine v živilih: mleko, jajca, drevesni oreščki,...;
 - Zakasnjene reakcije (brez IgE): *celiakija* (reakcija na *gluten*);
 - **reakcije, ki so posledica pomanjkanja določenih encimov:**
 - Preobčutljivost na *laktozo* iz mleka: pomanjkanje *laktaze*;
 - **farmakološke reakcije. Povzročitelji so biogeni amini kot sta histamin in tiramin:**
 - *Histamin* se akumulira v različnih živilih kot produkt mikrobioloških procesov kvara;
 - **reakcije na naravne toksične snovi v živilih:**
 - *Proteazni inhibitorji* v stročnicah, *oksalati* v špinaci,...



Alergena živila

- Okoli 90 % vseh alergij oziroma reakcij preobčutljivosti na živila je povzročenih z 8 živili:
 - 1. JAJCA
 - 2. MLEKO
 - 3. PŠENICA
 - 4. SOJA
 - 5. DREVESNI OREŠČKI
 - 6. ARAŠIDI (ZEMELJSKI OREŠČEK, KIKIRIKI)
 - 7. RIBE
 - 8. RAKI
- Alergijsko reakcijo lahko povzročijo že **mg** količine alergene snovi v živilu.



Kako zdraviti alergije?

- Danes še ni zdravila, ki bi preprečevalo vzroke alergij in drugih preobčutljivosti;
- Cilj zdravljenja je izogibati se živilom oziroma njihovim sestavinam, ki povzročajo simptome;
- Tem živilom se lahko izognemo, če so primerno označena in če lahko njihovo označevanje kontroliramo s primernimi metodami detekcije;
- Označevanje živil je v EU in RS zakonsko urejeno.



Zakonska podlaga za označevanje živil glede alergenov – EU/1

- Uredba (ES) št. 178/2002 Evropskega parlamenta in sveta z dne 28. januarja 2002 o določitvi splošnih načel in zahtevah živilske zakonodaje, ustanovitvi Evropske agencije za varnost hrane in postopkih, ki zadevajo varnost hrane
 - Člen 14 (Zahteve glede varnosti živil)
 - točka 3(b)

“Informacije v zvezi s preprečevanjem posebnih neželenih vplivov nekega živila ali skupine živil na zdravje”;
 - točka 4(c)

“Posebna zdravstvena preobčutljivost posebnih skupin potrošnikov, kadar je živilo namenjeno tej skupini”.
 - Člen 16 (predstavitev)

Informacije ne smejo biti zavajajoče



Zakonska podlaga za označevanje živil glede alergenov – RS

- Pravilnik o splošnem označevanju predpakiranih živil (Ur. l. RS št. 50/2004, 58/04, 43/05 in 83/05, 115/05, 118/07), 38 čl. Priloga 4:
 - Določa označevanje alergenih substanc v živilih z naslednjimi sestavinami oz. z njihovimi izdelki:
 - Žita, ki vsebujejo gluten;
 - Raki in ribe;
 - **Jajca in mleko;**
 - **Arašidi** (kikiriki), lupinasto sadje (oreščki);
 - Soja;
 - Listna zelena;
 - Gorčično in **sezamovo seme;**
 - Žveplov dioksid in sulfiti v konc. > 10 mg/kg oz. 10 mg/l kot SO₂;
 - Volčji bob
 - Mehkužci

Zakonska podlaga za označevanje živil glede alergenov – EU/2

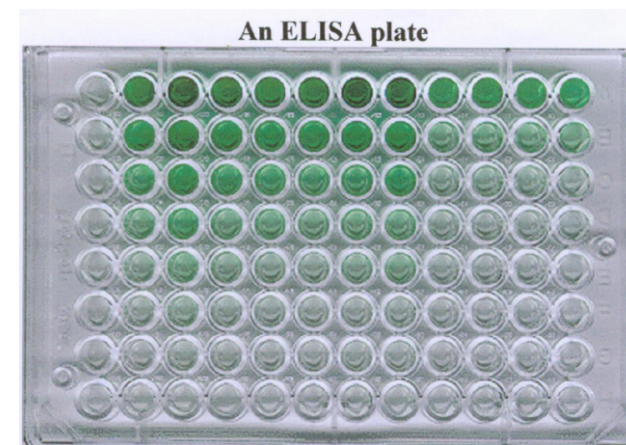
- Uredba (EU) št. 1169 / 2011 o zagotavljanju informacij o živilih potrošnikom, (v uporabi od 14.12.2014)
 - Uporablja se za vsa živila, ki so namenjena končnemu potrošniku (vključno z obrati javne prehrane in ne-predpakiranimi izdelki);
 - Ime snovi ali proizvoda, naveden v Prilogi II, se poudari z vrsto pisave, ki se jasno razlikuje od preostalega seznama snovi (črke, stil, barva ozadja,...)
 - - “Sestavine”: ...**pšenična moka**, voda, ...**sojin lecitin**, **mleko** v prahu...

Zakonska podlaga za označevanje živil glede alergenov – EU/3

- Uredba komisije (ES) št. 41 / 2009 o sestavi in označevanju živil, primernih za ljudi s preobčutljivostjo na gluten
 - Navedeni dve zgornji meji:
 - 20 mg/kg (živila brez glutena)
 - 100 mg/kg (živila z zmanjšano vsebnostjo glutena)
 - Predpisan poseben način označevanja živil “brez glutena”
 - Ureja tudi označevanje in sestavo drugih živil, primernih za ljudi s preobčutljivostjo na gluten.

Metode določanja alergenov/snovi preobčutljivosti v živilih

- **Imunoencimski testi (ELISA):**
 - kvantitativno določanje specifičnih alergenih beljakovin;
- **“Real-time” PCR testi** (polimerazna verižna reakcija)
 - kvalitativno/kvantitativno določanje specifičnih odsekov DNA alergene organizma (npr. rastline);
- **Encimski testi:**
 - Kvantitativno določanje snovi kot so npr. laktoza ali glutaminska kislina z encimsko reakcijo;
- **MS metode:**
 - Kvantitativno določanje alergenih beljakovin z masno spektrometrijo.

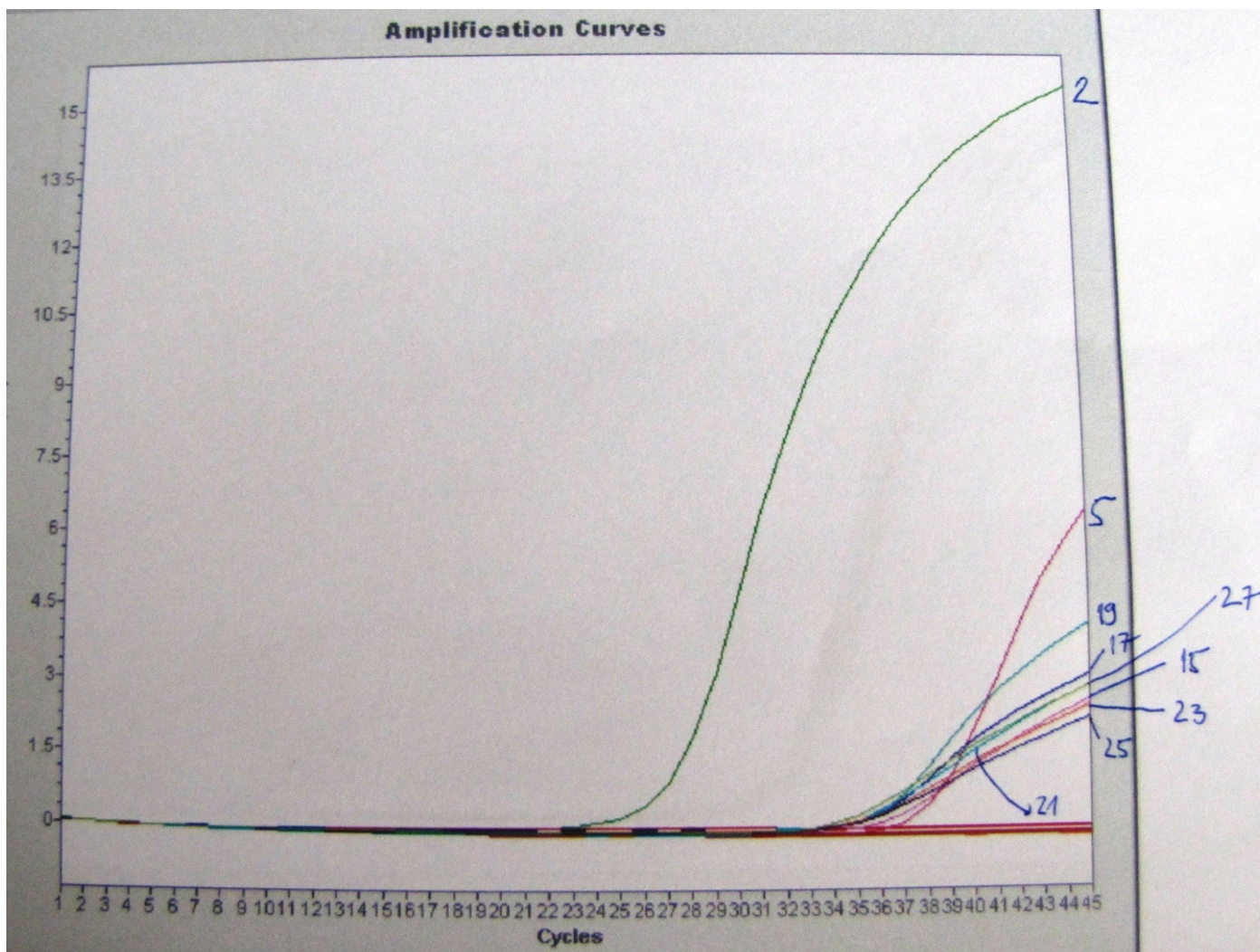


Princip PCR v realnem času

- Pomnoževanje odseka DNA, specifičnega za iskano alergeno živilo.
- Ti kratki segmenti DNA (pomnožki) so “označeni” z molekulami, ki fluorescirajo .
- Med samim procesom pomnoževanja v več ciklih se meri fluorescenca nastalih pomnožkov.
- Nastale pomnožke glede na sočasno uporabljene standarde detektiramo oz. kvantificiramo .



Primer izpisa iz PCR inštrumenta



Princip ELISA

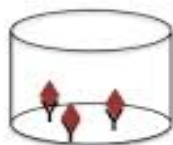
ELISA (Encyme-linked Immunosorbent Assay)

- Biokemijska metoda, imunološka tehnika, pri kateri poteka reakcija med protitelesi in antigeni in vitro.
- V našem primeru predstavlja antigen alergen oz. beljakovino alergene snovi, ki se specifično veže s protitelesi.
- Encim, vezan na kompleks protitelesa in antigena ob dodatku substrata in kromogena razvije barvo.
- Intenziteto barve merimo spektrofotometrično.

Sendvič ELISA

- Na mikrotitrski ploščici so nanešena protitelesa za beljakovine alergena, ki ga določamo.
- Dodamo vzorec, prisotne beljakovine alergena se med inkubacijo vežejo na protitelesa; s spiranjem odstranimo nevezane sestavine vzorca.
- Dodamo protitelesa, specifična na vezane beljakovine alergena, ki so označena z encimom, inkubiramo, odstranimo nevezana protitelesa.
- Dodamo substrat, ki ob prisotnosti encima razvije barvo.
- Detektiramo intenzivnost barve.

1. Add sample to capture Ab-coated plate.



2. Add enzyme-linked detection antibody.



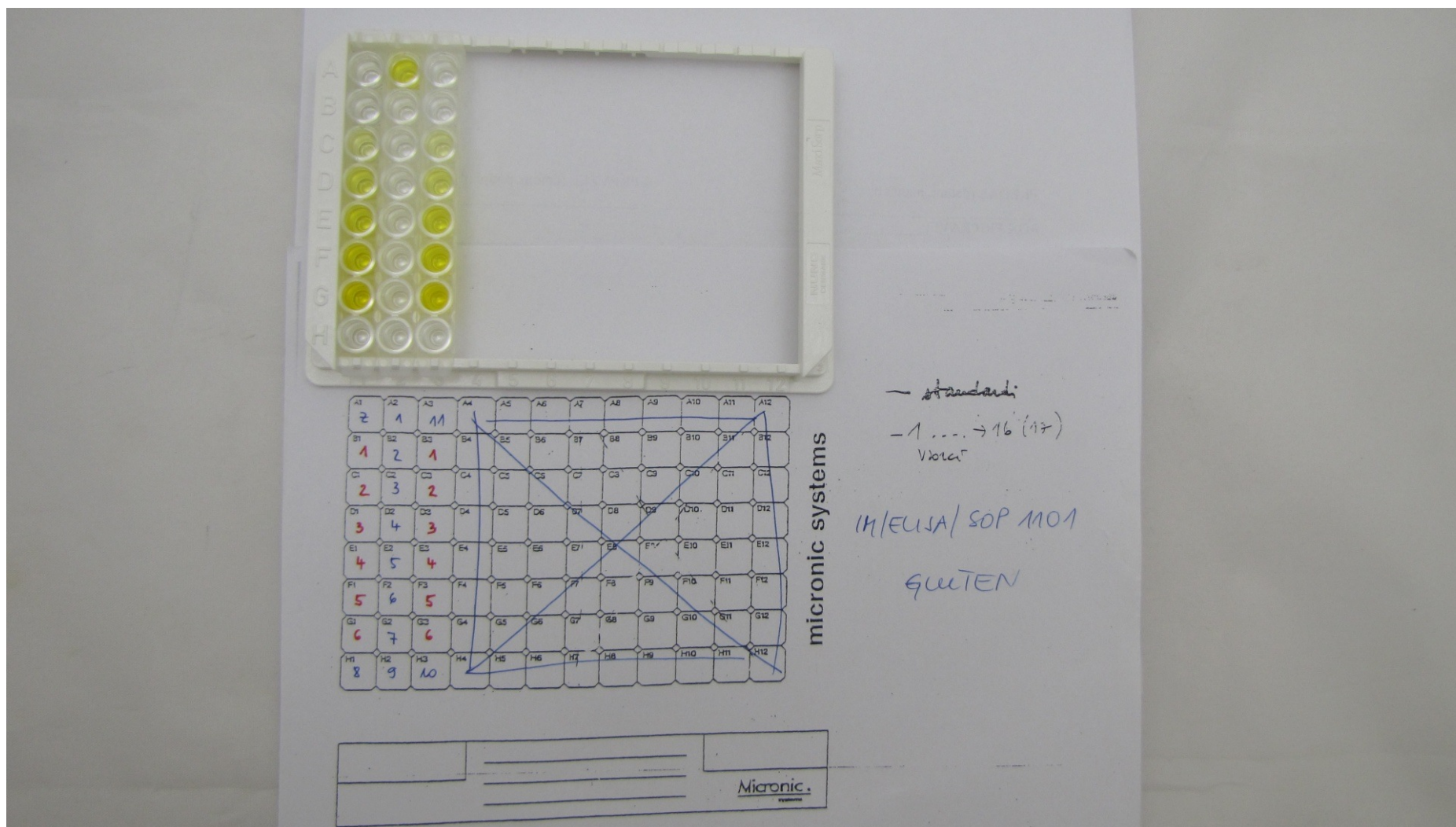
3. Add colorimetric substrate and develop.



4. Read absorbance values and calculate analyte concentration.



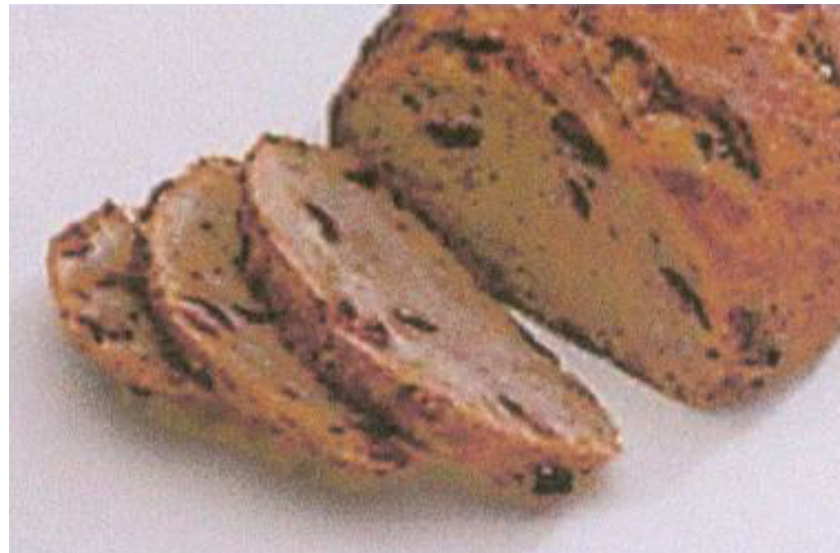
Mikrotitrna ploščica po dodatku "stop" reagenta.



Alergena živila/ alergeni – določanje v laboratoriju NLZOH – enota Maribor

PŠENICA, JEČMEN, RŽ, PIRA, KHORASAN ŽITO, OVES
IN IZDELKI (kuskus, bulgur, slad...)

GLUTEN

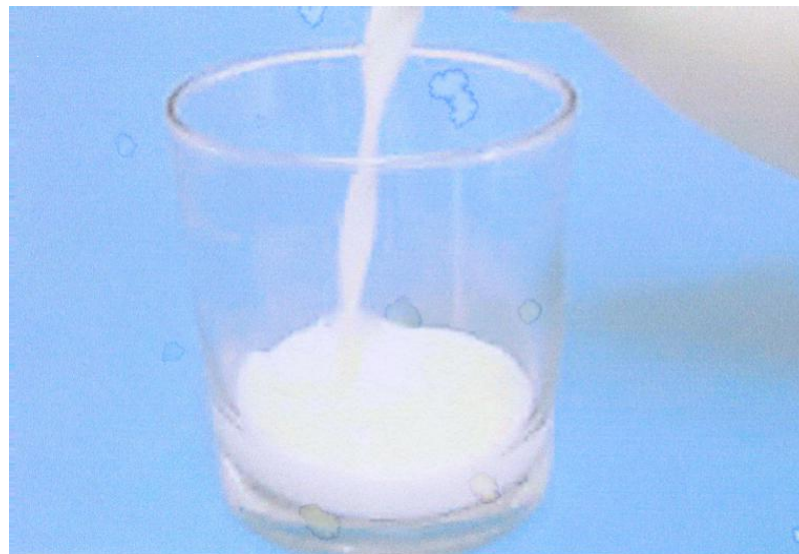


LOQ (ELISA)

5 mg/kg

**Akreditirana
metoda**

Mlečne beljakovine



LOQ
(ELISA)

2,5 mg/kg

**Akreditirana
metoda**

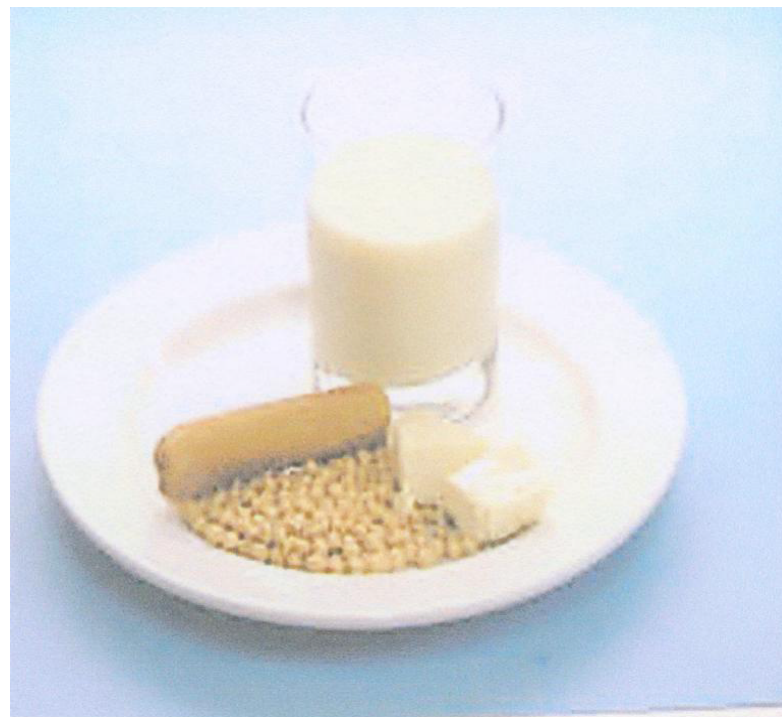
**Beljakovine
jajčnega beljaka**



LOQ (ELISA)

**0,5 mg/kg
(kot jajca v
prahu)**

Sojine beljakovine



LOQ (ELISA)
2,5 mg/kg

Beljakovine arašidov/ arašidi



LOQ (ELISA)
**2,5 mg/kg
arašidov**

**Akreditirana
metoda**

**Beljakovine
lešnikov/ lešniki**



LOQ (ELISA)

**2,5 mg/kg
lešnika**

**Akreditirana
metoda**

**Beljakovine
mandljev/
mandlji**



**LOQ (ELISA)
2,5 mg/kg
mandlja**

**Beljakovine
orehov/ orehi**



**LOD (PCR)
10 mg/kg
orehov**

**Beljakovine
sezama/ sezam**



LOQ (ELISA)

**6,25 mg/kg
sezama**

**Beljakovine
gorčice/ gorčica**



LOQ (ELISA)

**0,5 mg/kg
gorčice**

**Beljakovine
zelene/ zelena**



**LOD (PCR)
10 mg/kg
zelene**



NEFELOMETRIJA

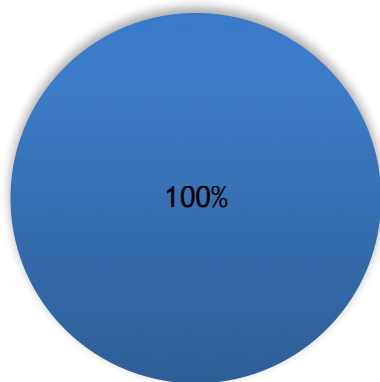
LOQ

4 mg SO₂/kg

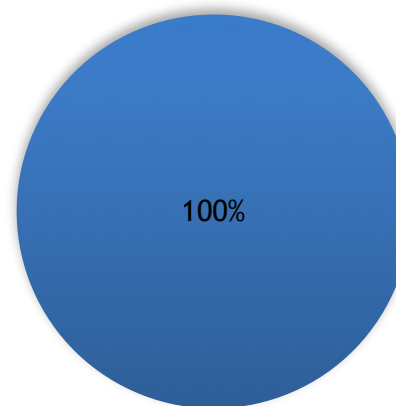
Analitika alergenov - težave

- Navzkrižna kontaminacija z ostalimi alergeni.
- Navzkrižna reaktivnost z drugimi živilskimi sestavinami – selektivnost metode je omejena.
- Analitske metode so del komercialnega analitskega kita – modifikacije metode s strani proizvajalca kita otežujejo delo.
- Validacija in akreditacija metod – težko dostopni (realni) matriksi s primerno vsebnostjo alergena.

Uradni nadzor živil glede vsebnosti alergenov in glutena 2013*



Pregled vzorcev živil , vključenih v uradni nadzor skladnosti označevanja alergenov in glutena glede izvora živil



Pregled vzorcev živil , vključenih v uradni nadzor glede skladnosti označevanja alergenov in glutena

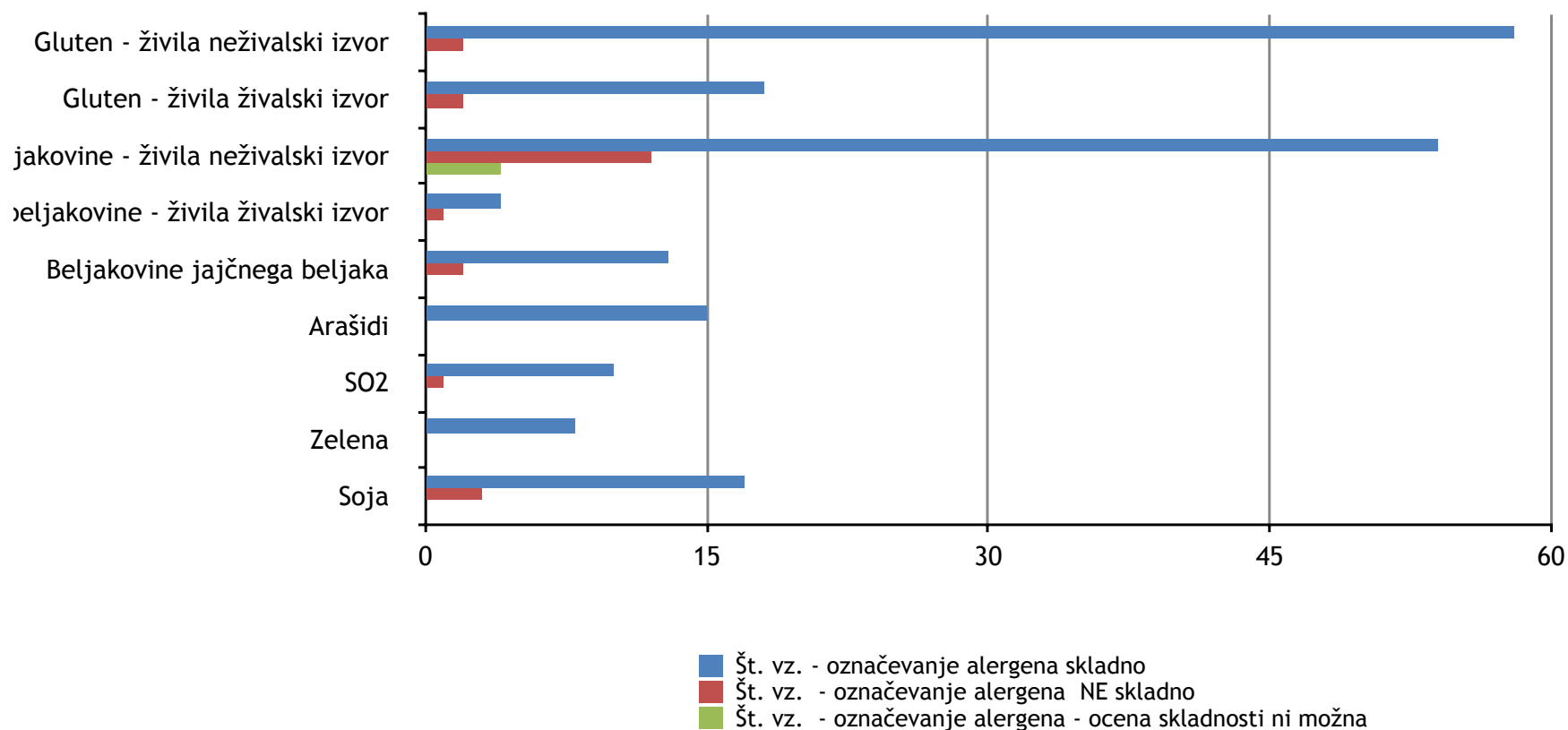
* Naročnik in plačnik analiz je UVHVVR

Uradni nadzor živil glede vsebnosti alergenov in glutena 2013*

SKUPINA ŽIVIL	PREISKOVAN ALERGEN	ŠT. VZORCEV	NESKLADNI VZORCI	OCENA SKLADNOSTI NI MOGOČA	NEVARNI VZORCI	OCENA VARNOSTI NI MOGOČA
Običajna živila z označbo brez glutena (razen otroške hrane, dietetičnih živil...)	Gluten	60	2	/	2	/
Paštete, barjene klobase		20	2	/	2	/
Čokoladni izdelki, peciva, sorbeti	Mlečne beljakovine	70	12	4	12	4
Paštete, barjene klobase		5	1	/	1	/
Testenine, solatni prelivi, majoneze, pekovske mešanice, sladoled, vafliji, mlečne pene za kavo, komercialni nadomestki za jajca	Beljakovine jajčnega beljaka	15	2	/	2	/
Žita za zajtrk, pekovski izdelki, sladoled, čokolada, azijske in afriške jedi, olje, omake za žar, krekerji	Arašidi	15	/	/	/	/
Suho sadje, marmelade (brez deklariranega SO ₂)	SO ₂	11	1	/	1	/
Pripravljene/gotove jedi v pločevinkah, začinjeno mleto meso	Zelena	8	/	/	/	/
Gotove jedi, barjene klobase, poltrajne klobase, zamrznjeni panirani izdelki, suhe mesnine	Soja	20	3	/	/	3
VZORCI SKUPAJ		224	23	4	20	7

Uradni nadzor živil glede vsebnosti alergenov in glutena 2013*

Pregled vzorcev živil, vključenih v uradni nadzor spremljanja označevanja alergenov, glede na SKLADNOST po preiskovanih parametrih



ZAKLJUČKI

- Osnovni namen ugotavljanja alergenih snovi v živilih je **zaščititi osebe, ki trpijo zaradi alergij na živila;**
- Ugotavljanje alergenih snovi v živilih je potrebno zato, da **preverjamo skladnost označevanja** predpakiranih živil s slovensko oziroma evropsko zakonodajo, ki zahtevata striktno označevanje sestavin živil, ki lahko povzročijo alergijo, četudi se le te nahajajo le v sledovih;
- Informacije na označbah o možni prisotnosti snovi ali proizvodov v živilih, ki povzročajo alergije ali preobčutljivost (možnost navzkrižne kontaminacije) morajo biti utemeljene na osnovi **ocene tveganja;**
- Za določevanje alergenov v živilih se pretežno uporabljata tehniki ELISA in PCR – preskusne metode za rutinsko analitiko razvijajo podjetja in so sestavni del komercialnih analitskih kitov.

