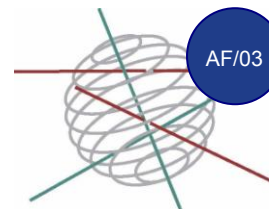


ALLERRISK - Resultaten



Ontwikkeling van een geïntegreerde strategie voor de beheersing van de allergenen-problematiek in de Belgische voedings- en catering industrie

DUUR VAN HET PROJECT
15/12/2006 – 31/01/2011

BUDGET
799.231 €

SLEUTELWOORDEN

Voedselallergie, allergeniciteit, ELISA, PCR, massa spectrometrie, BAT

CONTEXT

Voedselallergieën vormen een belangrijk gezondheidsprobleem en het optreden van allergische reacties is de laatste jaren sterk toegenomen. Tot op heden is de enige effectieve behandeling tegen een voedselallergie de inname van allergenen bevattend voedsel vermijden. De screening van voedingsproducten om mogelijke allergenen te detecteren is een essentieel onderdeel van een sterk preventief beleid.

De voedingsindustrie wordt momenteel geconfronteerd met het probleem van validatie van de productieprocessen om de afwezigheid van kruiscontaminatie te verzekeren in de productielijnen en om een betrouwbare kwaliteitscontrole van de inkomende goederen te garanderen. Omwille van de specifieke karakteristieken en de hoge variabiliteit onder de allergenen, zal de ontwikkeling van functionele methoden, die de meest belangrijke allergenen detecteren, de bevoegde autoriteiten in staat stellen om een nieuw preventief beleid op te stellen om de voedselveiligheid te verbeteren.

DOELSTELLINGEN

Dit project heeft als hoofddoelstelling het evalueren van verschillende methodes voor allergen detectie in voedsel en de ontwikkeling van nieuwe, verbeterde testen.

In deze studie werden de resultaten van de evaluatie van de analytische detectietechnieken gekoppeld aan de impact voor de allergische patiënt. Daarom was het belangrijk dat de bio-analisten die hiervoor aangewend werden ook klinisch relevant waren, d.w.z. dat ze de relevante allergenen in hun allergisch actieve conformatie bevatten. Het vergelijken van verschillende eiwit extractie protocols toonde het belang aan van het gebruik van protease-inhibitoren tijdens de procedure om de native conformatie van de proteïnen te behouden.

De gevoeligheid van de geëvalueerde commerciële ELISA testen bleek beter te zijn dan aangegeven in door de kits. De kits voor hazelnoot detectie konden tot 1 ppm onvette hazelnoot, wat overeenkomt met ongeveer 2.6 ppm hazelnoot, detecteren in de verschillende voedingsmatrices. Met de commerciële real-time PCR testen werd pas een positief resultaat bekomen in alle gesteste replicaten vanaf 100 ppm onvette hazelnoot. De mindere gevoeligheid van de real-time PCR detectie kan te wijten zijn aan de lagere concentratie van DNA in als doelwit analiet, in vergelijking met eiwit dat het doelwit van ELISA is. Dit betekent dus niet dat PCR detectie op zich als techniek minder gevoelig zou zijn. Het DNA extractie protocol dat geselecteerd werd resulteerde in DNA met een goede kwaliteit met betrekking tot zuiverheid en integriteit van het DNA. Echter, vaak heeft een hoge zuiverheidsgraad een negatieve invloed op de DNA opbrengst. Mogelijk kan de gevoeligheid van de PCR testen verbeterd worden door een protocol met een hogere opbrengst te gebruiken of het huidige protocol verder te optimaliseren. De bekomen resultaten bevestigen echter ook dat een betere gevoeligheid in het algemeen gepaard gaat met een verminderde specificiteit, zoals aangetoond met de commerciële ELISA testen voor hazelnoot en soja.

Het induceren van chemische reacties ter simulatie van voedselverwerking leidde tot modificaties op het moleculair niveau van de eiwitten. Het induceren van de Maillard reactie resulteerde in eiwitgebonden carbonyl groepen, een afname in vrije lysine residuen en ernstige aggregaatvorming. Ten gevolge van zowel hypochloriet- als lipidegeïnduceerde oxidatie was er modificatie van essentiële aminozuren en eveneens een toename in eiwitgebonden carbonyl groepen en eiwit aggregatie. Partiële eiwit hydrolyse door middel van pepsine zorgde voor een doorgedreven hydrolyse van de hazelnoot eiwitten, in tegenstelling tot de soja proteïnes die stabiel bleken te zijn.



ALLERRISK - Resultaten

Ontwikkeling van een geïntegreerde strategie voor de beheersing van de allergenenproblematiek in de Belgische voedings- en catering industrie

Dit werd aangetoond door de toenames in vrije amino groepen en de niet-proteïne stikstof fractie. Desondanks bleken bepaalde hazelnoot en soja eiwitten toch stabiel te zijn t.o.v. de modificaties. Peptides afgeleid van Cor a 9 van hazelnoot en van Gly m 5 en Gly m 6 van soja bleken het meest stabiel in vergelijking met andere allergene eiwitten. Deze stabiele peptides zouden kunnen dienen als analytische doelwitten in nieuwe, robuuste analytische tools voor detectie van niet-geëtiketteerde allergenen, vooral in sterk verwerkte levensmiddelen.

Allergen detectie in voedingsstalen met zowel ELISA als real-time PCR bleek onderhevig te zijn aan invloeden van voedselverwerking en de voedingsmatrix. Dit werd eveneens aangetoond door de impact van de chemische modificaties op de detectie van hazelnoot en soja eiwitten met de commerciële ELISA kits. Bovendien bleek de detectie sterk afhankelijk van de gebruikte test. Op basis van de resultaten bekomen in deze studie kan geen uitspraak gedaan worden omtrent welke bio-analyse, eiwit of DNA, het meest robuust is met betrekking tot voedselverwerking (in dit geval bakken). Een semi-quantitatieve vergelijking van beide detectieplatformen toonde aan dat de impact van de verwerking sterk variabel was tussen de verschillende testen van beide technieken onderling.

Een accurate detectie en/of quantificatie van de (gemodificeerde) hazelnoot en soja eiwitten met de commerciële ELISA kits bleek problematisch te zijn. Mogelijks zijn de antilichamen aangewend voor de ontwikkeling van deze kits opgewekt tegen ongemodificeerde/natieve eiwitten en is hun reactiviteit tegenover de gemodificeerde eiwitten verlaagd omwille van een modificatie van de epitopen. Daarom werden in dit project nieuwe ELISA testen ontwikkeld met antilichamen specifiek gericht tegen gemodificeerde eiwitten. Deze ELISA's waren zeer specifiek tegenover de gemodificeerde eiwitten en hadden een lagere specificiteit voor de natieve eiwitten. Bovendien was er geen kruisreactiviteit met andere noten of vruchten.

De robuustheid van de ontwikkelde ELISA's werd geëvalueerd door middel van zelf gebakken koekjes, gedopeerd op verschillende concentratie niveau's. Dopage van koekjes, dus na het bakken, een toepassing die vaak gebruikt wordt om ELISA robuustheid te bepalen, resulteerde in een hoge recovery. Echter, indien gedopeerd werd alvorens te bakken was de recovery veel lager, waarschijnlijk te wijten aan een verlaagde extraheerbaarheid van de eiwitten omwille van het bakken.

Een ELISA ontwikkeld met antilichamen gericht tegen gemodificeerde soja eiwitten werd vergeleken ten opzichte van een ELISA die de Kunitz Trypsin Inhibitor, beschreven als een stabiel soja allergen, detecteert. Hieruit bleek dat het gebruik van antilichamen gericht tegen chemisch gemodificeerde eiwitten, zoals optreedt tijdens voedselverwerking, een efficiëntere manier is om allergenen te detecteren in verwerkte levensmiddelen

Voor de ontwikkeling van een quantitative massa spectrometrie-gebaseerde methode voor allergen detectie in voeding werden specifieke doelwit peptides van majeure hazelnoot en soja allergenen geselecteerd. Voor hazelnoot werd een methode ontwikkeld voor quantificatie en detectie van Cor a 9. Dit eiwit werd semi-quantificeerd in aangekochte en zelf gebakken koekjes. Dit is de eerste massa spectrometrische methode voor de detectie en semi-quantificatie van Cor a 9. Voor soja werden twee calibratie curves opgesteld met koekjes en koekjesdeeg gedopeerd met toenemende concentraties soja eiwit extract waarin de concentratie glycinine werd bepaald. Voor de koekjes werd een detectielimiet van 50 ppm soja eiwit extract bepaald. Met deze methode werd met succes toegepast voor de detectie van soja in koekjes en een room dessert.

BESLUITEN

Een van de belangrijkste resultaten van dit onderzoek is dat basofielen van patiënten met een ernstige hazelnoot allergie aangewend kunnen worden om functionele, actieve hazelnoot allergenen aan te tonen in verschillende voedingsmatrices. Hoewel deze techniek niet toepasbaar is als routine analyse, kan hij wel erg waardevol zijn om klinisch relevante sporen van allergenen in voeding te bepalen, wat niet mogelijk is met de klassieke technieken zoals ELISA en PCR.

Momenteel kunnen de huidig beschikbare routine testen niet gebruikt worden om de residuele allergeniciteit van levensmiddelen te bepalen. Routine testen kunnen enkel informatie geven over de aanwezigheid van het allergene ingrediënt of specifieke allergene eiwitten. Zoals reeds vermeld kan de allergeniciteit enkel bepaald worden met functionele testen die gebruik maken van vers bloed van allergische patiënten, waardoor de BAT niet geschikt is als routine test. Niettemin heeft de BAT wel een veel betere gevoeligheid in vergelijking met de andere geëvalueerde methoden.



ALLERRISK - Resultaten

Ontwikkeling van een geïntegreerde strategie voor de beheersing van de allergenen-problematiek in de Belgische voedings- en catering industrie

In deze studie werd duidelijk gemaakt dat zowel ELISA als PCR evenwaardig zijn voor allergen detectie in voedsel, aangezien ze beiden enkel informatie verschaffen over de aanwezigheid van het allergene ingrediënt. Zelfs als een ELISA specifiek de allergene eiwitten als doelwit heeft blijft het een zuivere detectie techniek die niets zegt over de allergeniciteit van de betreffende eiwitten. Evaluatie van de commerciële kits voor hazelnoot en soja detectie toonde aan dat de accuraatheid van de detectie en/of quantificatie ontwricht werd door voedselverwerking en storing van de voedselmatrix. Een risico-analyse met betrekking tot de invloed van voedselverwerking op de detectie van allergenen met routine/commerciële testen wordt gecompliceerd door het feit dat de impact op de detectie afhankelijk is van de gebruikte test en de impact op de allergeniciteit varieert tussen individuen onderling. Met betrekking tot studies waarin de invloed van voedselverwerking wordt onderzocht blijft extraheerbaarheid van de bio-analyt uit de matrix problematisch en dit voor de verschillende detectieplatformen (ELISA, PCR, MS, BAT). In deze context zijn de MS-gebaseerde methoden veelbelovend, aangezien ruwere extractiemethoden aangewend kunnen worden, daar deze techniek geen intacte eiwitten, maar peptiden analyseert.

Dit onderzoek heeft aangetoond dat een meer doorgedreven evaluatie van de analytische testen voor allergen detectie, zoals in deze studie werd uitgevoerd, noodzakelijk is. Deze informatie moet de verschillende betrokken actoren in staat stellen om een weloverwogen keuze te maken omtrent de meest geschikte test voor de gewenste toepassing.

SSD WETENSCHAP VOOR EEN DUURZAME ONTWIKKELING

CONTACT INFORMATIE

Coördinatoren

Marc De Loose & Els Daeseleire

Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek (ILVO)
Technology and Food Unit (T&V)
Brusselsesteenweg 370, 9090 Melle
Tel: +32 (0)9 272 28 42 (Marc De Loose)
Tel: +32 (0)9 272 30 32 (Els Daeseleire)
Tel: +32 (0)9 272 30 11 (Wim Reybroeck)
Fax: +32 (0)9 272 30 01
marc.deloose@ilvo.vlaanderen.be
els.daeseleire@ilvo.vlaanderen.be
wim.reybroeck@ilvo.vlaanderen.be
<http://www.ilvo.vlaanderen.be/TenV/>

Promotoren

Bruno De Meulenaer

Universiteit Gent (UGent)
Research Group Food Chemistry and Human Nutrition
Coupure Links 653, B-9000 Gent
Tel: +32 (0)9 264 61 66
Fax: +32 (0)9 264 62 15
bruno.demeulenaer@ugent.be
<http://www.foodscience.ugent.be/>

Bart Devreese

Universiteit Gent (UGent)
Laboratory for Protein Biochemistry and Protein Engineering
K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent
Tel: +32 (0)9 264 52 73
Fax: +32 (0)9 264 53 38
bart.devreese@ugent.be
<http://www.eiwitbiochemie.ugent.be/>

Edwin De Pauw & Guy Maghuin-Rogister

Université de Liège (ULg)
Centre for Analysis of Residues in Traces
Institut de Chimie, Bat. B6c, B-4000 Liège
Tel: +32 (0)4 366 34 14 (Edwin De Pauw)
Tel: +32 (0)4 366 40 40 (Guy Maghuin-Rogister)
Fax: +32 (0)4 366 34 13 (Edwin De Pauw)
Fax: +32 (0)4 366 40 44 (Guy Maghuin-Rogister)
e.depauw@ulg.ac.be;
g.maghuin@ulg.ac.be
<http://www.mslab.ulg.ac.be/cart/>

Wim Stevens & Didier Ebo

Universiteit Antwerpen
Department for Immunology, Allergology and Rheumatology
Campus Drie Eiken
Universiteitsplein 1, B-2610 Antwerpen
Tel: +32 (0)3 820 25 94 (Wim Stevens)
Tel: +32 (0)3 820 25 95 (Didier Ebo)
Fax: +32 (0)3 820 26 55
wim.stevens@ua.ac.be
didier.ebo@ua.ac.be
<http://www.ua.ac.be>



Federaal Wetenschapsbeleid

Louizalaan 231 • B-1050 Brussels

Tél. +32 (0)2 238 34 11 • Fax +32 (0)2 230 59 12 • www.belspo.be/ssd

Contact. Christine Mathieu



AGROVOEDING