



ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία  
Μέθοδοι Προσδιορισμού Αλλεργιογόνων σε Γαλακτοκομικά

Κονιδάρη Νεκταρία-Ιωάννα  
Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Λαμπροπούλου Δημητρούλα

Πάτρα, Μάρτιος 2025

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.



ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Κονιδάρη Νεκταρία-Ιωάννα

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Λαμπροπούλου Δημητρούλα  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αριστοτέλειο  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Ευάγγελος Μπακέας Καθηγητής ΕΚΠΑ

Πάτρα, Μάρτιος 2025

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κυρία Λαμπροπούλου Δημητρούλα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας, καθώς και για την στήριξη που μου παρείχε από την πρώτη στιγμή. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, για την πολύτιμη στήριξη τους, σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

## Περίληψη

Η παρούσα εργασία παρουσιάζει μια σύνοψη των σύγχρονων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό αλλεργιογόνων ουσιών στα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως αυτές αποτυπώνονται στα δεδομένα της πρόσφατης βιβλιογραφίας. Εξετάζονται διεξοδικά οι κύριες μεθοδολογικές προσεγγίσεις, συμπεριλαμβανομένων των ανοσοχημικών μεθόδων (ELISA), των βιοαισθητήρων, της φασματομετρίας μάζας και των τεχνικών που βασίζονται στο DNA. Η συγκριτική αξιολόγηση των μεθόδων καταδεικνύει ότι οι ανοσοχημικές τεχνικές ELISA, παρά τους περιορισμούς τους στην ανίχνευση θερμικά επεξεργασμένων πρωτεϊνών, παραμένουν χρήσιμες για τον έλεγχο ρουτίνας, επιτυγχάνοντας όρια ανίχνευσης στην περιοχή 10-200 µg/L. Οι απταμερικοί βιοαισθητήρες επιδεικνύουν εξαιρετική ευαισθησία στην κλίμακα pg/mL, ενώ οι τεχνικές LC-MS/MS προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα στην ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών αλλεργιογόνων σε σύνθετες μήτρες τροφίμων. Οι μέθοδοι που βασίζονται στο DNA, όπως η PCR πραγματικού χρόνου, παρουσιάζουν υψηλή ανθεκτικότητα στη θερμική επεξεργασία, επιτυγχάνοντας όρια ανίχνευσης έως 0,05 ng βόειου DNA. Η ανασκόπηση υποδεικνύει ότι η επιλογή της βέλτιστης μεθόδου εξαρτάται από τις ειδικές απαιτήσεις της εκάστοτε εφαρμογής, λαμβάνοντας υπόψη παραμέτρους όπως η πολυπλοκότητα της μήτρας, ο βαθμός επεξεργασίας του τροφίμου και οι απαιτούμενοι χρόνοι ανάλυσης. Η μελλοντική κατεύθυνση στην ανάλυση αλλεργιογόνων προτείνεται να επικεντρωθεί στην ανάπτυξη ολοκληρωμένων πλατφορμών που συνδυάζουν πολλαπλές τεχνικές ανίχνευσης για βελτιστοποιημένη αναλυτική απόδοση.

**Λέξεις – Κλειδιά:** Αλλεργιογόνα γαλακτοκομικών, ανοσοχημικές μέθοδοι, βιοαισθητήρες, φασματομετρία μάζας, ανάλυση DNA

## Abstract

This paper presents a summary of current analytical methods for the determination of allergens in dairy products, as reflected in the recent literature. The main methodological approaches, including immunochemical methods (ELISAs), biosensors, mass spectrometry and DNA-based techniques are reviewed in detail. A comparative evaluation of the methods demonstrates that immunochemical ELISA techniques, despite their limitations in the detection of heat-treated proteins, remain useful for routine testing, achieving detection limits in the range 10-200 µg/L. Hapatometric biosensors demonstrate excellent sensitivity in the pg/mL range, while LC-MS/MS techniques offer significant advantages in the simultaneous detection of multiple allergens in complex food matrices. DNA-based methods, such as real-time PCR, show high resistance to heat treatment, achieving detection limits down to 0.05 ng of bovine DNA. The review suggests that the choice of the optimal method depends on the specific requirements of the application, taking into account parameters such as the complexity of the matrix, the degree of food processing and the required analysis times. Future direction in allergen analysis is proposed to focus on the development of integrated platforms that combine multiple detection techniques for optimised analytical performance.

**Keywords:** Dairy allergens, immunochemical methods, biosensors, mass spectrometry, DNA analysis

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	v
Abstract .....	vi
Περιεχόμενα .....	vii
Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων .....	viii
Κατάλογος Πινάκων .....	ix
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια .....	x
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 . ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 . ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ – ΣΥΣΤΑΣΗ .....	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΑ .....	8
3.1 Αλλεργική ευαισθητοποίηση και δευτερογενείς ανοσολογικές αποκρίσεις .....	11
3.2 Παθογένεση και συμπτώματα των τροφικών αλλεργιών .....	14
3.3 Παθοφυσιολογία και Διάγνωση διατροφικών αλλεργιών .....	16
3.4 Πρόληψη και θεραπεία εξεδικευμένη στα αλλεργιογόνα των τροφίμων .....	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΟΙ ΟΠΟΙΕΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΩΝ ΣΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ .....	21
4.1 Βιοαισθητήρες .....	21
4.2 ELISA .....	24
4.3 Συσκευές πλευρικής ροής (LFD) .....	25
4.4 Υγρή Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (LC-MS) .....	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΛΛΕΡΓΙΑ ΣΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ: ΕΠΠΟΛΑΣΜΟΣ, ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ .....	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΩΝ ΣΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ .....	30
6.1. Ανοσολογικές Δοκιμές - ELISA .....	32
6.2 Συσκευές πλευρικής ροής – LFD και βιοαισθητήρες .....	38
6.3 Βιοαισθητήρες απταμερών .....	47
6.4 Μέθοδοι που βασίζονται στη Φασματομετρία Μάζας και υγρή χρωματογραφία ...	55
6.5 Μέθοδοι που βασίζονται στο DNA .....	68
Κεφάλαιο 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	78
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	79

## Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων

- Εικόνα 1 Ταξινόμηση της τροφικής δυσανεξίας. Οι ανεπιθύμητες αντιδράσεις στα τρόφιμα μπορούν να ταξινομηθούν ως τοξικές ή μη τοξικές αντιδράσεις. Οι μη τοξικές αντιδράσεις κατηγοριοποιούνται περαιτέρω ως ανοσομεσολαβούμενες ή μη ανοσομεσολαβούμενες. Οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες βασίζονται σε μη ανοσομεσολαβούμενους μηχανισμούς, όπως ελαττώματα ενζύμων όπως παρατηρούνται στη δυσανεξία στη λακτόζη. Οι υπερευαίσθησιες που αφορούν το προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα μπορούν να υποδιαιρεθούν σε 4 κατηγορίες (τύποι I-IV). Οι αντιδράσεις τύπου I συνδέονται πάντα με το σχηματισμό IgE έναντι αλλεργιογόνων τροφίμων και επομένως μπορούν να ονομαστούν τροφικές αλλεργίες που σχετίζονται με την IgE. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για συμμετοχή της IgG σε αντιδράσεις τύπου II ή τύπου III σε ανοσομεσολαβούμενες ανεπιθύμητες αντιδράσεις στα τρόφιμα, ενώ οι αντιδράσεις τύπου IV, οι οποίες περιλαμβάνουν T κύτταρα, έχουν σημαντικό ρόλο σε διαταραχές όπως η κοιλιοκάκη. Υπάρχουν ενδείξεις ότι το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα, το οποίο περιλαμβάνει συμπλήρωμα, υποδοχείς τύπου Toll και έμφυτα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, μεσολαβεί επίσης ανοσολογικές αντιδράσεις έναντι ορισμένων συστατικών τροφίμων. .... 9
- Εικόνα 2. (Α) Η επαφή με το αλλεργιογόνο μέσω του γαστρεντερικού συστήματος, της αναπνευστικής οδού και ενδεχομένως μέσω του δέρματος επάγει την παραγωγή IgE (πρωτογενής ευαισθητοποίηση) σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα. (Β) Η ισορροπία μεταξύ της ειδικής για το αλλεργιογόνο IgE και της ανασταλτικής IgG καθορίζει εάν ένας ασθενής θα αναπτύξει συμπτώματα. (C) Τα αλλεργικά συμπτώματα προκαλούνται από επαναλαμβανόμενη επαφή με το στοματικό αλλεργιογόνο, μέσω της άμεσης αλλεργικής αντίδρασης (διασταυρούμενη σύνδεση της συνδεδεμένης με μαστοκύτταρα IgE από το αλλεργιογόνο και στη συνέχεια ενεργοποίηση των ειδικών για το αλλεργιογόνο T-κυττάρων), και έπειτα από άλλα φλεγμονώδη κύτταρα, όπως ηωσινόφιλα και βασεόφιλα, κατά την όψιμη φάση και τη χρόνια φλεγμονή. .... 12
- Εικόνα 3 Διάγνωση τροφικής αλλεργίας. Διαφορετικές πηγές αλλεργιογόνων τροφίμων περιέχουν διάφορα αλλεργιογόνα μόρια (συστατικά). Αυτά μπορούν να παραχθούν ως ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ή να καθαριστούν από φυσικές πηγές. Αυτά τα αλλεργιογόνα μπορούν να ταξινομηθούν σε IgE-αντιδραστικά συστατικά (πράσινο), τα οποία είναι φτωχοί ενεργοποιητές φλεγμονωδών κυττάρων και επομένως προκαλούν ελάχιστες ή καθόλου κλινικές αντιδράσεις, συστατικά που προκαλούν ήπια ή κυρίως τοπικά συμπτώματα (κίτρινο), και συστατικά που συχνά σχετίζονται με σοβαρές και συστηματικές αλλεργικές αντιδράσεις (κόκκινο). Η τεχνολογία μικροσυστοιχιών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των προφίλ αντιδραστικότητας των ασθενών. Αυτή η διαδικασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό μεμονωμένων αλλεργιογόνων που προκαλούν ασθένειες και τρόφιμα στα οποία οι ασθενείς είναι πιο πιθανό να ανταποκριθούν. Οι διαγνωστικές μέθοδοι μπορεί επίσης να προβλέψουν τη σοβαρότητα των αντιδράσεων. .... 17
- Εικόνα 4 Οι πιο συνηθισμένοι ανοσοαισθητήρες για την ανίχνευση αλλεργιογόνων γάλακτος. (α) Μαγνητικός ανοσοαισθητήρας σάντουιτς β-LG (ανατυπώθηκε με άδεια από την αναφορά) και (β) σχηματική διάταξη οπτικής πολωσιμετρικής πλατφόρμας για τη μέτρηση της επιβράδυνσης φάσης εντός των μικροπορωδών μεμβρανών αλουμίνιας που



φέρουν ανοσοδοκιμασία για ανίχνευση β-LG (ανατυπώθηκε με άδεια από την αναφορά).....	23
Εικόνα 5 Καμπύλες δόσης-απόκρισης για τη μελαμίνη από τον βιοαισθητήρα με βάση το απταμερές στον αισθητήρα EWF. α) Εξίσωση κορεσμού προσαρμοσμένη για συγκεντρώσεις μελαμίνης στην περιοχή 0-200 μΜ. β) Καμπύλη βαθμονόμησης για συγκεντρώσεις μελαμίνης στην περιοχή 0,1-20 μΜ. Η ένταση φθορισμού καταγράφεται ως η ηλεκτρική τάση του αισθητήρα EWF. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση των διπλότυπων αναλύσεων.....	53
Εικόνα 6 Α) ηλεκτροφερογραφήματα ιόντων εκχύλισης (EIE) για την ανάλυση CE-MS πρότυπου διαλύματος 50 μL-1 β-LG· Β) EIE για την ανάλυση AA-SPE-CE-MS πρότυπου διαλύματος 1 μL-1 β-LG· γ) φάσμα μάζας (κατά CE-MS) στο χρονικό παράθυρο της κορυφής β-LG (περίπου 3 λεπτά)· και δ) αποσπειροειδές φάσμα μάζας (κατά CE-MS). ( $E_r$ (ppm) = $\kappa \cdot \frac{\text{πειραματικό} - M_{r\text{theoretical}}}{M_{r\text{theoretical}}} \times 106$ ).....	64
Εικόνα 7 Καμπύλες ενίσχυσης (Α, C) και αντίστοιχες καμπύλες βαθμονόμησης (Β, D) που λαμβάνονται με PCR σε πραγματικό χρόνο στοχεύοντας το μιτοχονδριακό γονίδιο 12S rRNA βοοειδών χρησιμοποιώντας τα δυαδικά μείγματα συμπυκνώματος πρωτεΐνης αγελαδινού γάλακτος (MPC) σε ωμό κρέας γαλοπούλας (Α, Β) και σε μαγειρεμένα χοιρομέρια (C, D) (10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,005% (w/ w)) (n = 4).....	70

## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1 Ποσοτική και ποιοτική σύσταση των πρωτεϊνών του γάλακτος.....	5
Πίνακας 2. Οικογένειες αλλεργιογόνων που συναντώνται στα γαλακτοκομικά προϊόντα	18
Πίνακας 3 Συγκριτικός Πίνακας Μελετών ELISA για την ανίχνευση αλλεργιογόνων .....	36
Πίνακας 4 Συγκεντρωτικός Πίνακας χαρακτηριστικών των μελετών που χρησιμοποιούν αισθητήρες και LFD για την ανίχνευση αλλεργιογόνων στα γαλακτοκομικά προϊόντα. ..	46
Πίνακας 5 Αλληλουχίες απταμερών με συνάφεια πρόσφησης στα αλλεργιογόνα των γαλακτομικών.....	48
Πίνακας 6 Συγκεντρωτικός Πίνακας χαρακτηριστικών των μελετών που χρησιμοποιούν βιοαισθητήρες απταμερών για την ανίχνευση αλλεργιογόνων στα γαλακτοκομικά προϊόντα.....	51
Πίνακας 7 Συγκεντρωτικός Πίνακας χαρακτηριστικών των μελετών που χρησιμοποιούν Φασματομετρία μάζας και υγρή χρωματογραφία για την ανίχνευση αλλεργιογόνων στα γαλακτοκομικά προϊόντα. ....	66
Πίνακας 8 Συγκεντρωτικός πίνακας χαρακτηριστικών μελετών οι οποίες χρησιμοποιούν μεθόδους που βασίζονται στο DNA για την ανίχνευση αλλεργιογόνων γαλακτοκομικών...	73

## Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

Συντομογραφία	Πλήρης Ονομασία (Αγγλικά)	Επεξήγηση (Ελληνικά)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	Ενζυμο-συνδεδεμένη ανοσοπροσροφητική δοκιμασία
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry	Υγρή χρωματογραφία-διαδοχική φασματομετρία μάζας
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
SPR	Surface Plasmon Resonance	Συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων
IgE	Immunoglobulin E	Ανοσοσφαιρίνη E
LOD	Limit of Detection	Όριο ανίχνευσης
LOQ	Limit of Quantification	Όριο ποσοτικοποίησης
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
OIT	Oral Immunotherapy	Ανοσοθεραπεία από του στόματος
LFD	Lateral Flow Device	Συσκευή πλευρικής ροής
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography	Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης
MGB	Minor Groove Binder	Προσδέτης μικρής αύλακας
β-LG	β-Lactoglobulin	β-Λακτογλοβουλίνη
α-LA	α-Lactalbumin	α-Λακταλβουμίνη
HRM	High Resolution Melting	Ανάλυση τήξης υψηλής ευκρίνειας
MS	Mass Spectrometry	Φασματομετρία μάζας
BSA	Bovine Serum Albumin	Αλβουμίνη ορού βοοειδών
CV	Coefficient of Variation	Συντελεστής διακύμανσης
RSD	Relative Standard Deviation	Σχετική τυπική απόκλιση
MBs	Magnetic Beads	Μαγνητικά σφαιρίδια

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 .ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γάλα και τα προϊόντα που εξάγονται από το γάλα μετά από επεξεργασία (γαλακτοκομικά προϊόντα) από εξημερωμένα θηλαστικά αποτελεί αναπόσπαστο στοιχείο της ανθρώπινης διατροφής, με την παγκόσμια παραγωγή να παρουσιάζει αξιοσημείωτη αύξηση τις τελευταίες δεκαετίες. Τα κύρια είδη που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γάλακτος περιλαμβάνουν βοοειδή, βουβάλους, πρόβατα, αίγες και καμήλες. Αναλυτικότερα, τα στοιχεία του FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) αναφέρουν ότι το 82,4% της παγκόσμιας παραγωγής νωπού γάλακτος προέρχεται από αγελάδες, το 13,6% από βουβάλους, ενώ το υπόλοιπο 4,0% παράγεται από αίγες, πρόβατα και καμήλες (FAO, 2019). Η παγκόσμια παραγωγή γάλακτος έχει σημειώσει εντυπωσιακή αύξηση άνω του 63% κατά την περίοδο 1983-2016, από 500 εκατομμύρια τόνους σε 819,3 εκατομμύρια τόνους (FAO 2019). Η Ασία κατέχει ηγετική θέση στην παγκόσμια παραγωγή με ποσοστό 41%, με την Ινδία να αναδεικνύεται ως ο κορυφαίος παραγωγός (19,6%). Οι αμερικανική και ευρωπαϊκή ήπειρος συνεισφέρουν περίπου το 50% της παγκόσμιας παραγωγής, με τις Ηνωμένες Πολιτείες (11,8%) και τη Γερμανία (4,1%) να κατέχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στις αντίστοιχες ηπείρους (FAO, 2019).

Αναφορικά με την κατά κεφαλήν κατανάλωση, παρατηρούνται σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ ανεπτυγμένων και αναπτυσσόμενων χωρών. Σύμφωνα με τα στοιχεία του FAOSTAT, στις ανεπτυγμένες χώρες όπως οι ΗΠΑ, η Φινλανδία, η Ολλανδία, το Ηνωμένο Βασίλειο και η Σουηδία, η κατανάλωση υπερβαίνει τα 150 κιλά ανά κάτοικο ετησίως. Αντιθέτως, σε αναπτυσσόμενες χώρες όπως η Αγκόλα, η Αϊτή, η Γουινέα, η Μοζαμβίκη, το Μαλάουι και η Λιβερία, η κατανάλωση υπολείπεται των 30 κιλών ανά κάτοικο ετησίως (FAO, 2019).

Παρά την αδιαμφισβήτητη διατροφική αξία του γάλακτος, ιδιαίτερα ως πηγή βιταμινών και μεταλλικών στοιχείων απαραίτητων για την ανάπτυξη των παιδιών (Do, 2016), αξίζει να επισημανθεί ότι αποτελεί μία από τις συχνότερες αιτίες τροφικής αλλεργίας, ειδικά στην αναπτύξιακή περίοδο της πρώιμης παιδικής ηλικίας (Hochwallner, 2014). Η αλλεργία στο γάλα, η οποία συνήθως διαμεσολαβείται από την ανοσοσφαιρίνη E (IgE), αποτελεί μέρος του 90% των καταγεγραμμένων τροφικών αλλεργιών παγκοσμίως

(CODEX STAN 1-1985). Αυτός είναι και ο λόγος που απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή από τη βιομηχανία τροφίμων, καθώς οι πρωτεΐνες γάλακτος χρησιμοποιούνται ευρέως ως τεχνολογικά βοηθήματα σε πολυάριθμα τρόφιμα, ενώ το φαινόμενο της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας μεταξύ των πρωτεϊνών γάλακτος διαφορετικών μηρυκαστικών επιτείνει την πολυπλοκότητα του ζητήματος (Do, 2016).

Η διαφοροποίηση μεταξύ αλλεργίας και δυσανεξίας στο γάλα αποτελεί κρίσιμο ζήτημα στην κλινική πράξη. Η δυσανεξία, αν και συχνότερη, συνιστά μη ανοσολογική αντίδραση σε συγκεκριμένα συστατικά του γάλακτος, προκαλώντας διαταραχές στην πέψη, απορρόφηση ή μεταβολισμό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η δυσαπορρόφηση λακτόζης λόγω ανεπάρκειας εντερικής λακτάσης, κατατασσόμενη στις μεταβολικές διαταραχές. Στην περίπτωση της γνήσιας αλλεργίας στο γάλα, τα τυπικά συμπτώματα που σχετίζονται με την IgE εμφανίζονται άμεσα ή εντός δύο ωρών μετά την κατανάλωση. Οι κλινικές εκδηλώσεις δύνανται να επηρεάσουν το δέρμα (ατοπική δερματίτιδα, αγγειοοίδημα, κνίδωση), το αναπνευστικό σύστημα (ρινίτιδα, επιδείνωση άσθματος, συριγμός) και το γαστρεντερικό σύστημα (έμετος, διάρροια, κοιλιακό άλγος) (El-Agamy, 2007). Επίσης, σε σχετική μελέτη, επισημαίνεται ότι σε ορισμένες περιπτώσεις, η αλλεργική αντίδραση δύναται να εξελιχθεί σε συστηματική αναφυλακτική απόκριση, ενώ σε ακραίες περιπτώσεις η αντίδραση αυτή μπορεί να θέσει σε κίνδυνο ακόμη και τη ζωή του ατόμου. Οι καθυστερημένες ανοσολογικές εκδηλώσεις, οι οποίες δεν είναι διαμεσολαβούμενες από IgE, ενδέχεται να εμφανιστούν μετά από δύο ώρες, περιλαμβάνοντας ήπια πρωκτική αιμορραγία ή σοβαρά επεισόδια έμετου (Martorell-Aragones, 2015).

Η νομοθετική ρύθμιση της επισήμανσης τροφίμων αποτελεί θεμελιώδη προσέγγιση για την προστασία των ευαίσθητοποιημένων ατόμων και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η Επιτροπή του Codex Alimentarius εξέδωσε το 1985 σύσταση για την υποχρεωτική επισήμανση δυνητικά αλλεργιογόνων συστατικών (CODEX STAN 1-1985). Η Ευρωπαϊκή Ένωση, μέσω της Οδηγίας 2003/89/ΕΚ και του Κανονισμού (ΕΕ) 1169/2011, έχει διευρύνει τον κατάλογο σε 14 ομάδες προϊόντων. Από την άλλη πλευρά, υπογραμμίζεται ότι η πλήρης αποφυγή κατανάλωσης γάλακτος δύναται να προκαλέσει διατροφική ανεπάρκεια, επηρεάζοντας την ανάπτυξη βρεφών και παιδιών. Συνεπώς, η

έρευνα εστιάζει στην ανάπτυξη νέων στρατηγικών επεξεργασίας γάλακτος με στόχο την τροποποίηση ή καταστροφή της δομής των αλλεργιογόνων, μειώνοντας ή εξαλείφοντας την αλλεργιογονικότητά τους (Taylor, 2015).

Αυτός είναι και ο λόγος που έχει ιδιαίτερη πρακτική σημασία η ακριβής, αποτελεσματική και αποδοτική σε σχέση με το κόστος ανίχνευση των αλλεργιογόνων σε αυτή την τόσο σημαντική για το γενικό πληθυσμό ομάδα τροφίμων. Είναι γεγονός ότι στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν ανασκοπήσεις που να εξετάζουν τα πιο πρόσφατα δεδομένα της επιστημονικής βιβλιογραφίας σχετικά με την ανίχνευση των αλλεργιογόνων στα γαλακτοκομικά προϊόντα, δημιουργώντας με τον τρόπο αυτό ένα σημαντικό επιστημονικό κενό. Με βάση τα παραπάνω και με σκοπό την κάλυψη του επιστημονικού αυτού κενού, ο σκοπός της εργασίας είναι η διερεύνηση των πιο πρόσφατων δεδομένων της βιβλιογραφίας σχετικά με τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση αλλεργιογόνων ουσιών στα γαλακτοκομικά τρόφιμα.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 . ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ – ΣΥΣΤΑΣΗ**

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν μια ευρεία κατηγορία τροφίμων που παράγονται με βάση το γάλα διαφόρων θηλαστικών, κυρίως αγελαδινό, πρόβειο και γίδινο, μέσω διαφόρων τεχνολογικών διεργασιών και ζυμώσεων. Στα βασικότερα γαλακτοκομικά προϊόντα συγκαταλέγονται το παστεριωμένο και το αποστειρωμένο γάλα, η κρέμα γάλακτος, το βούτυρο, το γιαούρτι και τα άλλα ζυμούμενα προϊόντα γάλακτος (όπως το ξινόγαλα και το κεφίρ), τα διάφορα είδη τυριών (μαλακά, ημίσκληρα, σκληρά και τυριά τυρογάλακτος), το συμπυκνωμένο γάλα, η σκόνη γάλακτος, καθώς και ορισμένες κατηγορίες από παγωτά. Τα προϊόντα αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλή διατροφική αξία, καθώς διατηρούν σε μεγάλο βαθμό τα θρεπτικά συστατικά του γάλακτος (πρωτεΐνες, λιπίδια, ασβέστιο, βιταμίνες), ενώ κάποια από αυτά, όπως τα προϊόντα που προκύπτουν μετά από ζύμωση, εμπλουτίζονται περαιτέρω με ωφέλιμους μικροοργανισμούς και βιοδραστικά συστατικά κατά τη διάρκεια της παραγωγής τους (Tunick, 2015).

Η χημική σύσταση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων παρουσιάζει ιδιαίτερη πολυπλοκότητα, καθώς συνιστά ένα πολυφασικό σύστημα διασποράς διαφόρων χημικών ενώσεων. Το γάλα, ως η πρωταρχική πρώτη ύλη, αποτελείται κατά μέσο όρο από 87,5% νερό, ενώ το υπόλοιπο 13% συνιστά την ξηρή ουσία που περιλαμβάνει λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και ανόργανα άλατα. Η λιπιδική φάση του γάλακτος, που αντιπροσωπεύει κατά μέσο όρο το 3,9% της συνολικής σύστασης, εμφανίζεται ως γαλάκτωμα ελαίου-σε-νερό με λιποσφαίρια διαμέτρου 0,1-20  $\mu\text{m}$ . Η σταθερότητα του γαλακτώματος διασφαλίζεται από μια εξαιρετικά λεπτή μεμβράνη πάχους 10-20 nm, η οποία συγκροτείται από ένα πολύπλοκο σύστημα φωσφολιπιδίων, λιποπρωτεϊνών και γλυκοπρωτεϊνών. Τα κύρια λιπαρά οξέα που συνθέτουν τα τριγλυκερίδια του γαλακτολίστου περιλαμβάνουν το μυριστικό, παλμιτικό, στεατικό και ελαϊκό οξύ, των οποίων η αναλογία καθορίζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες του λίπους (MacGibbon, 2020).

Αντίστοιχα, οι πρωτεΐνες του γάλακτος αποτελούν ένα εξαιρετικά πολύπλοκο και δυναμικό σύστημα μακρομορίων με θεμελιώδη σημασία τόσο για τη διατροφική αξία όσο και για τις τεχνολογικές ιδιότητες των γαλακτοκομικών προϊόντων. Η μοριακή τους αρχιτεκτονική χαρακτηρίζεται από την παρουσία αλληλοσυνδεδεμένων αλυσίδων αμινοξέων, με κάθε πρωτεϊνικό μόριο να περιλαμβάνει συνήθως 100-200 αμινοξέα διατεταγμένα σε συγκεκριμένη ακολουθία. Η δομική οργάνωση των πρωτεϊνών του γάλακτος καθορίζεται από την παρουσία αμινοξέων που φέρουν ταυτόχρονα μία αμινομάδα ( $-\text{NH}_2$ ) και μία καρβοξυλομάδα ( $-\text{COOH}$ ), με τις πλευρικές αλυσίδες (R) να διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στις φυσικοχημικές ιδιότητες. Η υδροφιλική ή υδροφοβική φύση των πλευρικών αλυσίδων καθορίζει τη συμπεριφορά των πρωτεϊνών σε υδατικό περιβάλλον, ενώ η παρουσία φωσφορυλιωμένων υδροξυλομάδων επιτρέπει τη δημιουργία γεφυρών με ιόντα ασβεστίου. Ιδιαίτερη σημασία παρουσιάζει ο ηλεκτρικός χαρακτήρας των πρωτεϊνών, ο οποίος εξαρτάται άμεσα από το pH του περιβάλλοντος μέσου. Σε φυσιολογικό pH γάλακτος ( $\approx 6,6$ ), τα πρωτεϊνικά μόρια φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο, γεγονός που συμβάλλει στη σταθερότητα του κολλοειδούς συστήματος μέσω ηλεκτροστατικών απώσεων. Στο ισοηλεκτρικό σημείο ( $\text{pH} \approx 4,6$ ), η εξισορρόπηση

θετικών και αρνητικών φορτίων οδηγεί σε συσσωμάτωση και καταβύθιση (Goulding, 2020).

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: καζεΐνες (79,5%), πρωτεΐνες ορού (19,3%) και πρωτεΐνες της μεμβράνης των λιποσφαιρίων (1,2%) (Πίνακας 1). Οι καζεΐνες οργανώνονται σε μικκύλια διαμέτρου 0,4  $\mu\text{m}$ , τα οποία συγκροτούνται από υπομικκύλια διαμέτρου 10-15 nm. Η σταθερότητα των μικκυλίων εξαρτάται από την παρουσία κολλοειδούς φωσφορικού ασβεστίου και την κατανομή της κ-καζεΐνης στην επιφάνεια. Οι πρωτεΐνες ορού, με κυριότερους εκπροσώπους την α-λακταλβουμίνη και β-λακτοσφαιρίνη, χαρακτηρίζονται από υψηλή διατροφική αξία και θερμοευαισθησία. Η θερμική μετουσίωση της β-λακτοσφαιρίνης άνω των 60°C οδηγεί στο σχηματισμό συμπλόκων με την κ-καζεΐνη μέσω δισουλφιδικών δεσμών, επηρεάζοντας σημαντικά τις τεχνολογικές ιδιότητες του γάλακτος. Οι πρωτεΐνες της μεμβράνης των λιποσφαιρίων συμβάλλουν στη σταθεροποίηση του γαλακτικού γαλακτώματος μέσω της αμφίφιλης φύσης τους. Η διαταραχή της δομικής ακεραιότητας της μεμβράνης μπορεί να οδηγήσει στην απελευθέρωση λιπολυτικών ενζύμων και την εμφάνιση ανεπιθύμητων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (Goulding, 2020).

**Πίνακας 1** Ποσοτική και ποιοτική σύσταση των πρωτεϊνών του γάλακτος

Κατηγορία Πρωτεΐνης	Συγκέντρωση (g/kg)	Ποσοστό επί των Ολικών Πρωτεϊνών (% w/w)
<b>Καζεΐνες</b>		
αs1-καζεΐνη	10,0	30,6
αs2-καζεΐνη	2,6	8,0
β-καζεΐνη	10,1	30,8
κ-καζεΐνη	3,3	10,1
<i>Σύνολο Καζεϊνών</i>	<i>26,0</i>	<i>79,5</i>
<b>Πρωτεΐνες Ορού</b>		
α-λακταλβουμίνη	1,2	3,7
β-λακτοσφαιρίνη	3,2	9,8
Ορολευκωματίνη	0,4	1,2
Ανοσοσφαιρίνες	0,7	2,1
Διάφορες	0,8	2,4
<i>Σύνολο Πρωτεϊνών Ορού</i>	<i>6,3</i>	<i>19,3</i>
<b>Πρωτεΐνες Μεμβράνης Λιποσφαιρίων</b>	0,4	1,2



Κατηγορία Πρωτεΐνης	Συγκέντρωση (g/kg)	Ποσοστό επί των Ολικών Πρωτεϊνών (% w/w)
Ολικές Πρωτεΐνες	32,7	100,0

Το γάλα περιέχει ένα πολύπλοκο σύστημα ανόργανων και οργανικών αλάτων, το οποίο διαφοροποιείται από την έννοια της τέφρας που λαμβάνεται μετά από αποτέφρωση στους 500-550°C. Η τέφρα (0,7%) υποεκτιμά την πραγματική περιεκτικότητα σε άλατα (0,9%) λόγω της απώλειας οργανικών οξέων και της μετατροπής του οργανικού φωσφόρου και θείου σε ανόργανα άλατα κατά την αποτέφρωση. Τα κύρια ανόργανα συστατικά του γάλακτος περιλαμβάνουν διττανθρακικά, χλωριούχα και κιτρικά άλατα του ασβεστίου, μαγνησίου, καλίου και νατρίου, τα οποία κατανέμονται μεταξύ της διαλυτής και κολλοειδούς φάσης. Ενώ τα μονοσθενή ιόντα απαντώνται κυρίως στη διαλυτή φάση, έως και 66% του ασβεστίου και 55% του φωσφόρου βρίσκονται στην κολλοειδή φάση (Gaucheron, 2005).

Το κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο (CCP) ή μικκυλιακό φωσφορικό ασβέστιο (MCP) διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη δομή και σταθερότητα των καζεϊνικών μικκυλίων. Η συγκέντρωση του διαλυτού ασβεστίου συσχετίζεται στενά με τη συγκέντρωση των κιτρικών ιόντων, με την πλειονότητα των κιτρικών να σχηματίζει σύμπλοκα με το ασβέστιο. Μόνο ένα μικρό ποσοστό (~6,6%) του ασβεστίου είναι παρόν ως διαλυτό ιόν  $\text{Ca}^{++}$ . Τα μονοσθενή ιόντα, σε συνδυασμό με τη λακτόζη και άλλα συστατικά χαμηλού μοριακού βάρους, συμβάλλουν στη διατήρηση της ωσμωτικής πίεσης σε επίπεδα ισοωσμωτικά με το αίμα. Το γάλα αποτελεί σημαντική πηγή διαιτητικού ασβεστίου, με τη σύνδεσή του με τις καζεΐνες να ενισχύει πιθανώς την απορρόφησή του στο γαστρεντερικό σωλήνα. Τα ιχνοστοιχεία, παρόντα σε εξαιρετικά μικρές συγκεντρώσεις, εμφανίζουν διαφορετική κατανομή στις φάσεις του γάλακτος. Ενδεικτικά, περίπου 10% του χαλκού και σχεδόν το 50% του σιδήρου συνδέονται με τη μεμβράνη των λιποσφαιρίων, ενώ άλλα ιχνοστοιχεία συνδέονται με πρωτεΐνες ή βρίσκονται σε διαλυτή μορφή (Zamberlin, 2012).

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα, περιέχουν περίπου 60 διαφορετικά ένζυμα, τα οποία μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση την προέλευσή τους σε ενδογενή (από τα

εκκριτικά κύτταρα και το αίμα) και μικροβιακά. Τα ενδογενή ένζυμα, αν και δεν έχουν συγκεκριμένη λειτουργία στο γάλα, κατανέμονται στη μεμβράνη των λιποσφαιρίων, τα καζεϊνικά μικκύλια, τον ορό και τα σωματικά κύτταρα. Η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL) αποτελεί το ένζυμο με την κύρια λιπολυτική δραστηριότητα στο γάλα. Πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη (~100 kDa) που καταλύει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων, απελευθερώνοντας λιπαρά οξέα από τις θέσεις sn-1 και sn-3. Η δράση της μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες οσμές ταγγισμού και αδρανοποιείται κατά την παστερίωση (Deeth, 2006).

Επίσης, η γαλακτοϋπεροξειδάση (LPO), αποτελεί το πιο άφθονο σε συγκέντρωση ένζυμο του γάλακτος (~0,5% των πρωτεϊνών ορού). Έχει μοριακό βάρος 78.030 Da και εμφανίζει ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου και θειοκυανικών ιόντων, αποτελώντας μέρος του συστήματος λακτοϋπεροξειδάσης (LP-system) (Fox, 2006). Αντίστοιχα, η οξειδοαναγωγή της Ξανθίνης, εντοπίζεται κυρίως στη μεμβράνη των λιποσφαιρίων (~20% των πρωτεϊνών MFGM) και υπάρχει σε δύο μορφές: οξειδάση της ξανθίνης (XO) και αφυδρογονάση της ξανθίνης (XDH). Αποτελεί δείκτη θερμικής επεξεργασίας στους 80-90°C και συμβάλλει στην παραγωγή βακτηριοκτόνων παραγόντων (Deeth, 2006). Η καταλάση, αποτελεί ένα ένζυμο το οποίο καταλύει τη διάσπαση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και η δραστηριότητά της αυξάνεται σημαντικά κατά τη μαστίτιδα, καθιστώντας την χρήσιμο δείκτη της υγείας του μαστού. Η καταλάση έχει μοριακό βάρος 225 kDa και είναι σχετικά θερμοευαίσθητη. Η πλασμίνη, αποτελεί την κύρια πρωτεΐνωση του γάλακτος και είναι μέρος ενός πλήρους συστήματος που περιλαμβάνει το πλασμινογόνο, τους ενεργοποιητές του και τους αναστολείς τους. Το μόριο της πλασμίνης έχει την ιδιότητα να είναι θερμοσταθερό και αυτή του η ιδιότητα το κάνει να συμβάλλει στην πρωτεόλυση κατά την ωρίμανση των τυριών (Nielsen, 2002).

Η αλκαλική φωσφατάση είναι μία μια μεμβρανόσυνδετη γλυκοπρωτεΐνη (~85 kDa) που χρησιμοποιείται ως δείκτης παστερίωσης. Από την άλλη πλευρά, η όξινη φωσφατάση (~42 kDa) είναι πιο θερμοσταθερή σε σύγκριση με την αλκαλική και δρα κυρίως στις φωσφοπρωτεΐνες (Deeth, 2006).

Η λυσοζύμη, γνωστή επίσης ως Ν-ακετυλμουραμιδάση ή μουραμιδάση, αποτελεί ένα σημαντικό υδρολυτικό ένζυμο του γάλακτος. Η κύρια λειτουργία της είναι η κατάλυση της διάσπασης των πεπτιδογλυκανικών πολυμερών του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 18 kDa, της οποίας η αμινοξική αλληλουχία παρουσιάζει αξιοσημείωτη ομολογία με αυτή της α-λακταλβουμίνης. Η λυσοζύμη εμφανίζει βέλτιστη δραστικότητα σε pH 6,35 και χαρακτηρίζεται από διαφορετική σταθερότητα ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος. Συγκεκριμένα, παρουσιάζει σχετική σταθερότητα στη θερμική επεξεργασία σε όξινες συνθήκες (pH 3-4), ενώ καθίσταται ασταθής σε αλκαλικό περιβάλλον (pH > 7). Αν και η λυσοζύμη μπορεί να προστεθεί εξωγενώς στο γάλα κατά την παραγωγή διαφόρων τύπων τυριού, η χρήση της στην εμπορική τυροκόμηση παραμένει περιορισμένη (Khorshidian, 2022).

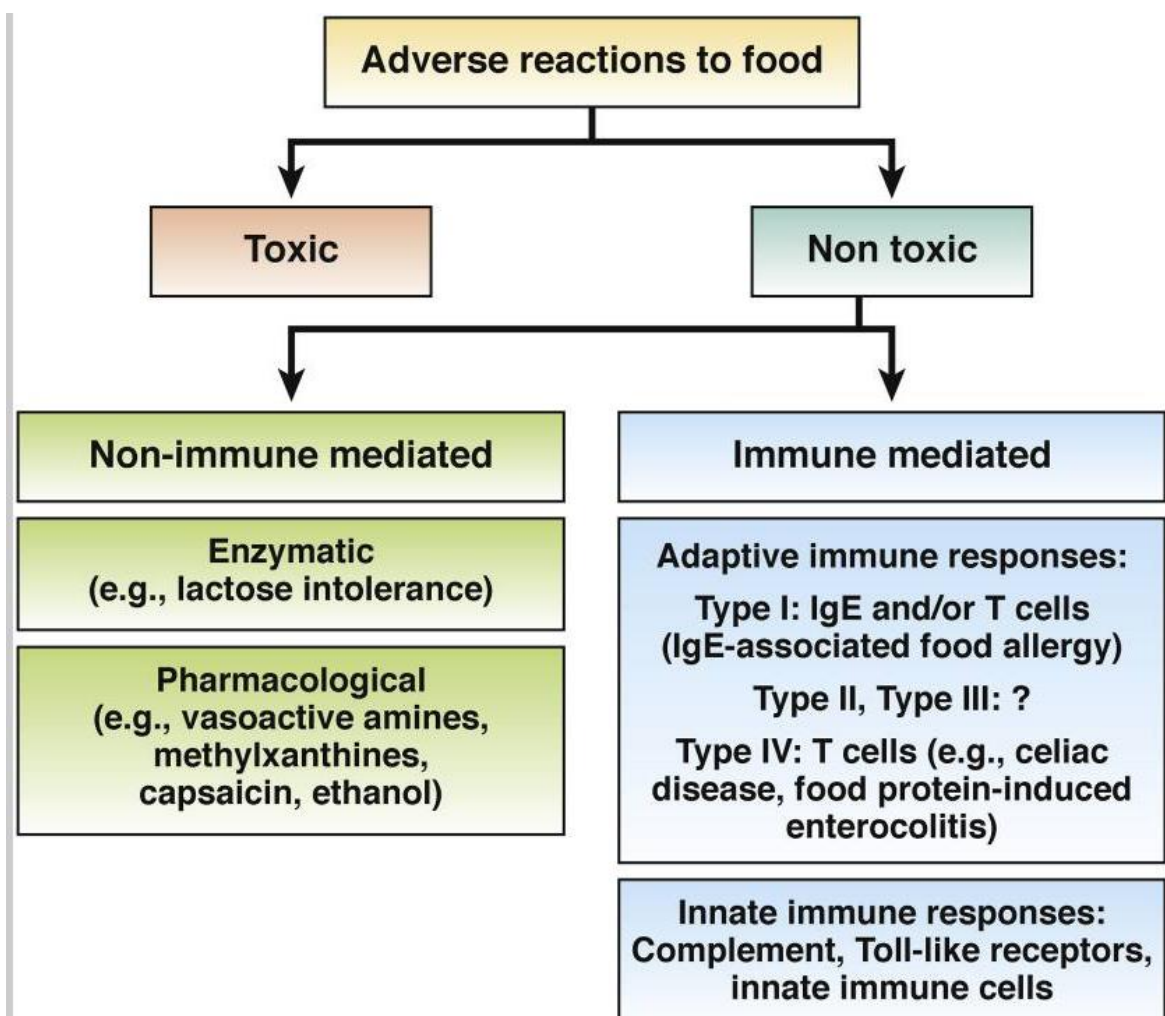
Τέλος, η γ-γλουταμυλοτρανσφεράση (GGT) συνιστά ένα ένζυμο με ιδιαίτερη σημασία για τη βιομηχανία των γαλακτοκομικών. Εντοπίζεται κυρίως στο μεμβρανικό υλικό του αποβουτυρωμένου γάλακτος ή στη μεμβράνη των λιποσφαιρίων (MFGM), από όπου έχει απομονωθεί και καθαριστεί. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους περίπου 80 kDa, η οποία αποτελείται από δύο υπομονάδες γλυκοπρωτεϊνικής φύσης. Η GGT εμφανίζει βέλτιστη καταλυτική δραστικότητα σε pH 8,5-9 και χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης για την παρακολούθηση θερμικών επεξεργασιών στο εύρος θερμοκρασιών 70-80°C για χρονικό διάστημα 16 δευτερολέπτων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η δυνατότητα χρήσης της δραστικότητας της GGT ως διαγνωστικού εργαλείου για τη διάκριση μεταξύ βρεφών που τρέφονται με μητρικό γάλα και εκείνων που λαμβάνουν τυποποιημένα γάλατα (DosAnjos, 1998).

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΑ

Οι ανεπιθύμητες αντιδράσεις στα τρόφιμα, είναι γνωστές στη βιβλιογραφία και με τον ευρύτερο όρο τροφική δυσανεξία και διακρίνονται σε τοξικές και μη τοξικές. Στις μη τοξικές αντιδράσεις, οι μη ανοσολογικά διαμεσολαβούμενες αντιδράσεις, όπως οι

ενζυμικές ανεπάρκειες (π.χ. δυσανεξία στη λακτόζη) ή αντιδράσεις σε συγκεκριμένες ουσίες, είναι συχνότερες από τις ανοσολογικά διαμεσολαβούμενες. Ωστόσο, οι ανοσολογικές αντιδράσεις επηρεάζουν εκατομμύρια ανθρώπους, προκαλώντας σημαντική νοσηρότητα και δαπάνες υγειονομικής περίθαλψης, ενώ μπορούν να οδηγήσουν και σε σοβαρές, απειλητικές για τη ζωή αντιδράσεις (Metcalf, 2013).

Το Εθνικό Ινστιτούτο Αλλεργίας και Λοιμωδών Νοσημάτων ορίζει την τροφική αλλεργία ως "μια ανεπιθύμητη επίδραση στην υγεία που προκύπτει από συγκεκριμένη ανοσολογική απόκριση και εμφανίζεται επαναλαμβανόμενα κατά την έκθεση σε συγκεκριμένο τρόφιμο". Η απόκριση αυτή περιλαμβάνει όλους τους τύπους ανοσολογικά διαμεσολαβούμενων αντιδράσεων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που προκαλούνται από το προσαρμοστικό και το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα (Εικόνα 1) (Boyce, 2011).



**Εικόνα 1 Ταξινόμηση της τροφικής δυσανεξίας. Οι ανεπιθύμητες αντιδράσεις στα τρόφιμα μπορούν να ταξινομηθούν ως τοξικές ή μη τοξικές αντιδράσεις. Οι μη τοξικές αντιδράσεις κατηγοριοποιούνται περαιτέρω ως ανοσομεσολαβούμενες ή μη ανοσομεσολαβούμενες. Οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες βασίζονται σε μη ανοσομεσολαβούμενους μηχανισμούς, όπως ελαττώματα ενζύμων όπως παρατηρούνται στη δυσανεξία στη λακτόζη. Οι υπερευαισθησίες που αφορούν το προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα μπορούν να υποδιαιρεθούν σε 4 κατηγορίες (τύποι I-IV). Οι αντιδράσεις τύπου I συνδέονται πάντα με το σχηματισμό IgE έναντι αλλεργιογόνων τροφίμων και επομένως μπορούν να ονομαστούν τροφικές αλλεργίες που σχετίζονται με την IgE. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις για συμμετοχή της IgG σε αντιδράσεις τύπου II ή τύπου III σε ανοσομεσολαβούμενες ανεπιθύμητες αντιδράσεις στα τρόφιμα, ενώ οι αντιδράσεις τύπου IV, οι οποίες περιλαμβάνουν T κύτταρα, έχουν σημαντικό ρόλο σε διαταραχές όπως η κοιλιοκάκη. Υπάρχουν ενδείξεις ότι το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα, το οποίο περιλαμβάνει συμπλήρωμα, υποδοχείς τύπου Toll και έμφυτα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, μεσολαβεί επίσης ανοσολογικές αντιδράσεις έναντι ορισμένων συστατικών τροφίμων.**

Υπάρχουν τέσσερις κύριοι τύποι αλλεργικών αντιδράσεων βάσει των μηχανισμών παθογένεσης. Οι συνηθέστερες ανοσολογικά διαμεσολαβούμενες αντιδράσεις (τύπου I) χαρακτηρίζονται από την ανάπτυξη IgE έναντι τροφικών αλλεργιογόνων, συχνά συνοδευόμενη από φλεγμονή που διαμεσολαβείται από T-κύτταρα και ηωσινόφιλα. Οι ασθενείς με IgE-σχετιζόμενη τροφική αλλεργία μπορούν να ταυτοποιηθούν μέσω της ανίχνευσης ειδικής IgE στον ορό και τα σωματικά υγρά. Παρότι έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η IgG έναντι τροφικών αντιγόνων θα μπορούσε να προκαλέσει αντιδράσεις τύπου II ή III, δεν υπάρχουν ισχυρές πειραματικές αποδείξεις. Αυτός είναι και ο λόγος που αρκετές επίσημες οδηγίες, συνιστούν έντονα την αποφυγή ελέγχου για τροφική IgG στη διάγνωση τροφικών αλλεργιών. Οι αντιδράσεις υπερευαισθησίας τύπου IV, που περιλαμβάνουν κυρίως αποκρίσεις T-κυττάρων ειδικών για τροφικά αντιγόνα και μπορούν να βλάψουν τον εντερικό βλεννογόνο, σχετίζονται με διαταραχές όπως η κοιλιοκάκη. Επιπλέον, ορισμένες πρωτεΐνες τροφίμων μπορούν να προκαλέσουν φλεγμονή μέσω άμεσης ενεργοποίησης του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος (Bock, 2010).

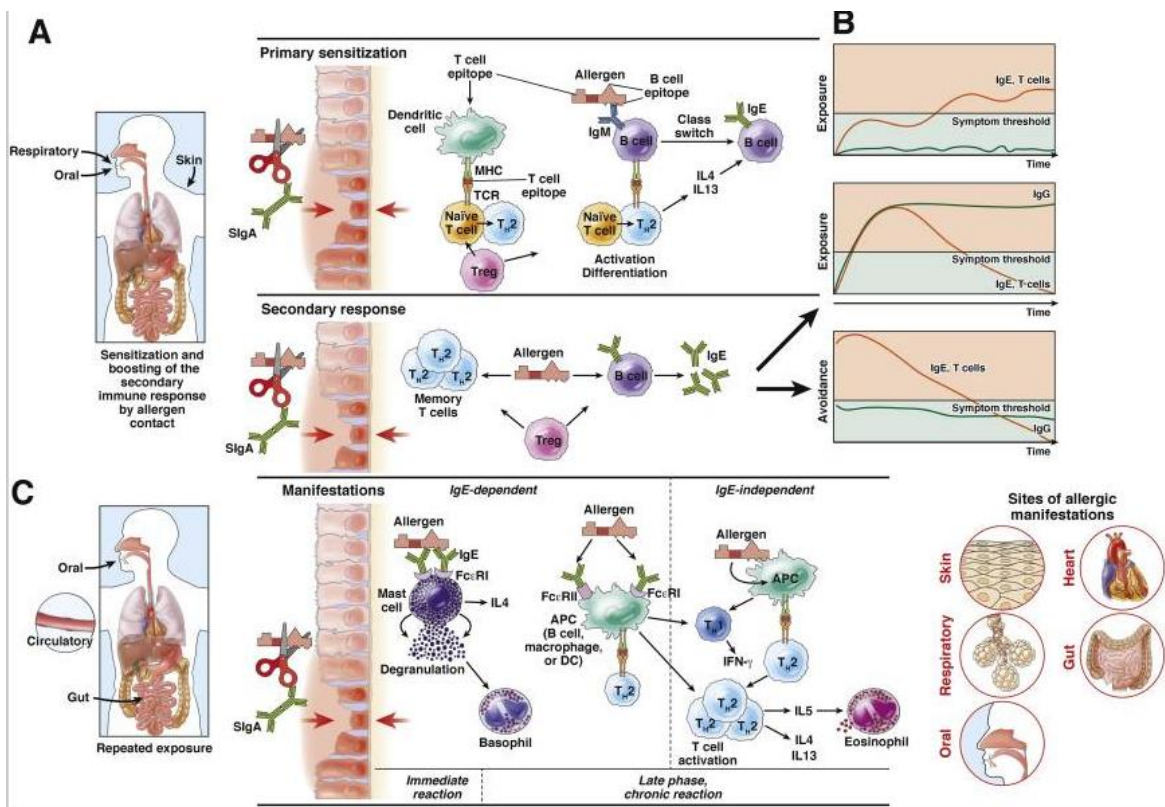
Στις ανεπτυγμένες χώρες, σύμφωνα με πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες, η IgE-σχετιζόμενη τροφική αλλεργία επηρεάζει 3-8% των παιδιών και 1-3% των ενηλίκων. Τα πιο συχνά αλλεργιογόνα τρόφιμα περιλαμβάνουν το γάλα, τα αυγά, το σιτάρι, τα φιστίκια, τους ξηρούς καρπούς γενικότερα, το σουσάμι, τα ψάρια, τα φρούτα και τα λαχανικά. Ενώ οι αλλεργίες σε γάλα, αυγά και σιτάρι συχνά ξεπερνιούνται με την

ηλικία, οι αλλεργίες σε φιστίκια, ξηρούς καρπούς και ψάρια τείνουν να επιμένουν (Lopes, 2020, Warren, 2020). Αξίζει να σημειωθεί ότι τις τελευταίες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί ότι τόσο συχνότητα όσο και η σοβαρότητα των τροφικών αλλεργιών φαίνεται να αυξάνεται. Πρόσφατη μελέτη εντόπισε επιγενετικές διαφορές στα CD4+ T κύτταρα μεταξύ παιδιών με και χωρίς IgE-διαμεσολαβούμενες τροφικές αλλεργίες. Σύμφωνα με την "υπόθεση της υγιεινής", η μείωση του μεγέθους των οικογενειών και η βελτίωση της προσωπικής υγιεινής έχουν συμβάλει στην αυξημένη επικράτηση των IgE-διαμεσολαβούμενων αλλεργιών. Αντίθετα, παράγοντες όπως ο ανθρωποσοφικός τρόπος ζωής (κατανάλωση οργανικών τροφίμων που περιέχουν λακτοβάκιλλους και περιορισμένη χρήση αντιβιοτικών, αντιτυρετικών και εμβολίων) έχουν συσχετιστεί με μειωμένη συχνότητα αλλεργιών. Συνεπώς, έχει προταθεί ότι η ανεπαρκής έκθεση σε διαιτητικούς και βακτηριακούς μεταβολίτες μπορεί να έχει συμβάλει στην αύξηση των φλεγμονωδών διαταραχών στις δυτικές χώρες (Thorburn, 2014).

### **3.1 Αλλεργική ευαισθητοποίηση και δευτερογενείς ανοσολογικές αποκρίσεις**

Η αλλεργική ευαισθητοποίηση περιγράφει την αρχική επαγωγή μιας αλλεργικής ανοσολογικής απόκρισης κατά την πρώτη επαφή με το αλλεργιογόνο. Υπάρχουν δύο καλά τεκμηριωμένες οδοί ευαισθητοποίησης: τα αλλεργιογόνα τροφίμων Τάξης 1 (π.χ. γάλα, αυγό, φιστίκι) προκαλούν ευαισθητοποίηση μέσω του γαστρεντερικού συστήματος, ενώ τα αλλεργιογόνα Τάξης 2 είναι αεροαλλεργιογόνα (π.χ. το κύριο αλλεργιογόνο γύρης σημύδας Bet v 1) που προκαλούν ευαισθητοποίηση μέσω της αναπνευστικής οδού και μπορούν να διασταυρωθούν ανοσολογικά με ομόλογα τροφικά αλλεργιογόνα, όπως το κύριο αλλεργιογόνο του μήλου Mal d 1. Πρόσφατα προτάθηκε και η δερματική οδός ευαισθητοποίησης στα τροφικά αλλεργιογόνα, με μελέτες σε ζωικά μοντέλα να υποδεικνύουν ότι η επιδερμική ευαισθητοποίηση οδηγεί σε αύξηση των IgE-εξαρτώμενων εντερικών μαστοκυττάρων και αλλεργικών αντιδράσεων στα τρόφιμα (Εικόνα 2) (Valenta, 1996, Lack, 2012).





Εικόνα 2. (Α) Η επαφή με το αλλεργιογόνο μέσω του γαστρεντερικού συστήματος, της αναπνευστικής οδού και ενδεχομένως μέσω του δέρματος επάγει την παραγωγή IgE (πρωτογενής ευαισθητοποίηση) σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα. (Β) Η ισορροπία μεταξύ της ειδικής για το αλλεργιογόνο IgE και της ανασταλτικής IgG καθορίζει εάν ένας ασθενής θα αναπτύξει συμπτώματα. (Γ) Τα αλλεργικά συμπτώματα προκαλούνται από επαναλαμβανόμενη επαφή με το στοματικό αλλεργιογόνο, μέσω της άμεσης αλλεργικής αντίδρασης (διασταυρούμενη σύνδεση της συνδεδεμένης με μαστοκύτταρα IgE από το αλλεργιογόνο και στη συνέχεια ενεργοποίηση των ειδικών για το αλλεργιογόνο T-κυττάρων), και έπειτα από άλλα φλεγμονώδη κύτταρα, όπως ηωσινόφιλα και βασεόφιλα, κατά την όψιμη φάση και τη χρόνια φλεγμονή.

Οι καθοριστικοί παράγοντες της αλλεργικής ευαισθητοποίησης περιλαμβάνουν χαρακτηριστικά του επιθηλιακού φραγμού, ιδιότητες του ίδιου του αλλεργιογόνου (σταθερότητα στο περιβάλλον και στο γαστρεντερικό), μη αλλεργιογόνα συστατικά της τροφικής μήτρας και ουσίες που δρουν ως ανοσοενισχυτικά. Ενδογενείς παράγοντες (όπως γενετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο της φιλαγγρίνης) και εξωγενείς παράγοντες (όπως η κατανάλωση αλκοόλ, αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, παθογόνων ή η έκθεση σε στρεσογόνες καταστάσεις) μπορούν να μειώσουν τη λειτουργία του εντερικού φραγμού και να διευκολύνουν την ευαισθητοποίηση (Alm, 2002). Τα εκκριτικά αντισώματα, ιδιαίτερα η εκκριτική IgA (SIgA), διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση του επιθηλιακού φραγμού. Ποντίκια με ανεπάρκεια σε SIgA και εκκριτική IgM είναι επιρρεπή

στην ανάπτυξη αναφυλακτικού σοκ επαγόμενου από τροφικά αλλεργιογόνα, το οποίο μπορεί να αντιμετωπιστεί με επαγωγή ανοχής μέσω T-ρυθμιστικών κυττάρων (Karlsson, 2010).

Σε άτομα με ατοπική προδιάθεση, η επαφή με το αλλεργιογόνο ενεργοποιεί, μετά από επεξεργασία από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (π.χ. δενδριτικά κύτταρα ή B-κύτταρα), ειδικά T-βοηθητικά 2 (Th2) κύτταρα που παράγουν κυτταροκίνες όπως η IL4 και IL13, οι οποίες επάγουν την παραγωγή ειδικής IgE. Η πρωτογενής ευαισθητοποίηση συμβαίνει νωρίς στη ζωή και οδηγεί σε T-κυτταρική και IgE ανοσολογική μνήμη, η οποία μπορεί να ενισχυθεί με επαναλαμβανόμενη επαφή με το αλλεργιογόνο (Grammatikow, 2008). Αναλύσεις της χρονικής εξέλιξης της αλλεργικής ευαισθητοποίησης σε μεγάλες μελέτες κοόρτης με πληθυσμό παιδιών μετά τη γέννηση, έχουν δείξει ότι οι τροφικές αλλεργίες και τα συμπτώματά τους αναπτύσσονται πριν από τις αναπνευστικές αλλεργίες. Στη μετέπειτα ζωή, παρατηρείται αντίστροφη τάση, με τις τροφικές αλλεργίες συχνά να ξεπερνιούνται ενώ οι αναπνευστικές αυξάνονται. Ο επιπολασμός των τροφικών αλλεργιών είναι περίπου 10 φορές χαμηλότερος από εκείνον των αναπνευστικών αλλεργιών, πιθανώς επειδή η στοματική έκθεση στα αλλεργιογόνα ενεργοποιεί μηχανισμούς ανοχής μέσω ρυθμιστικών T-κυττάρων (Motjabavi, 2002, Niederberger, 2007).

Μετά την πρωτογενή ευαισθητοποίηση, η αλλεργική ανοσολογική απόκριση ενισχύεται με την επαναλαμβανόμενη έκθεση στο αλλεργιογόνο, αυξάνοντας την ενεργοποίηση των ειδικών T-κυττάρων και την παραγωγή IgE. Στα άτομα με αναπνευστική αλλεργία, η IgE απόκριση ενισχύεται μέσω της επαφής με το βλεννογόνο αλλεργιογόνο και, ενδιαφέρον είναι ότι, δε φαίνεται να απαιτεί βοήθεια από T-κύτταρα (Eckl-Dorna, 2012). Ένα άλλο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό της εδραιωμένης δευτερογενούς IgE απόκρισης είναι ότι στους ενήλικες με αλλεργία, το προφίλ των αλλεργιογόνων που αναγνωρίζονται από την IgE δεν μεταβάλλεται ουσιαστικά, ενώ τα μικρά παιδιά φαίνεται να μπορούν να ευαισθητοποιηθούν σε νέα αλλεργιογόνα. Στην περίπτωση της αναπνευστικής αλλεργίας, η επαφή με το αλλεργιογόνο μέσω του αναπνευστικού βλεννογόνου ενισχύει σημαντικά την παραγωγή IgE, αλλά έχει μικρή επίδραση στις άλλες τάξεις ειδικών για το αλλεργιογόνο αντισωμάτων (Durham, 1997).



Οι μηχανισμοί με τους οποίους ενισχύονται οι ειδικές για τροφικά αλλεργιογόνα IgE αποκρίσεις στους ασθενείς με τροφικές αλλεργίες δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Κατά την από του στόματος χορήγηση τροφικών αλλεργιογόνων, οι ασθενείς παρουσίασαν ισχυρή αύξηση στην παραγωγή ειδικής IgG, συνοδευόμενη από αρχική ενίσχυση της IgE. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η κατάποση του αλλεργιογόνου μπορεί να ενισχύσει τόσο την παραγωγή IgG όσο και IgE. Είναι σαφές ότι η αποφυγή των τροφικών αλλεργιογόνων για παρατεταμένο χρονικό διάστημα μειώνει τα επίπεδα της ειδικής IgE κάτω από το όριο εμφάνισης συμπτωμάτων. Ωστόσο, υπάρχει διχογνωμία σχετικά με το αν η πρόσληψη τροφικών αλλεργιογόνων είναι ευεργετική. Εάν η πρόσληψη κυρίως διεγείρει την παραγωγή προστατευτικών IgG αντισωμάτων, θα μπορούσε να επαχθεί ανοχή. Ωστόσο, ανεπαρκής παραγωγή IgG θα μπορούσε να οδηγήσει σε αύξηση των επιπέδων IgE, προκαλώντας αυξημένη ευαισθησία και συμπτώματα (Prescott, 2010, Fisher, 2011).

### **3.2 Παθογένεση και συμπτώματα των τροφικών αλλεργιών**

Κατά την αλληλεπίδραση με τα τροφικά αντιγόνα, η IgE διασυνδέεται και προσδένεται στα μαστοκύτταρα και τα βασεόφιλα μέσω του υποδοχέα υψηλής συγγένειας FcεRI. Η διαδικασία αυτή ενεργοποιεί τα κύτταρα, οδηγώντας στην απελευθέρωση κοκκίων που περιέχουν προσχηματισμένους φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές (π.χ. ισταμίνη), καθώς και στη de novo σύνθεση και απελευθέρωση φλεγμονωδών διαμεσολαβητών (π.χ. λευκοτριένια), πρωτεασών (π.χ. τρυπτάση), φλεγμονωδών κυτταροκινών (π.χ. IL4) και χημειοτακτικών μορίων. Καθώς τα τροφικά αλλεργιογόνα εισέρχονται στην κυκλοφορία μέσω του γαστρεντερικού συστήματος, τα συμπτώματα μπορούν να αναπτυχθούν είτε απευθείας στα σημεία επαφής με το αλλεργιογόνο (π.χ. στόμα, οισοφάγος, έντερο), είτε σε άλλα όργανα. Συστηματικές αντιδράσεις εμφανίζονται όταν αλλεργιογόνα ικανά να διασυνδέσουν την IgE των δραστικών κυττάρων διαπερνούν το βλεννογονικό φραγμό και εισέρχονται στην κυκλοφορία (Εικόνα 2C) (Bischoff, 2005).

Η ένταση της άμεσης αλλεργικής αντίδρασης αυξάνεται ανάλογα με τον αριθμό των IgE επιτόπων στο αλλεργιογόνο, τα υψηλά επίπεδα ειδικής IgE και την υψηλή συγγένεια της ειδικής IgE. Τα υψηλά επίπεδα ειδικής IgE προκαλούν αύξηση της

έκφρασης του FcεRI στα μαστοκύτταρα και τα βασεόφιλα, οδηγώντας σε πυκνότερη συγκέντρωση IgE σε αυτά τα κύτταρα. Εκτός από την άμεση αλλεργική αντίδραση, παρατηρούνται και όψιμες αλλεργικές αντιδράσεις δύο τύπων. Αναλυτικότερα, η όψιμη φάση της απόκρισης χαρακτηρίζεται από εισροή βασεοφίλων και ηωσινοφίλων αρκετές ώρες μετά την επαφή με το αλλεργιογόνο. Η διαδικασία αυτή είναι ευαίσθητη στα στεροειδή και φαίνεται να εμπλέκει τον παράγοντα διέγερσης αποικίων κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (Yunginger, 2000).

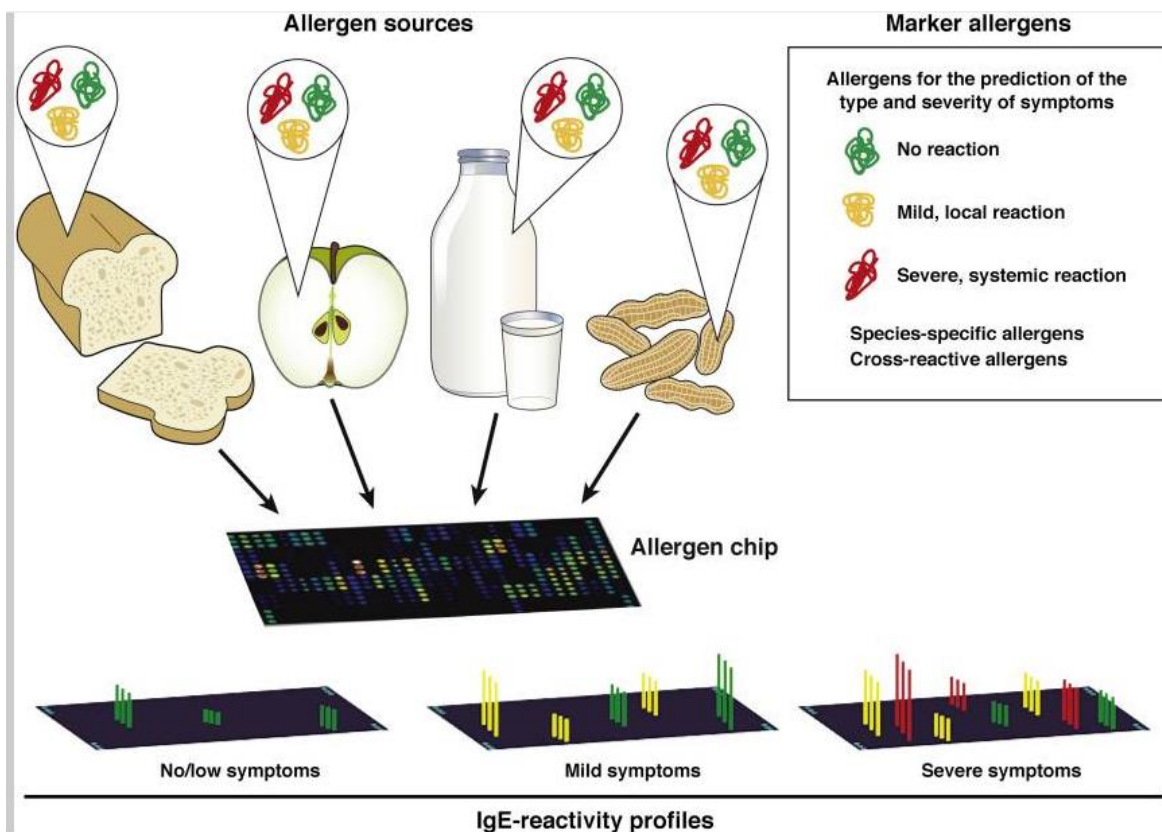
Επιπλέον, αντιδράσεις οι οποίες παρουσιάζουν χρονική καθυστέρηση, μπορούν να εμφανιστούν 24-48 ώρες μετά την επαφή με κάποιο αλλεργιογόνο. Αυτές μοιάζουν με αντιδράσεις υπερευαισθησίας τύπου IV και εμπλέκουν ειδικά για το αλλεργιογόνο T-κύτταρα. Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα εκφράζουν τόσο τον FcεRI όσο και τον υποδοχέα χαμηλής συγγένειας για την IgE (FcεRII ή CD23), χρησιμοποιώντας τους για την IgE-διευκολυνόμενη παρουσίαση του αλλεργιογόνου. Η επαγωγή της ατοπικής δερματίτιδας από τροφικά αλλεργιογόνα απαιτεί όχι μόνο Th2 κύτταρα (και Th2 κυτταροκίνες όπως IL4, IL13 και IL5), αλλά και Th1 κύτταρα που διαμεσολαβούν την καθυστερημένη αλλεργική φλεγμονή. Η ιντερφερόνη-γ, που εκκρίνεται από τα ειδικά για το αλλεργιογόνο Th1 κύτταρα, έχει δείχθει ότι προκαλεί επιθηλιακή βλάβη σε μοντέλο αναπνευστικής αλλεργίας (Reisinger, 2005).

Η άμεσου και καθυστερημένου τύπου αλλεργική φλεγμονή που εμφανίζεται κατά την IgE-σχετιζόμενη τροφική αλλεργία έχει μελετηθεί εκτενώς σε ασθενείς με σύνδρομο στοματικής αλλεργίας (OAS – Oral Allergy Syndrome). Το OAS προκαλείται από την ευαισθητοποίηση σε αναπνευστικά αλλεργιογόνα που παρουσιάζουν δομική ομοιότητα με αλλεργιογόνα τροφών, οδηγώντας σε διασταυρούμενη ανοσολογική απόκριση. Η συχνότερη μορφή OAS αναπτύσσεται με ευαισθητοποίηση στο κύριο αλλεργιογόνο της γύρης σημύδας, Bet v 1. Στους ασθενείς με αυτή τη μορφή OAS, η ανοσολογική απόκριση διασταυρώνεται με αλλεργιογόνα φυτικής προέλευσης όπως μήλα, ξηροί καρποί, καρότα και σέλινο. Αυτό οδηγεί σε τοπικά αλλεργικά συμπτώματα άμεσου τύπου (τοπικός κνησμός και οίδημα χειλιών ή γλώσσας), που προκαλούνται από την IgE-διαμεσολαβούμενη αποκοκκίωση των μαστοκυττάρων (Bohle, 2006, Kleine-Tebbe, 2002).

Ωστόσο, τα σχετιζόμενα με το Bet  $\gamma$  1 τροφικά αλλεργιογόνα φυτικής προέλευσης διασπώνται από το γαστρεντερικό σύστημα, επομένως συστηματικές αντιδράσεις εμφανίζονται μόνο σε εξαιρετικές περιπτώσεις (όπως μετά από κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων κατά την άσκηση), ενώ αναφυλακτικό σοκ δεν παρατηρείται. Επιπλέον, το μαγείρεμα καταστρέφει τα IgEεπίτοπα, αλλά αφήνει ανέπαφα τα πεπτίδια που αναγνωρίζονται από τα ειδικά T-κύτταρα. Η πληροφόρηση σχετικά με το χρόνο εμφάνισης των αλλεργικών αντιδράσεων μετά την πρόσληψη του τροφικού αλλεργιογόνου (λεπτά-ώρες έναντι ωρών-ημερών) και τον αλλεργικό φαινότυπο (π.χ. κνίδωση έναντι ατοπικής δερματίτιδας) μπορεί να βοηθήσει στον προσδιορισμό του κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος. Για παράδειγμα, οι άμεσες αντιδράσεις αντιμετωπίζονται με αντιισταμινικά, αντιλευκοτριένια, επινεφρίνη, σταθεροποιητές μαστοκυττάρων ή αντι-IgE, ενώ η όψιμη χρόνια φλεγμονή αντιμετωπίζεται με στεροειδή ή φαρμακολογικούς παράγοντες με αντι-IL5 δράση (Valenta, 2015).

### 3.3 Παθοφυσιολογία και Διάγνωση διατροφικών αλλεργιών

Από τη δεκαετία του 1980, η επιστημονική κατανόηση της δομής και των ανοσολογικών χαρακτηριστικών των αλλεργιογόνων έχει προοδεύσει σημαντικά. Η ανάπτυξη ανασυνδυασμένων αλλεργιογόνων που περιλαμβάνουν τα συχνότερα αντιγόνα έχει αντικαταστήσει τα παραδοσιακά, ακαθόριστα εκχυλίσματα αλλεργιογόνων που παρασκευάζονταν από πηγές όπως το σιτάρι, το μήλο, το γάλα ή τα φιστίκια και περιείχαν μείγματα διαφόρων αλλεργιογόνων και μη αλλεργιογόνων υλικών. Τα καθαρά μόρια αλλεργιογόνων είναι πλέον διαθέσιμα τόσο για διαγνωστικούς σκοπούς όσο και για την ανοσοθεραπεία. Πολλές πηγές αλλεργιογόνων περιέχουν αντιγόνα με περιορισμένη κλινική σημασία, είτε επειδή είναι ασθενείς επαγωγείς αλλεργικών αντιδράσεων, είτε επειδή περιέχουν IgE-αντιδραστικούς υδατανθρακικούς επιτόπους χωρίς αλλεργιογόνο δράση, ή μόρια που προκαλούν μόνο ήπια ή τοπικά συμπτώματα (Εικόνα 3) (Valenta, 2009).



Εικόνα 3 Διάγνωση τροφικής αλλεργίας. Διαφορετικές πηγές αλλεργιογόνων τροφίμων περιέχουν διάφορα αλλεργιογόνα μόρια (συστατικά). Αυτά μπορούν να παραχθούν ως ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ή να καθαριστούν από φυσικές πηγές. Αυτά τα αλλεργιογόνα μπορούν να ταξινομηθούν σε IgE-αντιδραστικά συστατικά (πράσινο), τα οποία είναι φτωχοί ενεργοποιητές φλεγμονωδών κυττάρων και επομένως προκαλούν ελάχιστες ή καθόλου κλινικές αντιδράσεις, συστατικά που προκαλούν ήπια ή κυρίως τοπικά συμπτώματα (κίτρινο), και συστατικά που συχνά σχετίζονται με σοβαρές και συστηματικές αλλεργικές αντιδράσεις (κόκκινο). Η τεχνολογία μικροσυστοιχιών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των προφίλ αντιδραστικότητας των ασθενών. Αυτή η διαδικασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό μεμονωμένων αλλεργιογόνων που προκαλούν ασθένειες και τρόφιμα στα οποία οι ασθενείς είναι πιο πιθανό να ανταποκριθούν. Οι διαγνωστικές μέθοδοι μπορεί επίσης να προβλέψουν τη σοβαρότητα των αντιδράσεων (Πηγή: Valenta, 2015).

Έχουν αναγνωριστεί δείκτες αλλεργιογόνων από τις συχνότερες πηγές τροφικών αλλεργιογόνων, οι οποίοι ωστόσο είναι οι μοναδικοί για συγκεκριμένες πηγές τροφίμων και μπορούν να επιβεβαιώσουν την ευαισθητοποίηση σε αυτές. Άλλα αλλεργιογόνα απαντώνται σε διαφορετικές τροφικές πηγές, με αποτέλεσμα οι ευαισθητοποιημένοι ασθενείς να εμφανίζουν συμπτώματα μετά την κατανάλωση φαινομενικά άσχετων τροφών. Τα μεμονωμένα μόρια αλλεργιογόνων ονοματοδοτούνται και καταχωρούνται

από την επιτροπή ονοματολογίας του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας και της Διεθνούς Ένωσης Ανοσολογικών Εταιρειών, ενώ διάφορες βάσεις δεδομένων αποθηκεύουν πληροφορίες σχετικά με τα ονόματα, την ταξινόμηση και τα χαρακτηριστικά τους (Constantin, 2009). Στον Πίνακα 2 φαίνονται κάποια από τα σημαντικότερα αλλεργιογόνα που βρίσκονται στα γαλακτοκομικά προϊόντα τα οποία μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση τις βιολογικές τους λειτουργίες, την βασική τους δομή και την ανοσολογική τους απόκριση (Breitender, 2013).

**Πίνακας 2. Οικογένειες αλλεργιογόνων που συναντώνται στα γαλακτοκομικά προϊόντα**

Οικογένεια Πρωτεϊνών	Λειτουργία	Αλλεργιογόνο/Πηγή
Καζεΐνες	Πρωτεΐνες γάλακτος θηλαστικών, σχηματίζουν σταθερά μικκυλιακά σύμπλοκα	Bos d 8–Bos d 12/γάλα αγελάδας
Οικογένεια Τρανσφερίνης	Πλούσιες σε θείο γλυκοπρωτεΐνες δέσμησης ιόντων	Bos d Lactoferrin/γάλα αγελάδας
Λιποκαλίνες	Πρωτεΐνες-μεταφορείς	Bos d 5/γάλα αγελάδας
Οικογένεια Λυσοζύμης	Ενζυμική δραστηριότητα, σύνθεση λακτόζης στο γάλα	Bos d 4/γάλα αγελάδας
Αλβουμίνες	Πρωτεΐνες ορού, πρωτεΐνες μεταφοράς	Bos d 6/γάλα αγελάδας

### 3.4 Πρόληψη και θεραπεία εξειδικευμένη στα αλλεργιογόνα των τροφίμων

Ένας σημαντικός περιορισμός της πρόληψης και θεραπείας, είναι η δυσκολία στην παρασκευή αποτελεσματικών και ασφαλών εμβολίων από φυσικές πηγές αλλεργιογόνων. Ωστόσο, με βάση τη γνώση της δομής των αλλεργιογόνων που προκαλούν ασθένειες, έχει καταστεί δυνατή η παραγωγή νέων μορφών εμβολίων αλλεργίας με βάση καθαρισμένα μόρια αλλεργιογόνων. Κλινικές δοκιμές έχουν δείξει την αποτελεσματικότητα των ανοσοθεραπειών οι οποίες περιλαμβάνουν ανασυνδυασμένα αλλεργιογόνα. Με βάση αυτά τα αλλεργιογόνα και υπό τυποποιημένες συνθήκες, είναι δυνατή η παραγωγή εμβολίων (Valenta, 2011).

Ωστόσο, τα αλλεργιογόνα άγριου τύπου εξακολουθούν να περιέχουν επιτόπους που ενεργοποιούν τα IgE και T κύτταρα και ως εκ τούτου μπορεί να προκαλέσουν αλλεργικές αντιδράσεις στους ασθενείς. Τρεις προσεγγίσεις, βασισμένες σε τροποποιημένα αλλεργιογόνα, έχουν αναπτυχθεί για να κάνουν τα εμβόλια σε αλλεργιογόνα πιο ασφαλή, αποτελεσματικά και βολικά στη χρήση. Αυτά επιτρέπουν την επιλεκτική στόχευση διαφορετικών πτυχών της αλλεργικής ανοσολογικής απόκρισης. Τα εμβόλια αυτά, περιλαμβάνουν συνθετικά πεπτίδια τα οποία προέρχονται από αλλεργιογόνα και περιέχουν ειδικούς για αλλεργιογόνα επίτοπους T-κυττάρων χωρίς αντιδραστικότητα IgE (Larche, 2011). Λόγω του μικρού μεγέθους τους, τα πεπτιδικά εμβόλια μπορούν να προκαλέσουν ανοχή στα T-κύτταρα χωρίς ειδικές για αλλεργιογόνα αποκρίσεις IgG. Επίσης, τα ανασυνδυασμένα υποαλλεργικά παράγωγα αλλεργιογόνων χαρακτηρίζονται από έντονα μειωμένη αντιδραστικότητα IgE και περιέχουν επίτοπους T-κυττάρων ειδικά για αλλεργιογόνα. Μετά την εσωτερίκευσή τους στα κύτταρα, μπορούν να προκαλέσουν αντιδράσεις σε IgG που είναι ειδικά στα αλλεργιογόνα (Linhart, 2012). Τα πεπτίδια που συνδέονται με φορείς και περιέχουν επίτοπους B-κυττάρων είναι πρωτεΐνες σύντηξης που αποτελούνται από μια πρωτεΐνη-φορέα που δεν σχετίζεται με αλλεργιογόνα και μη αλλεργιογόνα πεπτίδια από τις θέσεις δέσμησης IgE των αλλεργιογόνων. Δεν έχουν αντιδραστικότητα IgE και τους περισσότερους επίτοπους T-κυττάρων ειδικά για αλλεργιογόνα, αλλά μπορούν να προκαλέσουν αντισώματα IgG ειδικά για αλλεργιογόνα (Linhart, 2012).

Αυτές οι προσεγγίσεις έχουν εφαρμοστεί σε δοκιμές ανοσοθεραπείας για ασθενείς με αναπνευστικές αλλεργίες. Αποτελέσματα από κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η επαγωγή ειδικής για αλλεργιογόνα IgG που εμποδίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ αλλεργιογόνων και IgE είναι απαραίτητη για την ανοσοθεραπεία αναπνευστικών και τροφικών αλλεργιών (Larche, 2006). Επομένως, είναι κατανοητό ότι οι τροφικές αλλεργίες μπορούν να αντιμετωπιστούν με παρόμοιο τρόπο όπως οι αναπνευστικές αλλεργίες - όχι μόνο με από του στόματος χορηγούμενους φαρμακευτικούς παράγοντες αλλά και με πρωτόκολλα εμβολιασμού. Στην πραγματικότητα, ένα εμβόλιο για τις αλλεργίες στα γαλακτοκομικά, βασισμένο σε ένα ανασυνδυασμένο υποαλλεργικό παράγωγο των κυριότερων αλλεργιογόνων που παρουσιάζονται στα γαλακτοκομικά προϊόντα,



αξιολογείται σε μια δοκιμή ανοσοθεραπείας φάσης 2 σε ένα ερευνητικό πρόγραμμα χρηματοδοτούμενο από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Rajakuledran, 2018).

Οι τροφικές αλλεργίες μπορούν επίσης να προληφθούν με προγεννητικές ή πρώιμες μεταγεννητικές στρατηγικές για την πρόληψη της αλλεργικής ευαισθητοποίησης. Μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχουν δείξει ότι ο εμβολιασμός εγκύων ποντικών με μόρια που επάγουν IgG ειδικά για αλλεργιογόνα ή η χορήγηση IgG ειδικά για αλλεργιογόνα, εμπόδισε την αλλεργική ευαισθητοποίηση στους απογόνους (Flicker, 2011). Υπάρχουν ενδείξεις ότι η μεταγεννητική χορήγηση υδρολυμένου γάλακτος που περιέχει πεπτίδια προερχόμενα από αλλεργιογόνα μπορεί να προκαλέσει ανοχή. Ωστόσο, μια πρόσφατη μελέτη στην οποία τα παιδιά που διατρέχουν κίνδυνο κοιλιοκάκης έλαβαν γλουτένη ως βρέφη δεν έδειξε καμία επίδραση (Vriezinga, 2014). Τα ερευνητικά προγράμματα είναι σε εξέλιξη για να προσδιοριστεί πότε και πώς καλύτερα να εκτεθούν τα βρέφη σε πιθανά αλλεργιογόνα (π.χ. αλλεργιογόνα φιστικιών) για να αποφευχθεί η ευαισθητοποίηση ή/και να προκληθεί ανοχή (DuToit, 2013).

Εκτός από τις προγεννητικές προσεγγίσεις, μπορούν επίσης να αναπτυχθούν στρατηγικές για την πρόληψη της αλλεργίας με βάση τον έγκαιρο εμβολιασμό ή τη χορήγηση ειδικής για αλλεργιογόνα IgG λίγο μετά τη γέννηση.<sup>139</sup> Εκτός από την υποδόρια χορήγηση, ανοσοθεραπεία για τροφική αλλεργία μπορεί να χορηγηθεί με υπογλώσσια, στοματική ή επιδερμική χορήγηση (Vickery, 2014). Η υπογλώσσια θεραπεία έχει χρησιμοποιηθεί για θεραπευτικό εμβολιασμό, αλλά πρόσφατα βρέθηκε ότι είναι ασφαλής και προκαλεί ανοχή σε παιδιά με ευαισθητοποίηση IgE αλλά χωρίς αλλεργικά συμπτώματα. Κλινικές μελέτες ασθενών με αλλεργίες στα αυγά ή στα φιστίκια διαπίστωσαν ότι η από του στόματος ανοσοθεραπεία όχι μόνο είναι αποτελεσματική για τη θεραπεία,<sup>66</sup> αλλά επίσης προκαλεί διαρκή προστασία, για έως και 5 χρόνια. Διάφορες μορφές από του στόματος ανοσοθεραπείας χρησιμοποιούνται σήμερα σε διάφορες χώρες (Vickery, 2014).

Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να εντοπιστούν αλλεργιογόνα τα οποία να σχετίζονται με ασθένειες, καθώς και χρονικά παράθυρα για έγκαιρη παρέμβαση, ώστε να υπάρξει ρεαλιστική προοπτική να αναπτυχθούν προληπτικές θεραπείες ειδικά για αλλεργιογόνα. Λόγω του υψηλότερου επιπολασμού των αναπνευστικών αλλεργιών από τις τροφικές

αλλεργίες, είναι πιθανό ότι οι πρώτες κλινικές μελέτες πρόληψης θα διεξαχθούν για αναπνευστικά αλλεργιογόνα. Ωστόσο, τα ευρήματα πιθανότατα ισχύουν και για τις τροφικές αλλεργίες. Η ειδική ανοσοθεραπεία ευαισθητοποιημένων ασθενών με ανασυνδυασμένα και συνθετικά εμβόλια βρίσκεται σε πιο προηγμένη φάση σε σύγκριση με τις αναπνευστικές αλλεργίες, ωστόσο οι προσεγγίσεις που εφαρμόζονται στα αναπνευστικά αλλεργιογόνα θα χρησιμοποιηθούν για να βοηθήσουν στην ανάπτυξη καθορισμένων εμβολίων για τροφική αλλεργία. Υποαλλεργικά αλλεργιογόνα παράγωγα έχουν ήδη παραχθεί για αρκετά σημαντικά αλλεργιογόνα τροφίμων και αξιολογήθηκαν *in vitro* και σε ζωικά μοντέλα (Rancitelli, 2011). Επομένως, στο μέλλον, μπορεί να υπάρχει περίπτωση να υπάρχει σημαντική πρόοδος σχετικά με την ανοσοθεραπεία με υπογλώσσια μορφή για τροφικές αλλεργίες μέσω ανασυνδυασμένων εμβολίων με βάση αλλεργιογόνα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΟΙ ΟΠΟΙΕΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΩΝ ΣΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

### 4.1 Βιοαισθητήρες

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry), ο βιοαισθητήρας ορίζεται ως μια αυτόνομη ολοκληρωμένη συσκευή, ικανή να παρέχει συγκεκριμένες ποσοτικές ή ημι-ποσοτικές αναλυτικές πληροφορίες χρησιμοποιώντας ένα βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης, το οποίο βρίσκεται σε άμεση χωρική επαφή με έναν μετατροπέα. Ο μετατροπέας μετατρέπει το (βιο)χημικό σήμα που προκύπτει από την αλληλεπίδραση του αναλύτη με τον βιοϋποδοχέα σε ηλεκτρονικό, με την ένταση του σήματος να είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αναλύτη (Thevenot, 2001). Διάφορα βιομόρια (αντισώματα, ένζυμα, κύτταρα, ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες) και βιομιμητικά μόρια (μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή, απταμερή) έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοϋποδοχείς. Η ανάπτυξη βιοαισθητήρων διαφοροποιείται ανάλογα με την τροποποίηση της επιφάνειας



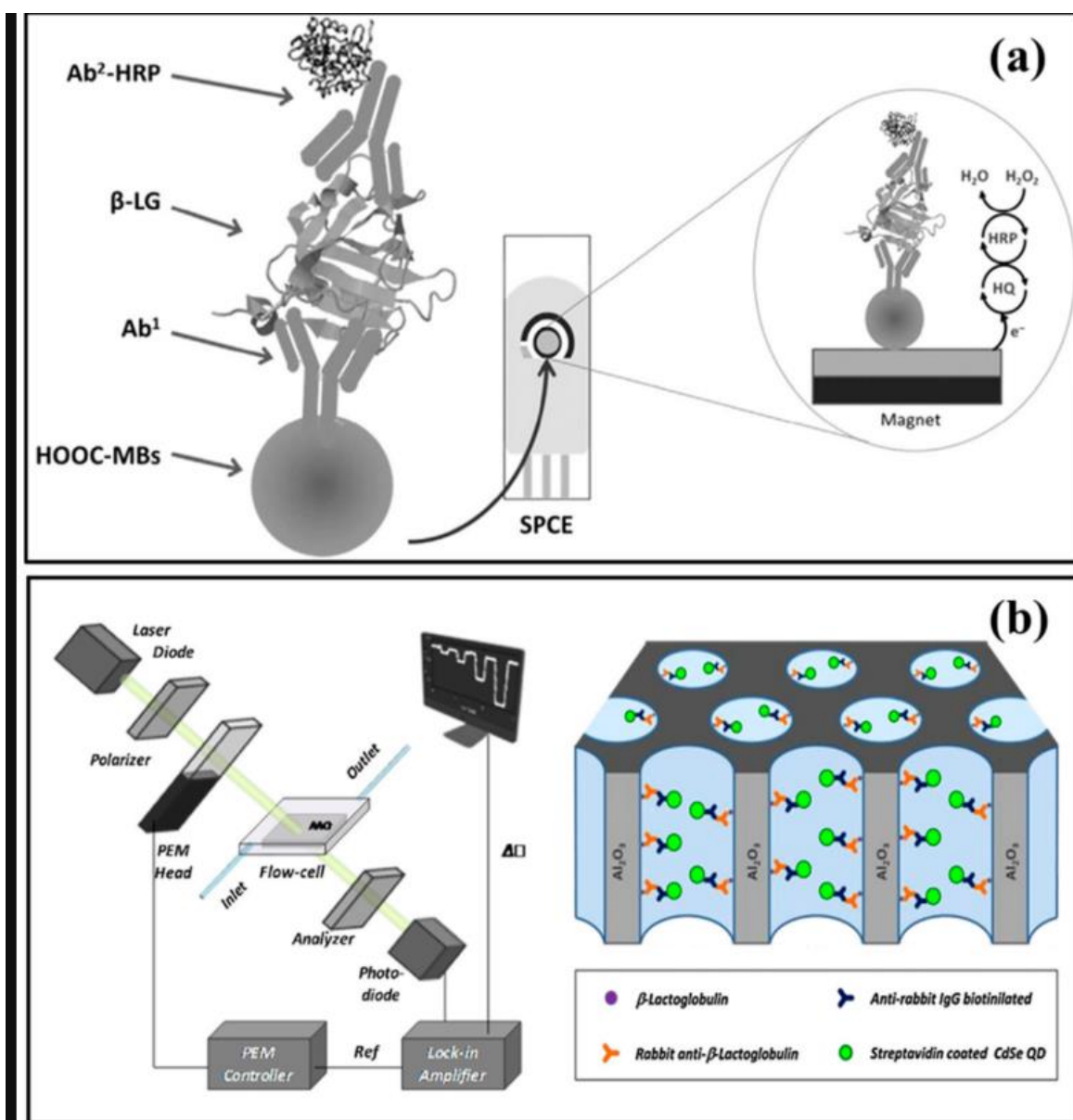
του μετατροπέα, τον χρησιμοποιούμενο βιοϋποδοχέα, και τον μηχανισμό ανίχνευσης (ηλεκτροχημικό, οπτικό, κ.λπ.) (Vasilescu, 2016).

Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα των βιομορίων με ομόλογες πρωτεΐνες στο γάλα όλων των μηρυκαστικών αποτελεί τον κύριο παράγοντα που επηρεάζει την απόδοση των βιοαισθητήρων. Το γάλα αγελάδας και βουβάλου παρουσιάζει παρόμοια σύσταση πρωτεϊνών, ενώ το πρόβειο και κατσικίσιο γάλα εμφανίζουν παρόμοιο πρότυπο με μειωμένο κλάσμα α-καζεΐνης. Το καμηλίσιο γάλα διαφέρει σημαντικά λόγω απουσίας β-λακτογλοβουλίνης. Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα των αντισωμάτων παρατηρήθηκε μεταξύ των πρωτεϊνών γάλακτος (καζεΐνες και β-λακτογλοβουλίνη) αγελάδας και άλλων ειδών (πρόβατο, κατσίκια, βούβαλος) αλλά όχι με τις πρωτεΐνες καμηλίσσιου γάλακτος. Ωστόσο, εξειδικευμένα απταμερή μπορούν να επιλύσουν το ζήτημα της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας (Mehannaoui, 2019).

Στα πειράματα με βιοαισθητήρες, η προετοιμασία του δείγματος αποτελεί κρίσιμο βήμα για την ανίχνευση αλλεργιογόνων γάλακτος, όπου η εξαγωγή του αναλύτη-στόχου πραγματοποιείται χωρίς καταστροφή από διάφορες τροφές. Για το νωπό γάλα, έρευνες επιβεβαίωσαν την ανίχνευση αλλεργιογόνων σε απλά δείγματα αραιωμένα με ρυθμιστικό διάλυμα. Φαίνεται ότι το κατάλληλο ποσοστό αραιώσης επιτρέπει καλά αποτελέσματα στην ανίχνευση αλλεργιογόνων πρωτεϊνών. Εναλλακτικά, ο διαχωρισμός πρωτεΐνης ορού από την καζεΐνη μέσω οζίνισης του αποβουτυρωμένου γάλακτος, ακολουθούμενος από θερμικό σοκ και φυγοκέντρωση, μπορεί να βελτιώσει την εκλεκτικότητα του βιοαισθητήρα (Eissa, 2012).

Αντίστοιχα, οι ανοσοαισθητήρες αξιοποιούν τις ανοσοχημικές αλληλεπιδράσεις αντισώματος-αντιγόνου (Ab-Ag) ως στοιχεία αναγνώρισης, με την ευαισθησία τους να εξαρτάται σημαντικά από την ποιότητα του αντισώματος και τον μηχανισμό μετατροπής σήματος (Εικόνα 5). Τα ανασυνδυασμένα αντισώματα προσφέρουν πλεονεκτήματα λόγω της δυνατότητας γενετικής τροποποίησής τους, παρέχοντας ευκολία ακινητοποίησης και εξαιρετική εκλεκτικότητα. Οι βιοαισθητήρες που συνδυάζουν την αρχή της ανοσοδοκιμασίας στερεάς φάσης με μαγνητικά σφαιρίδια (MBs) αποτελούν ιδανικά εργαλεία για την ακινητοποίηση μορίων όπως πρωτεΐνες (ένζυμα, αντισώματα, πεπτίδια) ή νουκλεϊκά οξέα. Η ερευνητική ομάδα του Pingarrón ανέπτυξε ηλεκτροχημικούς

μαγνητικούς ανοσοαισθητήρες τύπου σάντουιτς για την ανίχνευση των αλλεργιογόνων  $\beta$ -LG και  $\alpha$ -LA (Montiel, 2016). Η διαδικασία περιλαμβάνει την ομοιοπολική ακινητοποίηση επιλεγμένων αντισωμάτων σε MBs λειτουργικοποιημένα με καρβοξυλικές ομάδες μέσω αμιδικών δεσμών. Τα τροποποιημένα MBs επωάζονται με δείγματα για τη δέσμευση των στόχων και ακολουθεί αντίδραση συγγένειας με δευτερεύον αντίσωμα επισημασμένο με υπεροξειδάση. Η βιοαναγνώριση εξετάζεται αμπερομετρικά μέσω μαγνητικά συλλεγμένων MBs σε ηλεκτρόδιο άνθρακα, μετρώντας το ρεύμα αναγωγής μέσω του συστήματος υδροκινόνης HQ/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Montiel, 2016).



**Εικόνα 4** Οι πιο συνηθισμένοι ανοσοαισθητήρες για την ανίχνευση αλλεργιογόνων γάλακτος. (α) Μαγνητικός ανοσοαισθητήρας σάντουιτς β-LG (ανατυπώθηκε με άδεια από την αναφορά) και (β) σχηματική διάταξη οπτικής πολωσιμετρικής πλατφόρμας για τη μέτρηση της επιβράδυνσης φάσης εντός των μικροπορωδών μεμβρανών αλουμίνας που φέρουν ανοσοδοκιμασία για ανίχνευση β-LG (ανατυπώθηκε με άδεια από την αναφορά).

Τέλος, οι απαισθητήρες αποτελούν μια κατηγορία βιοαισθητήρων συγγένειας, στους οποίους τα απταμερή ακινητοποιούνται στην επιφάνεια ηλεκτροδίων και λειτουργούν ως βιοϋποδοχείς για την επιλεκτική δέσμευση του αναλύτη-στόχου. Το γεγονός της δέσμευσης οδηγεί σε μεταβολή του ηλεκτρικού ή οπτικού αναλυτικού σήματος στην επιφάνεια του μετατροπέα, επιτρέποντας την εύκολη παρακολούθησή του (Malkzad, 2017). Τα απταμερή αντικαθιστούν σταδιακά άλλα στοιχεία βιοαναγνώρισης, ιδιαίτερα τα αντισώματα παρόμοιας λειτουργικότητας, λόγω των σημαντικών πλεονεκτημάτων τους όσον αφορά τη σταθερότητα, την ευκολότερη και οικονομικότερη παραγωγή, τη μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και τις περισσότερες επιλογές τροποποίησης. Σε αντίθεση με τα αντισώματα, που παρουσιάζουν προβλήματα όπως ηθικά ζητήματα παραγωγής σε ζώα, χρονοβόρες διαδικασίες και υψηλό κόστος παρασκευής, τα απταμερή διακρίνονται για τη σταθερότητά τους σε ευρύ θερμοκρασιακό εύρος και την παραγωγή τους μέσω χημικών διεργασιών *in vitro*. Επιπλέον, ορισμένα απταμερή επιδεικνύουν υψηλότερη εξειδίκευση και συγγένεια για τη δέσμευση του στόχου συγκριτικά με τα αντισώματα (Sassolas, 2009).

## 4.2 ELISA

Η ενζυμο-συνδεδεμένη ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA – Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη βιοχημική τεχνική ανάλυσης, η οποία περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Eva Engvall και Peter Perlmann το 1971. Πρόκειται για μια ανοσοδοκιμασία στερεής φάσης που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της παρουσίας συνδετών (κυρίως πρωτεϊνών) σε υγρά δείγματα, χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα. Η βασική αρχή της ELISA περιλαμβάνει την ακινητοποίηση αντιγόνων από το προς ανάλυση δείγμα σε μια στερεή επιφάνεια και την επακόλουθη προσθήκη ειδικών αντισωμάτων συζευγμένων με ένζυμα. Μετά την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων αντισωμάτων, προστίθεται το υπόστρωμα του

ενζύμου, οδηγώντας σε μια ανιχνεύσιμη χρωματική μεταβολή που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αναλύτη (Shah, 2016).

Υπάρχουν τέσσερις βασικοί τύποι ELISA: η άμεση, η έμμεση, η τύπου σάντουιτς και η ανταγωνιστική. Στην άμεση ELISA, το αντιγόνο προσροφάται στην επιφάνεια και ανιχνεύεται απευθείας με επισημασμένο αντίσωμα. Η έμμεση ELISA χρησιμοποιεί δύο αντισώματα για αυξημένη ειδικότητα. Η ELISA τύπου σάντουιτς περιλαμβάνει τη "σύλληψη" του αντιγόνου μεταξύ δύο αντισωμάτων, ενώ η ανταγωνιστική ELISA βασίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ επισημασμένου και μη επισημασμένου αντιγόνου (Crowther, 2008).

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι ενζυμικοί δείκτες περιλαμβάνουν την υπεροξειδάση του χρένου (HRP) και την αλκαλική φωσφατάση, με υποστρώματα όπως TMB, ABTS και OPD που παράγουν χρωματικά προϊόντα. Η τεχνική έχει ευρεία εφαρμογή στην ιατρική διάγνωση, συμπεριλαμβανομένης της ανίχνευσης HIV και άλλων λοιμωδών νοσημάτων, στη βιομηχανία τροφίμων για την ανίχνευση αλλεργιογόνων, και στην τοξικολογία. Τα πλεονεκτήματα της ELISA περιλαμβάνουν την υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, την ευκολία αυτοματοποίησης και την ικανότητα ταυτόχρονης ανάλυσης πολλών δειγμάτων. Ωστόσο, η τεχνική απαιτεί προσεκτική βελτιστοποίηση των συνθηκών και κατάλληλους μάρτυρες για την αποφυγή ψευδώς θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων. Πρόσφατες εξελίξεις περιλαμβάνουν την ανάπτυξη της τεχνολογίας eSimoa, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση βιομορίων σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (MInc, 2020).

### 4.3 Συσκευές πλευρικής ροής (LFD)

Η δοκιμή πλευρικής ροής (LFT) ή συσκευή πλευρικής ροής (LFD) αποτελεί μια απλή ανοσοχρωματογραφική τεχνική που στοχεύει στην ανίχνευση συγκεκριμένων ουσιών σε υγρά δείγματα, χωρίς την ανάγκη εξειδικευμένου εξοπλισμού. Η μέθοδος βασίζεται στις ίδιες αρχές χρωματογραφίας συγγένειας με την τεχνική ELISA, όπου το υγρό δείγμα κινείται κατά μήκος μιας επιφάνειας με αντιδραστικά μόρια που παρέχουν

οπτικό αποτέλεσμα θετικό ή αρνητικό. Η αρχή λειτουργίας περιλαμβάνει μια σειρά από τριχοειδείς κλίνες, όπως πορώδεις χαρτί, μικροδομημένο πολυμερές ή πυροσυσσωματωμένο πολυμερές, που έχουν την ικανότητα αυθόρμητης μεταφοράς υγρών όπως ούρα, αίμα ή σάλιο. Το επίθεμα δείγματος λειτουργεί ως σπόγγος συγκρατώντας την περίσσεια υγρού, το οποίο στη συνέχεια ρέει προς το δεύτερο επίθεμα σύζευξης που περιέχει λυοφιλιωμένα βιο-ενεργά σωματίδια (συζεύγματα) σε μήτρα άλατος-σακχάρου (Koczula, 2016).

Οι LFDs μπορούν να λειτουργήσουν είτε ως ανταγωνιστικές είτε ως δοκιμασίες τύπου σάντουιτς. Στις ανταγωνιστικές δοκιμασίες, που χρησιμοποιούνται κυρίως για μικρούς αναλύτες, η απουσία γραμμής υποδεικνύει την παρουσία του αναλύτη. Αντίθετα, στις δοκιμασίες τύπου σάντουιτς, που προτιμώνται για μεγαλύτερους αναλύτες με πολλαπλές θέσεις δέσμευσης, η εμφάνιση γραμμής υποδηλώνει θετικό αποτέλεσμα. Η συγκεκριμένη τεχνολογία βρίσκει εκτεταμένες εφαρμογές στην ιατρική διάγνωση, συμπεριλαμβανομένων των τεστ εγκυμοσύνης και του ελέγχου για SARS-CoV-2 αλλά και στη βιομηχανία τροφίμων για την ανίχνευση αλλεργιογόνων. Τα κύρια πλεονεκτήματά της περιλαμβάνουν την ταχύτητα (αποτελέσματα σε 5-30 λεπτά), την οικονομική προσιτότητα και την απλότητα χρήσης. Ωστόσο, η ευαισθησία μπορεί να είναι μικρότερη συγκριτικά με εργαστηριακές μεθόδους, όπως φάνηκε στην περίπτωση των τεστ COVID-19 με ευαισθησία περίπου 70% το 2022 (Posthuma-Trumple, 2009). Περαιτέρω εξελίξεις στην τεχνολογία περιλαμβάνουν την ανάπτυξη ποσοτικών δοκιμασιών με τη χρήση ειδικών συσκευών ανάγνωσης και την ενσωμάτωση μαγνητικών σωματιδίων για βελτιωμένη ευαισθησία. Η συνεχής έρευνα στοχεύει στη βελτίωση των επιδόσεων και την επέκταση των εφαρμογών αυτής της απλής αλλά ισχυρής διαγνωστικής προσέγγισης (Posthuma-Trumple, 2009).

#### **4.4 Υγρή Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (LC-MS)**

Η υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS) αποτελεί μια εξελιγμένη αναλυτική τεχνική που συνδυάζει τις δυνατότητες φυσικού διαχωρισμού της υγρής χρωματογραφίας με τις ικανότητες ανάλυσης μάζας της φασματομετρίας μάζας. Η ιστορική εξέλιξη της τεχνικής ξεκίνησε τη δεκαετία του 1960 με τις πρωτοποριακές εργασίες του Victor Talrose και των συνεργατών του στη Ρωσία, οι οποίοι πρώτοι χρησιμοποίησαν τριχοειδείς σωλήνες για τη σύνδεση στήλης LC με πηγή ιονισμού ηλεκτρονίων. Η τεχνολογία LC-MS απαιτεί εξειδικευμένες διεπαφές για την αποτελεσματική μεταφορά των διαχωρισμένων συστατικών από τη στήλη LC στην πηγή ιόντων MS. Η εξέλιξη των διεπαφών περιλαμβάνει σημαντικά ορόσημα όπως τη διεπαφή κινούμενης ζώνης (MBI) που αναπτύχθηκε το 1977, τη διεπαφή άμεσης εισαγωγής υγρού (DLI) το 1980, και τη διεπαφή θερμοψεκασμού (TSP) που αναπτύχθηκε από τον Vestal και τους συνεργάτες του (Niessen, 2006).

Οι σύγχρονες διεπαφές βασίζονται κυρίως σε στρατηγικές ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης, με κυριότερες τον ηλεκτροψεκασμό (ESI) που αναπτύχθηκε το 1988 από τον Fenn, τον χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI), και τον φωτοϊονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (APPI) που αναπτύχθηκε το 2000. Στον τομέα της υγρής χρωματογραφίας, η πλέον διαδεδομένη παραλλαγή είναι η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, που χρησιμοποιεί μη πολική στατική φάση και πολική κινητή φάση. Οι συμβατικές στήλες LC έχουν μήκος 100-300 mm με εσωτερική διάμετρο 3,0-4,6 mm, ενώ για εφαρμογές LC-MS χρησιμοποιούνται συχνά βραχύτερες στήλες (30-50 mm) με σωματίδια διαμέτρου 3-5  $\mu\text{m}$  (Robb, 2000).

Η LC-MS έχει εκτεταμένες εφαρμογές στη φαρμακοκινητική, την πρωτεωμική/μεταβολομική και την ανάπτυξη φαρμάκων. Στην πρωτεωμική, τα σύγχρονα συστήματα LC-MS/MS μπορούν να ταυτοποιήσουν πάνω από 1000 πρωτεΐνες σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα. Πρόσφατα, η τεχνική έχει εφαρμοστεί στην αναζήτηση βιοδεικτών πεπτιδίων για σημαντικά παθογόνα του αναπνευστικού συστήματος και τον ιό SARS-CoV-2. Στη μεταβολομική, η LC-MS αποτελεί βασικό εργαλείο για την ανάλυση φυσικών προϊόντων και το προφίλ δευτερογενών μεταβολιτών σε φυτά. Η πρώτη εφαρμογή της στη φυτική μεταβολομική ήταν η ανίχνευση πολικών μεταβολιτών, ολιγοσακχαριτών και αμινοξέων από ιστούς φλοιώματος *Cucurbita maxima*. Τέλος, λόγω



των πλεονεκτημάτων της που περιλαμβάνουν την υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία καθώς επίσης και την ικανότητα ακριβούς διαχωρισμού και ταυτοποίησης των μορίων – στόχων μέσα σε σύνολο πολλαπλών ουσιών, χρησιμοποιείται και στη βιομηχανία τροφίμων για την ανίχνευση αλλεργιογόνων ουσιών και την προστασία των καταναλωτών (Holzapek, 2012).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΛΛΕΡΓΙΑ ΣΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ: ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ, ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Αναφέρεται ότι σήμερα, το 0.6% έως 3% των παιδιών ηλικίας κάτω των 6 ετών, το 0.3% των μεγαλύτερων παιδιών και εφήβων, και λιγότερο από το 0.5% των ενηλίκων πάσχουν από αλλεργία στο αγελαδινό γάλα, τον πιο κοινό τύπο αλλεργίας στο γάλα (Bu, 2013). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η πλειοψηφία των βρεφών με αλλεργία στο γάλα ξεπερνούν την αλλεργία τους και καθίστανται ικανά να καταναλώνουν γάλα και τα προϊόντα του, παρόλο που το 15% των προσβεβλημένων παιδιών παραμένουν αλλεργικά καθ' όλη την ενήλικη ζωή τους. Μία μελέτη αναφέρει ότι το 45% έως 50% των παιδιών ξεπερνούν την αλλεργία στο γάλα στην ηλικία του 1 έτους, το 60% έως 75% στην ηλικία των 2 ετών και το 85% έως 90% στα 3 έτη, αλλά οι μηχανισμοί που διέπουν την ανάπτυξη αυτής της φυσικής ανοχής δεν έχουν ακόμη πλήρως κατανοηθεί (Bu, 2013). Η ανάπτυξη της φυσικής ανοχής φαίνεται να αποδίδεται στην μείωση της IgE λόγω αποφυγής της πρόσληψης γάλακτος στα πρώιμα στάδια της ζωής ή στην παρουσία IgE έναντι κυρίως μορφολογικών επιτόπων (επιτρέποντας την κατανάλωση γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων), και όχι έναντι ακολουθιακών επιτόπων (Hochwallner, 2014).

Η διάγνωση της IgE-διαμεσολαβούμενης αλλεργίας στο γάλα, ξεκινά με παρατήρηση των κλινικών εκδηλώσεων και του ιατρικού ιστορικού, ακολουθούμενη από *in vitro* και *in vivo* διαγνωστικές εξετάσεις και δοκιμασίες πρόκλησης ανοσολογικής απόκρισης από το στόμα (Oral Food Challenge - OFC) και διπλά τυφλή ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο τροφική δοκιμασία (double-blind placebo-controlled food challenge - DBPCFC). Οι *in vitro* διαγνωστικές εξετάσεις περιλαμβάνουν τη μέτρηση της ειδικής IgE για αλλεργιογόνα γάλακτος στον ορό του αίματος (ImmunoCAP, Phadia AB). Η

δερματική δοκιμασία νυγμού (SPT – SkinPrickTest) εφαρμόζεται *in vivo* χρησιμοποιώντας ένα εμπορικό κλάσμα γάλακτος ή κλάσματα πρωτεϊνών γάλακτος που νύσσονται στην επιδερμίδα του ασθενούς, με αποτέλεσμα την εμφάνιση πομφού μεγαλύτερου από τον μάρτυρα εάν ο ασθενής έχει IgE έναντι αλλεργιογόνων γάλακτος. Οι δοκιμασίες πρόκλησης από το στόμα, όπως η DBPCFC ή η OFC, θεωρούνται οι μέθοδοι πρότυπο για τη σωστή διάγνωση των τροφικών αλλεργιών. Συνίστανται στην από του στόματος χορήγηση, σε διαφορετικές ημέρες, εικονικού φαρμάκου και προοδευτικά αυξανόμενων ποσοτήτων γάλακτος μέχρι την εμφάνιση παρατηρήσιμων (θετικό αποτέλεσμα) ή υποκειμενικών κλινικών συμπτωμάτων κατά τη 2η χορήγηση της ίδιας ποσότητας της προσβάλλουσας τροφής. Εάν η δοκιμασία πρόκλησης από το στόμα θεωρηθεί αρνητική (απουσία κλινικών συμπτωμάτων), συνιστάται στον ασθενή να επαναφέρει σταδιακά το γάλα στην καθημερινή διατροφή ακολουθώντας ένα συγκεκριμένο σχήμα (Fiocchi, 2010).

Η τρέχουσα θεραπεία για την αλλεργία στο γάλα με τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα, είναι η υιοθέτηση μιας δίαιτας αποκλεισμού. Ωστόσο, η τυχαία έκθεση σε πρωτεΐνες γάλακτος είναι επαναλαμβανόμενη, κυρίως επειδή αυτά τα αλλεργιογόνα είναι παρόντα σε μεγάλο αριθμό επεξεργασμένων τροφίμων, όπως προϊόντα κρέατος, προϊόντα ψαριού, επιδόρπια, αρτοσκευάσματα, μεταξύ άλλων. Σε αυτή την περίπτωση, η ιατρική θεραπεία περιλαμβάνει από του στόματος αντιισταμινικό για ήπιες δερματικές ή πεπτικές αντιδράσεις και αυτοεγχυτήρα επινεφρίνης για συστηματικές ή αναπνευστικές αντιδράσεις (Martorell-Aragonés, 2015). Πιο πρόσφατα, έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί ορισμένες στρατηγικές για την πρόκληση απευαισθητοποίησης ή ακόμη και ανοχής, σε διάφορα αλλεργιογόνα. Η ανοσοθεραπεία έχει προωθηθεί ως μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση, με στόχο την επίτευξη μιας μόνιμης κατάστασης ανοχής σε ευαισθητοποιημένα άτομα (Mousallem & Burks, 2012). Με βάση διαφορετικές οδούς χορήγησης (υποδόρια, υπογλώσσια και από του στόματος), ο ασθενής εκτίθεται καθημερινά σε αυξανόμενες δόσεις της τροφής που έχει σα στόχο η θεραπεία, για να προκληθεί ανοσοτροποποίηση και κατάσταση απευαισθητοποίησης. Πρόσφατες μελέτες που χρησιμοποιούν ανοσοθεραπεία έχουν προταθεί για την αλλεργία στο γάλα με ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Η ανοσοθεραπεία από του στόματος η οποία χρησιμοποιείται



σε μεγάλη συχνότητα, δείχνει ποσοστό επιτυχίας που κυμαίνεται από 37% έως 70% (Brozek, 2012).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΩΝ ΣΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ

Η αυξημένη ευαισθητοποίηση σχετικά με τις επιπτώσεις των τροφικών αλλεργιών στη δημόσια υγεία έχει καταστήσει επιτακτική την ανάγκη ανάπτυξης αναλυτικών μεθοδολογιών για τον έλεγχο της παρουσίας κρυφών αλλεργιογόνων συστατικών στα τρόφιμα, επιτρέποντας την επιβολή κανονισμών επισήμανσης (Taylor, 2014). Οι αλλεργικοί καταναλωτές εξαρτώνται πλήρως και πρέπει να προστατεύονται από τις πληροφορίες της ετικέτας των επεξεργασμένων τροφίμων. Ωστόσο, η ακούσια έκθεση σε κρυφά αλλεργιογόνα στα τρόφιμα λόγω εσφαλμένης επισήμανσης ή διασταυρούμενων μολύνσεων κατά την επεξεργασία τροφίμων συνιστά έναν πραγματικό κίνδυνο για αυτά τα άτομα (Costa, 2015). Οι πρωτεΐνες γάλακτος εφαρμόζονται συχνά ως βοηθητικοί παράγοντες στην τεχνολογία τροφίμων και, ως εκ τούτου, είναι παρούσες σε διάφορους τύπους τροφίμων ως συστατικό. Ωστόσο, λόγω της κοινής πρακτικής χρήσης κοινών γραμμών παραγωγής για την παρασκευή διαφορετικών συνταγών τροφίμων, είναι πολύ πιθανό να συμβούν τυχαίες διασταυρούμενες μολύνσεις. Για την αύξηση της ευεξίας και της ασφάλειας των ευαισθητοποιημένων ατόμων, τα προϊόντα διατροφής για ανθρώπινη κατανάλωση πρέπει να δηλώνουν όλα τα δυνητικά αλλεργιογόνα συστατικά ανεξάρτητα από την ποσότητά τους. Ως εκ τούτου, οι κατάλληλες και ιδιαίτερα ευαίσθητες αναλυτικές μεθοδολογίες αποτελούν απαραίτητα εργαλεία για τη διευκόλυνση της βιομηχανικής διαχείρισης των αλλεργιογόνων τροφίμων και, στη συνέχεια, για τη διευκόλυνση του ελέγχου/παρακολούθησης των αλλεργιογόνων από τις ρυθμιστικές αρχές (Costa, 2015).

Εμπορικό κιτ (μάρκα)	Μήτρα	Τύπος δοκιμής (αρ. καταλόγου)	Αναλυτικό εύρος	Όριο ανίχνευσης (LOD) (mg/kg)	Χρόνος εκτέλεσης
Veratox® for Total Milk (Neogen®, Lansing, Mich., Η.Π.Α.)	Προϊόντα που δεν περιέχουν γάλα (χυμοί, κρασί, σάλτσες)	Ποσοτική ELISA σάντουιτς (8470)	2,5 έως 25 mg/kg	1	30 λεπτά
RIDASCREEN® Fast Milk (r-Biopharm AG, Darmstadt, Γερμανία)	Αγελαδινό γάλα σε πρόβειο ή κατσικίσιο γάλα και τυρί	Ποσοτική ανταγωνιστική ELISA (R4652)	2,5 έως 67,5 mg/kg	0,7	30 λεπτά
ELISA Systems Casein (ELISA Systems™, Queensland, Αυστραλία)	Μη γαλακτοκομικά προϊόντα	Ημιποσοτική ELISA σάντουιτς (ESCASPRD-48)	1,0 έως 10 mg/kg	0,5	45 λεπτά
Veratox® for Casein Allergen (Neogen®)	Προϊόντα που δεν περιέχουν γάλα (χυμοί, κρασί, σάλτσες)	Ποσοτική ELISA σάντουιτς (8460)	2,5 έως 15 mg/kg	1	30 λεπτά
RIDASCREEN® Casein (r-Biopharm AG, Darmstadt, Γερμανία)	Παγωτό, κρασί, σοκολάτα, ροφήματα, βρεφικές φόρμουλες, αρτοσκευάσματα, λουκάνικα, κέικ, ψωμί	Ποσοτική ανταγωνιστική ELISA (R4652)	0,5 έως 13,5 mg/kg	0,12	30 λεπτά
ELISA Systems BLG (ELISA Systems™, Queensland, Αυστραλία)	Μη γαλακτοκομικά προϊόντα	Ημιποσοτική ELISA σάντουιτς (ESMRDBLG-48)	0,1 έως 1 mg/kg	0,05	45 λεπτά
BioKits BLG Assay Kit (Neogen®)	Τρόφιμα	Ποσοτική ELISA σάντουιτς (902061Y)	2,5 έως 40 mg/kg	2	120 λεπτά
RIDASCREEN® Fast β-LG (r-Biopharm AG, Darmstadt, Γερμανία)	Πρωτεΐνη ορού γάλακτος, προϊόντα που περιέχουν πρωτεΐνη ορού	Ποσοτική ανταγωνιστική ELISA (R4901)	0,5 έως 13,5 mg/kg	0,19	30 λεπτά

Εμπορικό κιτ (μάρκα)	Μήτρα	Τύπος δοκιμής (αρ. καταλόγου)	Αναλυτικό εύρος	Όριο ανίχνευσης (LOD) (mg/kg)	Χρόνος εκτέλεσης
	γάλακτος				
AgraQuant® β-LG (Romer Labs Div., Getzersdorf, Αυστρία)	Τρόφιμα	ELISA (COKAL1048)	0,01 έως 0,4 mg/kg	0,015	Μη αναφέρεται
AgraStrip® Total Milk (Romer Labs Div., Getzersdorf, Αυστρία)	Τρόφιμα	Συσκευή πλευρικής ροής (LFD) (COKAL2410AS)	1 έως 10000 mg/kg πρωτεΐνης γάλακτος, 3 έως 30000 mg/kg αποβουτυρωμένου γάλακτος σε σκόνη	1	Μη αναφέρεται
Reveal® 3-D for Total Milk Allergen (Neogen®)	Υγρά προϊόντα (χυμοί, σορμπέ)	LFD (8479)	5 έως 1000 mg/kg	5 έως 10	5 λεπτά
Reveal® for Total Milk (Neogen®)	Υγρά προϊόντα (χυμοί, σορμπέ)	LFD (8478)	Μη αναφέρεται	5	5 λεπτά
Bovine Total Milk Rapid Test (Elution Technologies, Colchester, Vt., Η.Π.Α.)	Μη αναφέρεται	LFD (MILK-1004)	1 έως 1000 mg/kg	1 έως 2	10 λεπτά
AgraStrip® Caseins (Romer Labs Div., Getzersdorf, Αυστρία)	Τρόφιμα	LFD (COKAL1210AS)	1 έως 10000 mg/kg	1	Μη αναφέρεται
Casein Lateral Flow IIR (MioBS, Yokohama, Ιαπωνία)	Επεξεργασμένα και μη επεξεργασμένα τρόφιμα	LFD	Μη αναφέρεται	5	25 λεπτά
Casein Lateral Flow Kit (Crystal Chem, Downers)	Ακατέργαστα και επεξεργασμένα τρόφιμα	LFD (M2202)	Μη αναφέρεται	5	15 λεπτά (εξαιρουμένης της εκχύλισης)

Εμπορικό κιτ (μάρκα)	Μήτρα	Τύπος δοκιμής (αρ. καταλόγου)	Αναλυτικό εύρος	Όριο ανίχνευσης (LOD) (mg/kg)	Χρόνος εκτέλεσης
Grove, Ill., H.P.A.)					
AgraStrip® β- LG (Romer Labs Div., Getzersdorf, Αυστρία)	Τρόφιμα				

Οι Deckwartetal., ανέπτυξαν 2 συστήματα (έμμεση και έμμεση σάντουιτς ELISA) για την ανίχνευση καζεϊνών σε λευκά και ερυθρά κρασιά, επιτυγχάνοντας LOD μεταξύ 10 και 200  $\mu\text{g/L}$ . Οι αναφερόμενες ευαισθησίες ήταν σύμφωνες με το όριο των 0,25  $\text{mg/L}$  που ζητήθηκε από τον OIV (Organisation Intl. de la Vigne et du Vin, Παρίσι, Γαλλία), όσον αφορά την παρουσία παραγόντων διαύγασης (καζεΐνες γάλακτος, ωοαλβουμίνη) στα κρασιά. Η εργασία τους κατέδειξε επίσης την επίδραση μιας σύνθετης μήτρας τροφίμων στην απόδοση αυτού του τύπου δοκιμής (Deckwart, 2014). Η ανάπτυξη 2 μορφών ELISA (έμμεσης ανταγωνιστικής και σάντουιτς) πραγματοποιήθηκε από τους de Luisetal. (2009) για την ανίχνευση της β-LG σε επεξεργασμένα τρόφιμα. Τα συστήματα ανταγωνιστικής και σάντουιτς ELISA, με LOD 0,5 και 0,05  $\text{mg/kg}$ , αντίστοιχα, ήταν σε θέση να ανιχνεύσουν μη αναφερόμενα στην ετικέτα συστατικά γάλακτος στο 14% των ελεγχθέντων εμπορικών προϊόντων που χρησιμοποιήθηκαν σα δείγματα. Ο τύπος σάντουιτς αποδείχθηκε πιο ειδική και ευαίσθητη επειδή επηρεάστηκε λιγότερο από τη μήτρα σε σύγκριση με την έμμεση ανταγωνιστική (Luis, 2009, Deckwart, 2014).

Επίσης, σε μία ενδελεχή και κριτική προσέγγιση των διαθέσιμων εμπορικών κιτ ELISA για την ανίχνευση αλλεργιογόνων του γάλακτος, οι Diaz-Amigoetal., επισημαίνουν διάφορες προκλήσεις στην επικύρωση και σύγκριση αυτών των δοκιμών. Η μελέτη αξιολόγησε τις επιδόσεις αρκετών κιτ στην ανίχνευση πρότυπου υλικού αναφοράς NIST SRM #1549 σε εμβολιασμένο αλεύρι σίτου και σε μπισκότα φυσιολογικού με

προσθήκη γάλακτος, επεξεργασμένα σε διαφορετικούς χρόνους. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν σημαντική μεταβλητότητα μεταξύ των κιτ ως προς την ικανότητα ανίχνευσης θερμικά επεξεργασμένων πρωτεϊνών γάλακτος, εν μέρει λόγω διαφορών στην εξειδίκευση των αντισωμάτων, όπως αποδείχθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης. Επιπλέον, η ασυνέπεια στις μονάδες αναφοράς, τα υλικά βαθμονόμησης και τα διαλύματα εκχύλισης δειγμάτων αναδείχθηκαν ως παράγοντες που συμβάλλουν στη μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων και δυσχεραίνουν την αξιολόγηση της ανάκτησης των αλλεργιογόνων. Η μελέτη τονίζει ότι η χρήση επιβαρυμένων (incurred) έναντι εμβόλιμων δειγμάτων μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ανάκτηση πρωτεϊνών λόγω μειωμένης διαλυτότητας κατά την επεξεργασία, υπονομεύοντας τον ποσοτικό χαρακτήρα των κιτ. Συνεπώς, η συγκεκριμένη μελέτη, υπογραμμίζει την ανάγκη για τυποποίηση των μονάδων αναφοράς, χρήση παραγόντων μετατροπής και ελεγχόμενη χρήση επιβαρυμένων δειγμάτων προκειμένου να διευκολυνθεί η επικύρωση και σύγκριση των εμπορικών κιτ ELISA για τον προσδιορισμό αλλεργιογόνων του γάλακτος σε τρόφιμα (Diaz-Amigo, 2010).

Οι Töröketal., διεξήγαγαν μια εμπειρισταωμένη διερεύνηση των παραγόντων που επηρεάζουν τα αναλυτικά αποτελέσματα που λαμβάνονται από τις μεθόδους ELISA για την ανίχνευση αλλεργιογόνων τροφίμων. Οι ερευνητές εφάρμοσαν μια αυστηρή μεθοδολογία που περιελάμβανε την ανάπτυξη καλά χαρακτηρισμένων, θερμικά επεξεργασμένων μοντέλων τροφίμων επιβαρυμένων με γλιαδίνη, πρωτεΐνες γάλακτος, αυγού ή σόγιας σε θεωρητική συγκέντρωση 50 ppm. Οι μήτρες αναλύθηκαν με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων κιτ δοκιμών ELISA και τα προκύπτοντα δεδομένα υποβλήθηκαν σε εις βάθος στατιστική ανάλυση. Η μελέτη αναγνώρισε τρεις πρωτεύοντες παράγοντες που συμβάλλουν σημαντικά στην αβεβαιότητα των αποτελεσμάτων ELISA: τον τύπο της μήτρας τροφίμων, το επίπεδο επεξεργασίας και τη συγκεκριμένη αναλυτική μέθοδο. Οι συγγραφείς απέδειξαν ότι οι τιμές ανάκτησης για κάθε μήτρα επηρεάστηκαν από την πρώτη ύλη και το επίπεδο επεξεργασίας σε διαφορετικό βαθμό. Αξιοσημείωτα, η ταυτόχρονη παρουσία πολλαπλών πηγών αλλεργιογόνων δεν επηρέασε σημαντικά τη μετρήσιμη συγκέντρωση. Ωστόσο, η θερμική επεξεργασία είχε τη μεγαλύτερη επίδραση στην ακρίβεια των ερευνηθέντων δοκιμών ELISA, με την έκταση της επίδρασης να

ποικίλλει ανάλογα με τη θερμική σταθερότητα των εξεταζόμενων πηγών πρωτεΐνης. Οι ερευνητές παρατήρησαν επίσης σημαντικές διαφορές στα αναλυτικά αποτελέσματα που ελήφθησαν από διαφορετικά κιτ ELISA, ακόμη και κατά την ανάλυση των ίδιων επιβαρυμένων μοντέλων μητρών που περιείχαν φυσικές πρωτεΐνες αλλεργιογόνων. Αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν τη σημασία της εναρμόνισης των αναλυτικών μεθόδων, της βελτίωσης της αναλυτικής απόδοσης και της επικύρωσης των μεθόδων για τη διασφάλιση αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Οι συγγραφείς καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι τα αξιολογημένα μοντέλα επιβαρυμένων τροφίμων και η παρουσιαζόμενη στατιστική μεθοδολογία φαίνεται να είναι κατάλληλα για την αναγνώριση των κύριων πηγών αναλυτικών σφαλμάτων και την εκτίμηση της έκτασης των επιπτώσεών τους στα αναλυτικά αποτελέσματα. Τα ευρήματά της συγκεκριμένης μελέτης, υπογραμμίζουν την ανάγκη για βελτιωμένες διεργασίες εκχύλισης πρωτεϊνών, ιδιαίτερα για δείγματα που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία, και τονίζουν τη σημασία των καλά χαρακτηρισμένων υλικών αναφοράς και των επικυρωμένων αναλυτικών μεθόδων για τη διασφάλιση της ασφάλειας των καταναλωτών με αλλεργία στα τρόφιμα (Torok, 2015).

Επίσης, η πρόσφατη μελέτη των Galan-Maloetal., αποτελεί μια εμπειριστατωμένη διερεύνηση της βελτιστοποίησης και αξιολόγησης μιας μεθόδου ανίχνευσης καταλοίπων πρωτεϊνών αυγού και γάλακτος σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα, συνδυάζοντας μια διαδικασία δειγματοληψίας με επίχρισμα (swabbing) με επακόλουθη ανάλυση με ανοσοπροσροφητική δοκιμασία στερεάς φάσης (ELISA) ή ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής (LFIA). Οι ερευνητές αξιολόγησαν μεθοδικά διάφορους παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας δειγματοληψίας, συμπεριλαμβανομένου του υλικού του επιχρίσματος, της σύνθεσης του ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης, του χρόνου και της θερμοκρασίας επώασης, καθώς και της ποσότητας του καταλοίπου αλλεργιογόνου στις επιφάνειες. Η μελέτη κατέδειξε ότι το υλικό του επιχρίσματος είχε σημαντικό αντίκτυπο στην ανάκτηση των αλλεργιογόνων, με το πολυστυρένιο να παρουσιάζει την υψηλότερη ικανότητα τόσο για τις πρωτεΐνες αυγού όσο και για τις πρωτεΐνες γάλακτος σε επιφάνειες από ανοξείδωτο χάλυβα και φορμάικα. Προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για την εκχύλιση των αλλεργιογόνων, με την προσθήκη ενός επιφανειοδραστικού (Tween-20) να βελτιώνει την

ανάκτηση των πρωτεϊνών αυγού. Διαδοχικά βήματα δειγματοληψίας αποκάλυψαν ότι η πλειονότητα των αλλεργιογόνων ανακτήθηκε στο πρώτο επίχρισμα, με ανίχνευση έως και 80% των πρωτεϊνών αυγού και 40% των πρωτεϊνών γάλακτος στο άθροισμα τριών δειγματοληψιών. Η απόδοση του πρωτοκόλλου δειγματοληψίας αξιολογήθηκε τόσο με τη μέθοδο ELISA όσο και με τη μέθοδο LFIA. Η ELISA επέδειξε ανώτερη ευαισθησία, ανιχνεύοντας μόλις 0,04 mg πρωτεΐνης αυγού και 0,16 mg σκόνης γάλακτος και στις δύο επιφάνειες, ενώ η LFIA απαιτούσε υψηλότερα επίπεδα αλλεργιογόνων για θετικά αποτελέσματα. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου δειγματοληψίας κυμάνθηκε από 18 έως 32% κατά μέσο όρο. Οι συγγραφείς καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η αναπτυχθείσα μέθοδος δειγματοληψίας, σε συνδυασμό με ανάλυση ELISA ή LFIA, παρέχει ένα αξιόπιστο εργαλείο για την επικύρωση των διαδικασιών καθαρισμού και την τακτική επαλήθευση της διασταυρούμενης μόλυνσης από αλλεργιογόνα στις εγκαταστάσεις παραγωγής τροφίμων. Συνιστούν αρχική επικύρωση με τη χρήση της πιο ευαίσθητης ELISA, ακολουθούμενη από τακτική παρακολούθηση με δοκιμές LFIA. Η μελέτη υπογραμμίζει τη σημασία της εφαρμογής τέτοιων αναλυτικών μεθόδων για τη βελτίωση της διαχείρισης του κινδύνου αλλεργιογόνων και τη μείωση της ανάγκης για προληπτική επισημάνση στη βιομηχανία τροφίμων (Galan-Malo, 2017). Στον Πίνακα 3 αναφέρονται συνοπτικά τα βασικότερα χαρακτηριστικά των μελετών που αναφέρθηκαν στην παρούσα παράγραφο.

**Πίνακας 3 Συγκριτικός Πίνακας Μελετών ELISA για την ανίχνευση αλλεργιογόνων**

Μελέτη	Έτος	Αντικείμενο Έρευνας	Μεθοδολογία	Βασικά Ευρήματα	Όρια Ανίχνευσης/Ευαισθησία	Σημαντικά Συμπεράσματα
Deckwarte tal.	2014	Ανίχνευση καζεϊνών σε κρασιά	- Έμμεση ELISA - Έμμεση σάντουιτς ELISA	- Επιτυχής ανίχνευση καζεϊνών σε λευκά και ερυθρά κρασιά - Επίδραση σύνθετης μήτρας στην απόδοση	LOD: 10-200 μg/L	- Συμβατότητα με όριο ΟΙV (0,25 mg/L) - Αποτελεσματική ανίχνευση παραγόντων διαύγασης



Μελέτη	Έτος	Αντικείμενο Έρευνας	Μεθοδολογία	Βασικά Ευρήματα	Όρια Ανίχνευσης/Ευαισθησία	Σημαντικά Συμπεράσματα
de Luisetal.	2009	Ανίχνευση β-LG σε επεξεργασμένα τρόφιμα	- Έμμεση ανταγωνιστική ELISA - Σάντουιτς ELISA	- Ανίχνευση μη αναφερόμενων συστατικών γάλακτος στο 14% των δειγμάτων - Υπεροχή μεθόδου σάντουιτς	- Ανταγωνιστική: 0,5 mg/kg - Σάντουιτς: 0,05 mg/kg	- Μέθοδος σάντουιτς πιο ειδική και ευαίσθητη - Μικρότερη επίδραση μήτρας στη μέθοδο σάντουιτς
Diaz-Amigoetal.	2010	Αξιολόγηση εμπορικών κιτ ELISA	- Σύγκριση διαφορετικών κιτ - Χρήση πρότυπου υλικού NIST - Εμβολιασμένα δείγματα	- Σημαντική μεταβλητότητα μεταξύ κιτ - Διαφορές στην εξειδίκευση αντισωμάτων - Επίδραση θερμικής επεξεργασίας	Ποικίλα ανάλογα με το κιτ	- Ανάγκη τυποποίησης μονάδων αναφοράς - Σημασία επιβαρυνμένων έναντι εμβόλιμων δειγμάτων
Töröketal.	2015	Διερεύνηση παραγόντων που επηρεάζουν ELISA	- Ανάπτυξη μοντέλων - Στατιστική ανάλυση - Πολλαπλά αλλεργιογόνα	- Τρεις κύριοι παράγοντες επίδρασης: 1. Τύπος μήτρας 2. Επίπεδο επεξεργασίας 3. Αναλυτική μέθοδος	50 ppm (θεωρητική συγκέντρωση)	- Σημαντική επίδραση θερμικής επεξεργασίας - Ανάγκη βελτίωσης εκχύλισης πρωτεϊνών
Galan-Maloetal.	2017	Ανίχνευση καταλοίπων σε επιφάνειες	- Δειγματοληψία με επίχρισμα - Συνδυασμός ELISA και	- Υπεροχή πολυστυρενίου ως υλικού - Βελτίωση με Tween-20	ELISA: - 0,04 mg (αυγό) - 0,16 mg (γάλα) - LFIA: υψηλότερα όρια	- Συνιστάται αρχική επικύρωση με ELISA - Τακτική παρακολούθηση με LFIA

Μελέτη	Έτος	Αντικείμενο Έρευνας	Μεθοδολογία	Βασικά Ευρήματα	Όρια Ανίχνευσης/Ευαισθησία	Σημαντικά Συμπεράσματα
			LFIA - Βελτιστοποίηση συνθηκών	- Ανάκτηση στο πρώτο επίχρισμα		

## 6.2 Συσκευές πλευρικής ροής –LFD και βιοαισθητήρες

Οι LFD είναι επίσης ταχείες και ειδικές ανοσοχημικές μέθοδοι οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση αλλεργιογόνων. Παρά το γεγονός ότι η αρχή λειτουργίας τους είναι παρόμοια με αυτή της ELISA, οι LFD προσφέρουν απλούστερη και ταχύτερη εκτέλεση με ποιοτικά ή ημιποσοτικά αποτελέσματα που μπορούν να ερμηνευθούν οπτικά (Courtney, 2016). Ωστόσο, η έλλειψη ποσοτικής πληροφορίας και η ευαισθησία τους στην παροχή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων αποτελούν σημαντικά μειονεκτήματα που σχετίζονται με τη χρήση τους. Παρά τους περιορισμούς αυτούς, οι LFD βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων για την παρακολούθηση του καθαρισμού του εξοπλισμού επεξεργασίας τροφίμων και της μόλυνσης των προϊόντων διατροφής (Courtney, 2016). Σήμερα, υπάρχουν αρκετά εμπορικά διαθέσιμα κιτ LFD που επιτρέπουν την ανίχνευση αλλεργιογόνων γάλακτος σε προϊόντα διατροφής σε λίγα λεπτά και επί τόπου, με όρια ανίχνευσης (LOD) που φτάνουν έως και 0,5 mg/L.

Οι βιοαισθητήρες θεωρούνται αναδυόμενα εργαλεία για την ανίχνευση αλλεργιογόνων, καθώς αποτελούν ταχείες, επαναλήψιμες και εξαιρετικά ευαίσθητες προσεγγίσεις με μεγάλες δυνατότητες πλήρους αυτοματοποίησης (Costa, 2017). Συνοπτικά, οι βιοαισθητήρες βασίζονται στην άμεση αναγνώριση μιας βιολογικής αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός υποδοχέα (αντισώματος ή ανιχνευτή) και ενός μορίου-στόχου (πρωτεΐνης ή DNA) μέσω ενός μετατροπέα που παράγει ένα μετρήσιμο σήμα (Costa, 2017). Αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί με τη χρήση ανοσοαισθητήρων επιφανειακού συντονισμού πλασμονίων (SPR–Surface Plasmon Resonance) για την ανίχνευση αλλεργιογόνων γάλακτος σε διάφορες μήτρες τροφίμων, επιτυγχάνοντας ευαισθησίες από 1 ng/L έως 0,12 mg/mL. Επιπλέον, για την ανίχνευση πρωτεϊνών

γάλακτος έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί και ηλεκτροχημικοί ανοσοαισθητήρες (Ruiz-Valdepeñas, 2016).

Οι Eissa et al. (2012) ανέπτυξαν έναν ανοσοαισθητήρα ικανό να ανιχνεύει έως και 0,85 pg/mL β-λακτογλοβουλίνης (β-LG) σε προϊόντα διατροφής, το οποίο αποτελεί το χαμηλότερο LOD που έχει αναφερθεί για αυτήν την πρωτεΐνη από ηλεκτροχημικούς ανοσοαισθητήρες. Ωστόσο, δεδομένου ότι αυτά τα συστήματα βασίζονται στη βιολογική αλληλεπίδραση μεταξύ ενός αντισώματος και της αντίστοιχης πρωτεΐνης αλλεργιογόνου/δείκτη, απαιτείται πάντα προσεκτική ερμηνεία για την αποφυγή ψευδώς θετικών ή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων (Eissa, 2012).

Οι Ashley et al., περιγράφουν τη σύνθεση και αξιολόγηση νανοσωματιδίων μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών (nanoMIPs) ως συνθετικών υποδοχέων για την ανίχνευση της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης α-καζεΐνης σε εφαρμογές βιοαισθητήρων επιφανειακού συντονισμού πλασμονίων (SPR). Τα nanoMIPs παρασκευάστηκαν μέσω μιας διεργασίας αποτύπωσης συμπαγούς φάσης χρησιμοποιώντας α-καζεΐνη προσαρτημένη σε γυάλινα σφαιρίδια ως πρότυπο. Οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) και ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM) για τον χαρακτηρισμό της μορφολογίας και του μεγέθους των nanoMIPs, ενώ η συγγένεια πρόσδεσης προσδιορίστηκε μέσω δοκιμών πρόσδεσης SPR, αποκαλύπτοντας σταθερές διάστασης στη νανομοριακή κλίμακα ( $\sim 10 \times 10^{-9}$  M). Για την ανάπτυξη του βιοαισθητήρα, τα nanoMIPs ακινητοποιήθηκαν σταθερά σε επιφάνειες αισθητήρων χρυσού SPR μέσω σύζευξης αμίνης, επιτρέποντας την ανίχνευση χωρίς σήμανση της α-καζεΐνης. Ο προκύπτων βιοαισθητήρας επέδειξε εντυπωσιακή ευαισθησία, επιτυγχάνοντας όριο ανίχνευσης (LOD)  $127 \pm 97.6$  ng ml<sup>-1</sup> (0.127 ppm), το οποίο υπερτερεί σημαντικά των υφιστάμενων εμπορικά διαθέσιμων κιτ ELISA. Επιπλέον, ο αισθητήρας nanoMIP επέδειξε εξαιρετική εκλεκτικότητα για την α-καζεΐνη έναντι άλλων πρωτεϊνών γάλακτος όπως η β-λακτοσφαιρίνη (BLG) και η αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA). Για να αξιολογήσουν την απόδοση του αισθητήρα σε πραγματικές συνθήκες, οι ερευνητές ανέλυσαν δείγματα νερού πλύσης του συστήματος καθαρισμού στη θέση (CIP) που ενισχύθηκαν με α-καζεΐνη. Μετά από προκαταρκτική επεξεργασία του δείγματος

μέσω χρωματογραφίας διήθησης πηκτής με στήλες περιστροφής G-25, ο βιοαισθητήρας απέδωσε ανακτήσεις που κυμαίνονταν από 87% έως 120%, επιβεβαιώνοντας την καταλληλότητά του για εφαρμογές παρακολούθησης αλλεργιογόνων σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων (Ashley, 2018).

Οι Sena-Torralba et al.(2022) παρουσίασαν μια καινοτόμο μεθοδολογία για την ταυτόχρονη και αξιόπιστη ποσοτικοποίηση ιχνών αλλεργιογόνων αμυγδάλου και φιστικιού σε εμπορικά τρόφιμα, βασιζόμενοι σε μια πρωτότυπη διάταξη πλευρικής ροής μικροανοσοπροσδιορισμού (LFμΙΑ) με ενσωματωμένο μικροπίνακα έως και 36 σημείων σε μία μόνο ταινία. Η μελέτη αποσκοπούσε στην αντιμετώπιση των περιορισμών των παραδοσιακών μεθόδων ανίχνευσης αλλεργιογόνων, όπως η φασματομετρία μάζας και η ELISA, παρέχοντας ημι-ποσοτικές πληροφορίες σχετικά με τα επίπεδα των αλλεργιογόνων, θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες, εσωτερική βαθμονόμηση και αξιολόγηση του φαινομένου αγκίστρου, σε μια ενιαία δοκιμασία. Η προτεινόμενη μεθοδολογία LFμΙΑ αξιολογήθηκε διεξοδικά ως προς την ευαισθησία, την εκλεκτικότητα και την ακρίβεια, επιδεικνύοντας όρια ανίχνευσης 185 και 229  $\mu\text{g/kg}$  για τα αλλεργιογόνα αμυγδάλου και φιστικιού αντίστοιχα, εκλεκτικότητα 77% και ακρίβεια με σχετική τυπική απόκλιση (RSD) 5-25% κατά την ανάλυση εμπορικών τροφίμων ύποπτων για αλλεργιογόνα. Η καινοτομία της μελέτης έγκειται στην ενσωμάτωση πολλαπλών στοιχείων στη μικροσυστοιχία που παρέχουν κρίσιμες πληροφορίες για τη δοκιμασία, απλοποιώντας την ερμηνεία των αποτελεσμάτων από μη εξειδικευμένους τελικούς χρήστες. Συγκεκριμένα, η συμπερίληψη επαναλήψεων αρνητικών και θετικών μαρτύρων επιτρέπει τον γρήγορο εντοπισμό ψευδώς αρνητικών ή θετικών αποτελεσμάτων, ενώ ο έλεγχος του φαινομένου αγκίστρου αποδεικνύεται χρήσιμος για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών αμυγδάλου και φιστικιού. Επιπλέον, η εσωτερική βαθμονόμηση σήματος αποτελεί μια ιδιαίτερα ακριβή, ταχύτερη και οικονομικότερη προσέγγιση για την ποσοτικοποίηση των δοκιμασιών σε σύγκριση με τη συμβατική εξωτερική βαθμονόμηση. Συνολικά, η μελέτη των Sena-Torralba et al. (2022) και η προτεινόμενη μέθοδος LFD, αντιπροσωπεύει μια σημαντική πρόοδο στον τομέα της ανίχνευσης αλλεργιογόνων τροφίμων, προτείνοντας μια απλή, υψηλά εκλεκτική και εξαιρετικά ευαίσθητη βιοαισθητηριακή πλατφόρμα με άμεση

εμπορική σημασία για την ποσοτικοποίηση αλλεργιογόνων σε δείγματα τροφίμων (Sena-Torralba, 2022).

Οι Alhammadietal. (2022) ανέπτυξαν ανοσοχρωματογραφική δοκιμασία πλευρικής ροής (LFIA – Lateral Flow Immunochromatographic Assay) με υψηλή ευαισθησία για την ταχεία και επιτόπια ανίχνευση του κτηνιατρικού αντιβιοτικού ενροφλοξασίνης (ENR) σε δείγματα γάλακτος, χρησιμοποιώντας χρυσά νανοσωματίδια (AuNPs) συζευγμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα anti-enrofloxacin (ENR-Ab). Η ENR είναι ένα αντιβιοτικό φθοριοκινολόνης που χρησιμοποιείται ευρέως στην κτηνοτροφία και την υδατοκαλλιέργεια, αλλά η παρουσία υπολειμμάτων της στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρούς κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία, καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη για ευαίσθητες και αποτελεσματικές μεθόδους ανίχνευσης. Οι ερευνητές εφάρμοσαν μια συστηματική προσέγγιση για τη βελτιστοποίηση πολλαπλών παραμέτρων των ταινιών δοκιμής LFIA, συμπεριλαμβανομένης της συγκέντρωσης ENR-Ab, των ρυθμιστικών διαλυμάτων αποκλεισμού και έκπλυσης και του pH. Αυτή η ενδεδειγμένη βελτιστοποίηση οδήγησε στην επίτευξη ενός οπτικού ορίου ανίχνευσης (vLOD) 20 ng/ml και μιας τιμής cut-off 50 ng/ml σε δείγματα γάλακτος, τιμές που βρίσκονται εντός των οδηγιών ορίων ασφαλείας του Υπουργείου Τροφίμων και Φαρμάκων της Νότιας Κορέας. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της πειραματικής δοκιμασίας, επέδειξαν αμελητέα διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με ανάλογα της ENR και άλλα αντιβιοτικά, υποδηλώνοντας υψηλή εξειδίκευση. Ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό αυτής της μελέτης είναι η ενσωμάτωση πολλαπλών μαρτύρων ελέγχου ποιότητας εντός της διάταξης μικροσυστοιχιών της ταινίας LFIA. Οι αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες, σε συνδυασμό με τον έλεγχο του φαινομένου αγκίστρου, επιτρέπουν τον γρήγορο εντοπισμό ψευδώς αρνητικών/θετικών αποτελεσμάτων και παρέχουν ημι-ποσοτικές πληροφορίες σχετικά με τις συγκεντρώσεις ENR. Επιπλέον, η ενσωμάτωση εσωτερικής βαθμονόμησης σήματος αποδείχθηκε μια ιδιαίτερα ακριβής, ταχύτερη και οικονομικότερη προσέγγιση για την ποσοτικοποίηση των δοκιμασιών σε σύγκριση με τη συμβατική εξωτερική βαθμονόμηση. Η αναπτυχθείσα μέθοδος LFIA δίνει τη δυνατότητα για την οπτική ανάγνωση των αποτελεσμάτων εντός 10 λεπτών χωρίς την ανάγκη ειδικού εξοπλισμού, καθιστώντας την κατάλληλη για γρήγορη και επιτόπια

ανίχνευση υπολειμμάτων ENR. Με εκτιμώμενο κόστος 1€ ανά δοκιμασία, η προτεινόμενη βιοαισθητηριακή πλατφόρμα έχει άμεση εμπορική σημασία για τον ποιοτικό προσδιορισμό αντιβιοτικών σε δείγματα τροφίμων (Ahmmadi, 2022).

Οι Kilicetal. (2020) παρουσίασαν μια πρωτοποριακή μελέτη σχετικά με την ανάπτυξη ενός υψηλά ευαίσθητου, βολταμμετρικού βιοαισθητήρα χωρίς σήμανση για την ανίχνευση της α-λακταλβουμίνης (α-LB), μιας κύριας αλλεργιογόνου πρωτεΐνης που ανευρίσκεται στο αγελαδινό γάλα. Οι συγγραφείς εφαρμόζουν μια καινοτόμο προσέγγιση βασισμένη στην ηλεκτροπολυμερισμό του πολυπυρρολίου (PPy) για την παγίδευση αντισωμάτων α-LB σε τυπωμένα ηλεκτρόδια χρυσού (AuSPEs), επιτρέποντας την ειδική δέσμευση της α-LB. Η απόδοση του αισθητήρα αξιολογείται μέσω μετρήσεων διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας (DPV) του ρεύματος οξειδωτικής κορυφής του οξειδοαναγωγικού ιχνηθέτη  $K_3[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ . Η μελέτη βελτιστοποίησε με ακρίβεια κρίσιμες παραμέτρους που επηρεάζουν την απόδοση του βιοαισθητήρα, συμπεριλαμβανομένου του συντελεστή αραίωσης αντισώματος, του αριθμού κύκλων ηλεκτροπολυμερισμού, της θερμοκρασίας επώασης αντιγόνου και του χρόνου. Η απεικόνιση με μικροσκοπία φθορισμού χρησιμοποιείται καινοτόμα για τον χαρακτηρισμό της επιφάνειας του αισθητήρα, επιδεικνύοντας την επιτυχή παγίδευση των αντισωμάτων εντός της μήτρας PPy. Αυστηρές μελέτες εκλεκτικότητας επιβεβαιώνουν την ειδικότητα του βιοαισθητήρα ως προς την α-LB, με αμελητέα παρεμβολή από μη ειδικές πρωτεΐνες όπως η ανθρώπινη αλβουμίνη ορού ή η ανοσοσφαιρίνη G (IgG). Η προτεινόμενη μεθοδολογία, επέδειξε ένα εξαιρετικά χαμηλό όριο ανίχνευσης 192,2 pg/mL, ξεπερνώντας την ευαισθησία των εμπορικά διαθέσιμων κιτ ELISA και άλλων οπτικών μεθόδων κατά 10 έως 105 φορές. Επιπλέον, ο αισθητήρας επιδεικνύει εξαιρετική απόδοση σε σύνθετα πραγματικά δείγματα, ποσοτικοποιώντας με ακρίβεια την α-LB σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα με ποσοστά ανάκτησης που κυμαίνονται από 93,1 έως 97,0%. Ο χρόνος ανάλυσης είναι αξιοσημείωτα σύντομος, απαιτώντας μόνο 1,5 ώρα, καθιστώντας τον μια ταχεία και αποτελεσματική εναλλακτική λύση έναντι των υφιστάμενων μεθοδολογιών. Η ανάπτυξη αυτού του βολταμμετρικού βιοαισθητήρα χωρίς σήμανση αποτελεί σημαντική πρόοδο στον τομέα της ανίχνευσης αλλεργιογόνων τροφίμων (Kilic, 2020).



Οι Chinnasamy et al. (2014) παρουσίασαν μια πρωτότυπη διάταξη μικροσυστοιχίας πλευρικής ροής (Lateral Flow Microarray-LFM) για την ταχεία και ολοκληρωμένη διάγνωση αλλεργίας στα γαλακτοκομικά προϊόντα, συνδυάζοντας την τεχνολογία των πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών με τη μικρορρευστονική σε χαρτί και τη χρήση πολυλειτουργικών νανοσωματιδίων χρυσού. Η προτεινόμενη προσέγγιση αντιμετωπίζει τους περιορισμούς των παραδοσιακών μεθόδων, όπως η φασματομετρία μάζας και η ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA), που απαιτούν περίπλοκο εξοπλισμό, μεγάλους χρόνους ανάλυσης και σημαντικό κόστος ανά εξέταση. Η μεθοδολογία περιλαμβάνει την ανάπτυξη νανοσωματιδίων χρυσού (GNPs) διπλής επισήμανσης με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης E (anti-IgE) και το ένζυμο υπεροξειδάση (HRP) για ενισχυμένη ενίσχυση σήματος. Οι βελτιστοποιημένες αναλογίες σύζευξης HRP:anti-IgE επέτρεψαν σημαντική ενζυματική ενίσχυση για τη βελτίωση της ευαισθησίας της δοκιμασίας σε σύγκριση με τα εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια ανίχνευσης. Η διαδικασία LFM περιλαμβάνει τη ροή του δείγματος μέσω μιας μεμβράνης νιτροκυτταρίνης που φέρει πίνακα 15 αλλεργιογόνων, ακολουθούμενη από βήματα πλύσης, επώασης με τα GNPs διπλής επισήμανσης και προσθήκης υποστρώματος TMB για ενίσχυση των σημάτων των αλλεργιογόνων. Η προτεινόμενη διάταξη LFM αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας ένα σύνολο 35 προ-χαρακτηρισμένων κλινικών δειγμάτων ορού και συγκρίθηκε με τη μέθοδο αναφοράς ImmunoCAP. Η μέση μεταβλητότητα μεταξύ των δοκιμών της ανάλυσης LFM ήταν 12% CV, και η ανάλυση της ομάδας των κλινικών δειγμάτων αποκάλυψε καλή γενική συμφωνία με την ImmunoCAP, αν και με μεταβλητή απόδοση μεταξύ των αλλεργιογόνων ( $AUC = [0,54-0,88]$ , κατώφλι 1 kU). Η ικανοποιητική αναλυτική απόδοση, σε συνδυασμό με την ταχεία και απλή διαδικασία, τα φθηνά υλικά και την ανάγνωση των αποτελεσμάτων μέσω ενός σαρωτή ή smartphone, καθιστούν την προτεινόμενη μέθοδο μια ενδιαφέρουσα οικονομική εναλλακτική λύση έναντι των υφιστάμενων πολυπαραμετρικών μεθόδων όταν κατώφλια  $>1$  kU είναι αποδεκτά (Chinnasamy, 2014).

Η μελέτη των Chen et al. (2017) περιγράφει την ανάπτυξη και αξιολόγηση μιας ανταγωνιστικής ανοσοδοκιμασίας πλευρικής ροής (LFA –Lateral Flow Immunoassay) που χρησιμοποιεί φθορίζοντα μικροσφαιρίδια (FM) ως τρόπο σήμανσης για την ταχεία και



ποσοτική ανίχνευση της καζεΐνης, ενός αλλεργιογόνου πρωτεΐνης του γάλακτος, σε αποβουτυρωμένο γάλα. Η προτεινόμενη μέθοδος απευθύνεται στην ανάγκη ανάπτυξης γρήγορων, ευαίσθητων και εύχρηστων εναλλακτικών λύσεων έναντι των συμβατικών τεχνικών, όπως η υγρή χρωματογραφία και η ELISA, για τον έλεγχο της ασφάλειας των τροφίμων. Τα FMs τροποποιημένα με καρβοξύλιο συζεύχθηκαν ομοιοπολικά με πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της καζεΐνης (anti-caseinAb) για το σχηματισμό συμπλόκων αντισώματος-FMs. Η μέθοδος FMs-LFA επέδειξε όριο ανίχνευσης (LOD) 100 ng/ml με καλό γραμμικό εύρος από 100 έως 10.000 ng/ml. Οι μέσες ανακτήσεις για ενδο- και δια-δοκιμαστικές αναλύσεις κυμάνθηκαν από 89,03% έως 93,47% και από 87,69% έως 92,73%, αντίστοιχα, με αντίστοιχους συντελεστές διακύμανσης (CV) 5,2-7,8% και 6,2-8,5%. Το LOD και ο CV της FMs-LFA ήταν χαμηλότερα από εκείνα της LFA με κολλοειδή σωματίδια χρυσού (CG-LFA) για την ποσοτική ανίχνευση καζεΐνης. Η FMs-LFA επέδειξε επίσης υψηλή εξειδίκευση, χωρίς διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με λυσοζύμη, β-λακτοσφαιρίνη, αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA) και ωοαλβουμίνη (OVA). Συγκρινόμενη με μια εμπορική μέθοδο ELISA, η FMs-LFA παρείχε συγκρίσιμα αποτελέσματα για την ανίχνευση δειγμάτων γάλακτος, αλλά με σημαντικά μειωμένο χρόνο ανάλυσης (20 λεπτά έναντι 3-4 ωρών) και χαμηλότερο LOD (100 ng/ml έναντι 240 ng/ml). Η εφαρμοσιμότητα της ταινίας δοκιμής στην ανάλυση πραγματικών δειγμάτων επιβεβαιώθηκε με ανακτήσεις 88,9-106,6% για τρία είδη εμβολιασμένου γάλακτος (Cheng, 2017).

Η μελέτη των Rossetal. (2019) παρέχει μια ολοκληρωμένη προσπάθεια σύγκρισης μεταξύ ανοσοπροσδιορισμών διήθησης και πλευρικής ροής για την οπτική και βασισμένη σε smartphone ανίχνευση πολλαπλών αλλεργιογόνων τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των φιστικιών και των γαλακτοκομικών προϊόντων. Μέσα στα πλαίσια της έλλειψης παγκοσμίως τυποποιημένης νομοθεσίας σήμανσης αλλεργιογόνων, η οποία καθιστά επιτακτική την ανάγκη για εύχρηστες, ταχείες, ευαίσθητες και εύρωστες συσκευές ελέγχου πολλαπλών δεικτών προσανατολισμένες στον καταναλωτή, η παρούσα έρευνα αποσκοπεί στην ανάπτυξη και αξιολόγηση τριών διαφορετικών μορφών ανοσοπροσδιορισμών για την ταυτόχρονη ανίχνευση αλλεργιογόνων. Εξετάστηκαν ανοσοπροσδιορισμοί διήθησης ενεργής και παθητικής ροής, καθώς και

ανοσοχρωματογραφικοί προσδιορισμοί πλευρικής ροής (LFIA) με διαφορετικές διαμορφώσεις στη διαδικασία δοκιμής. Ο ταχύτερος χρόνος ανάλυσης ήταν 1 λεπτό, ενώ ακόμη και ο βραδύτερος προσδιορισμός ήταν εντός 10 λεπτών. Με την παθητική προσέγγιση ροής, επιτεύχθηκαν όρια ανίχνευσης (LOD) 0,1 και 0,5 ppm για την ολική πρωτεΐνη φουντουκιού (THP) και την αλβουμίνη (ALB) σε εμποτισμένο ρυθμιστικό διάλυμα ή 1 και 5 ppm THP και ALB σε εμποτισμένη μήτρα. Συγκριτικά, η προσέγγιση ενεργής ροής έφτασε LODs 0,05 ppm και για τους δύο αναλύτες σε ρυθμιστικό διάλυμα και 0,5 και 1 ppm THP και ALB σε εμποτισμένη μήτρα. Η βελτιστοποιημένη διαμόρφωση LFIA έφτασε LODs 0,1 και 0,5 ppm THP και ALB σε εμποτισμένο ρυθμιστικό διάλυμα ή 0,5 ppm και για τους δύο αναλύτες σε εμποτισμένη με το δείγμα μήτρα. Το βελτιστοποιημένο LFIA επικυρώθηκε δοκιμάζοντας 20 διαφορετικά τυφλά και εμβολιασμένα δείγματα μήτρας. Χρησιμοποιώντας ανεξάρτητο της συσκευής χρωματικό χώρο για ανάλυση μέσω smartphone, εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικά μοντέλα smartphone για την ανάλυση των βελτιστοποιημένων προσδιορισμών. Τα αποτελέσματα υπογραμμίζουν τη σημασία της επιλογής της κατάλληλης μεθόδου επεξεργασίας δεδομένων για την ποιότητα των ημι-ποσοτικών πληροφοριών που μπορούν να ληφθούν από τα ακατέργαστα αποτελέσματα (Ross, 2019).

Γενικά, οι ανοσοπροσδιορισμοί είναι σε θέση να ανιχνεύσουν τις κύριες αλλεργιογόνες πρωτεΐνες του γάλακτος, όπως η α-λακταλβουμίνη (ALA) και η β-LG, σε μια ευρεία ποικιλία μητρών τροφίμων. Ωστόσο, εξακολουθούν να απουσιάζουν πληροφορίες σχετικά με την ανάπτυξή τους για τον προσδιορισμό της παρουσίας υδρολυμένων πρωτεϊνών γάλακτος σε τρόφιμα, καθώς συχνά διατηρούν την ανοσοαντιδραστικότητά τους. Ωστόσο δεν υπάρχουν έχουν διεξαχθεί για την αξιολόγηση της ανοσοαντιδραστικότητας καθαρών υδρολυμάτων ορού γάλακτος και καζεΐνης, αλλά χωρίς εφαρμογή στην ανίχνευση πεπτιδίων από υδρολυμένες πρωτεΐνες γάλακτος σε διάφορες μήτρες τροφίμων (Damodaran, 2017). Εν κατακλείδι, παρά τις σημαντικές προόδους που έχουν σημειωθεί στην ανάπτυξη ανοσοχημικών μεθόδων για την ανίχνευση αλλεργιογόνων γάλακτος, εξακολουθούν να υπάρχουν προκλήσεις όσον αφορά την ανίχνευση υδρολυμένων πρωτεϊνών και την εφαρμογή σε σύνθετες μήτρες τροφίμων. Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για την αντιμετώπιση αυτών των περιορισμών και

την ανάπτυξη ευαίσθητων, ειδικών και αξιόπιστων μεθόδων που θα διευκολύνουν την εφαρμογή των κανονισμών επισήμανσης και θα διασφαλίσουν την προστασία των καταναλωτών με αλλεργία στο γάλα.

**Πίνακας 4 Συγκεντρωτικός Πίνακας χαρακτηριστικών των μελετών που χρησιμοποιούν αισθητήρες και LFD για την ανίχνευση αλλεργιογόνων στα γαλακτοκομικά προϊόντα.**

Μελέτη	Έτος	Αναλυτική Τεχνική	Στόχος/Αναλύτης	Όρια Ανίχνευσης	Καινοτομία/Μεθοδολογία	Κύρια Ευρήματα/Πλεονεκτήματα
Ashley et al.	2018	Βιοαισθητήρας SPR με nanoMIPs	α-καζεΐνη	127 ± 97.6 ng/ml	Σύνθεση νανοσωματιδίων μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών ως συνθετικών υποδοχέων	- Εξαιρετική εκλεκτικότητα έναντι άλλων πρωτεϊνών γάλακτος - Ανακτήσεις 87-120% σε πραγματικά δείγματα
Sena-Torralba et al.	2022	Μικροανοσοπροσδιορισμός πλευρικής ροής (LFμΙΑ)	Αλλεργιογόνα αμυγδαλόυ και φιστικιού	185 και 229 μg/kg	Μικροπίνακας 36 σημείων σε μία ταινία με εσωτερική βαθμονόμηση	- Εκλεκτικότητα 77% - RSD 5-25% σε εμπορικά δείγματα - Ημι-ποσοτικός προσδιορισμός
Alhamma dietal.	2022	LFIA με χρυσά νανοσωματίδια	Ενροφλοξασίνη σε γάλα	nLOD: 20 ng/ml	Βελτιστοποίηση πολλαπλών παραμέτρων και ενσωμάτωση μαρτύρων ελέγχου	- Χρόνος ανάλυσης 10 λεπτά - Κόστος 1€/δοκιμή - Υψηλή εξειδίκευση
Kilic et al.	2020	Βολταμμετρικός βιοαισθητήρας	α-λακταλβουμίνη	192.2 pg/mL	Ηλεκτροπολυμερισμός πολυπυρρολίου για παγίδευση αντισωμάτων	- Ανακτήσεις 93.1-97.0% σε γαλακτοκομικά - Χρόνος ανάλυσης 1.5 ώρα - Υπερτερεί ELISA κατά 10-105 φορές
Chinnasa myetal.	2014	Μικροσυστοιχία πλευρικής ροής	IgE έναντι αλλεργιογόνων	Μεταβλητό (AUC)	Συνδυασμός μικροσυστοιχιών με μικρορρευστονική σε	- CV 12% μεταξύ δοκιμών - Καλή

Μελέτη	Έτος	Αναλυτική Τεχνική	Στόχος/Αναλύτης	Όρια Ανίχνευσης	Καινοτομία/Μεθοδολογία	Κύρια Ευρήματα/Πλεονεκτήματα
			γάλακτος	= 0.54-0.88)	χαρτί	συμφωνία με ImmunoCAP - Οικονομική εναλλακτική
Chengetal.	2017	Ανταγωνιστική LFA με φθορίζοντα μικροσφαιρίδια	Καζεΐνη	100 ng/ml	Χρήση φθορίζοντων μικροσφαιριδίων ως σήμανση	- Γραμμικό εύρος 100-10.000 ng/ml - Ανακτήσεις 88.9-106.6% - Χρόνος ανάλυσης 20 λεπτά
Rossetal.	2019	Συγκριτική μελέτη ανοσοπροσδιορισμών	Πολλαπλά αλλεργιογόνα τροφίμων	0.05-5 ppm	Σύγκριση διήθησης και πλευρικής ροής με ανάλυση smartphone	- Χρόνοι ανάλυσης 1-10 λεπτά - Βέλτιστα LOD σε ενεργή ροή - Επικύρωση με 20 δείγματα

### 6.3 Βιοαισθητήρες απταμερών

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, έχει παρατηρηθεί σημαντική εξέλιξη στην παραγωγή απταμερών έναντι διαφόρων στόχων μέσω συστηματικής εξέλιξης των μορίων συνδετών με εκθετικό εμπλουτισμό (SELEX). Ειδικά για τα αλλεργιογόνα των γαλακτοκομικών προϊόντων, έχουν αναφερθεί δεκαεδρικά νανοσωματίδια αργύρου και SELEX με βάση τη διαλογή κυττάρων ενεργοποιημένη με φθορισμό (AgNPsFACS) για εξαιρετικά ευαίσθητο και ειδικό έλεγχο των απταμερών έναντι αντίστοιχων αλλεργιογόνων γάλακτος (Yu, 2019). Ορισμένα απταμερή εξετάζουν ήδη τις πρωτεΐνες γάλακτος που στοχεύουν (Πίνακας 3).

Πίνακας 5 Αλληλουχίες απταμερών με συνάφεια πρόσφησης στα αλλεργιογόνα των γαλακτομικών

S.N ο.	Αλληλουχία Απταμερούς	Σταθερά Συγγέν ειας, (nM)	Αλλεργιογ όνο γαλακτοκο μικών - Στόχος
1	CGACGATCGGACCGCAGTACCCACCCACCAGCCCCAAC ATCATGCCCATCCGTGTGTG	82 ± 30 and 80 ± 26	β- λακτοσφαιρ ίνη A και B
2	5'-GGGGTTGGGGTGTGGGGTTGGGG/3AmMO/-3'	22 ± 2	β- λακτοσφαιρ ίνη
3	5'-FITC- AGGCAGGACACCGTAACCGGTGCATCTATGGCTACTAG CTCTTCCTGCCT-3'	28.78 ± 7.20	λακτοφερρί νη
4	ATA CCA GCT TAT TCA ATT CGA CGA TCG GAC CGC AGT ACC CAC CCA CCA GCC CCA ACA TCA TGC CCA TCC GTG TGT GAG ATA GTA AGT GCA ATC T	--	B- λακτοσφαιρ ίνη
5	CGGTGCATCTATGGCTACTAGCTTTTCCTGCCTATACTA C	1.04 ± 0.50	Λακτοφερρ ίνη

Στην ερευνητική μελέτη των Lettierietal., προτάθηκε η ανάπτυξη ενός καινοτόμου ηλεκτροχημικού απταισθητήρα για την ανίχνευση της β-λακτοσφαιρίνης, βασιζόμενο στη χρήση ενός σύνθετου πολυμερούς από πολυ(ανιλίνη-συν-ανθρανιλικό οξύ) (PANI/PAA) και ενός επιλεγμένου απταμερούς. Ο απταισθητήρας κατασκευάστηκε πάνω σε αναλώσιμα τυπωμένα ηλεκτρόδια άνθρακα με τροποποίηση της επιφάνειας τους μέσω ηλεκτροπολυμερισμού του σύνθετου πολυμερούς PANI/PAA, παρέχοντας μία αγωγίμη πλατφόρμα υψηλής ηλεκτροενεργής επιφάνειας για τη μετέπειτα προσρόφηση του απταμερούς μέσω των καρβοξυλικών ομάδων του PAA. Μετά από βελτιστοποίηση των πειραματικών παραμέτρων της ανοσοδοκιμασίας, ο απταισθητήρας εμφάνισε γραμμική απόκριση στην περιοχή 0.01-2 µg/L συγκέντρωσης β-λακτοσφαιρίνης με όριο ανίχνευσης 0.053 µg/L, επιτρέποντας τη μέτρηση της επιτρεπόμενης δόσης των 0.1 mg/mL για την προστασία των αλλεργικών ατόμων. Το αναλυτικό πρωτόκολλο βασίστηκε σε μία ανταγωνιστικού τύπου προσέγγιση με μείωση του σήματος (signal-off) παρουσία της πρωτεΐνης-στόχου, μέσω του ανταγωνισμού της με μία συμπληρωματική

βιοτυνιλωμένη αλληλουχία ως προς την πρόσδεση με το ακινητοποιημένο απαμερές. Εκτός της ευαισθησίας, ο αισθητήρας επέδειξε υψηλή εκλεκτικότητα παρουσία συνήθων πρωτεϊνών του γάλακτος (BSA, καζεΐνη), καθώς και ικανοποιητική σταθερότητα κατά την αποθήκευση για ένα μήνα. Η εφαρμογή του αισθητήρα σε εμπορικά διαθέσιμα δείγματα αγελαδινού και σογιέλαιου εμβολιασμένων με β-λακτοσφαιρίνη, έδειξε πολύ καλά ποσοστά ανάκτησης επιβεβαιώνοντας την καταλληλότητα της αναπτυχθείσας πλατφόρμας για την ποσοτικοποίηση του εν λόγω αλλεργιογόνου σε πραγματικά δείγματα (Lettieri, 2020).

Η μελέτη των Eissa et al., παρουσιάζει την ανάπτυξη ενός καινοτόμου βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της β-λακτοσφαιρίνης (β-LG), μιας από τις κύριες πρωτεΐνες του γάλακτος που προκαλεί αλλεργικές αντιδράσεις, ιδιαίτερα στα βρέφη. Οι ερευνητές πέτυχαν την επιλογή DNA απταμερών με υψηλή συγγένεια και εξειδίκευση για τις δύο παραλλαγές της β-LG (Α και Β) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). Το απταμέρο BLG14 επέδειξε την υψηλότερη συγγένεια και για τις δύο παραλλαγές, με σταθερές διάστασης (Kd) 82 και 80 nM αντίστοιχα. Ο βιοαισθητήρας κατασκευάστηκε ενσωματώνοντας το επιλεγμένο απταμέρο σε ηλεκτρόδια γραφενίου. Η ανίχνευση βασίζεται στη μεταβολή του βολταμμετρικού σήματος ενός οξειδοαναγωγικού ζεύγους λόγω της προσρόφησης/απελευθέρωσης του απταμερούς από την επιφάνεια του γραφενίου κατά την πρόσδεση της πρωτεΐνης. Ο αισθητήρας επέδειξε εξαιρετική ευαισθησία με όριο ανίχνευσης 20 pg/ml, που είναι χαμηλότερο από τις συμβατικές μεθόδους όπως ELISA και HPLC. Επιπλέον, παρουσίασε υψηλή εκλεκτικότητα έναντι της αλβουμίνης ορού βοός (BSA) και καλή σταθερότητα. Η εφαρμογή του σε εμπλουτισμένα δείγματα τροφίμων έδωσε ποσοστά ανάκτησης 90-95%. Αξίζει να αναφερθεί ότι η συγκεκριμένη μελέτη, παρουσιάζει την πρώτη επιτυχή επιλογή απταμερών για τη β-λακτοσφαιρίνη και την ενσωμάτωσή τους σε έναν απλό, χαμηλού κόστους και ευαίσθητο βιοαισθητήρα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση αλλεργιογόνων γάλακτος σε τρόφιμα (Eissa, 2017).

Η μελέτη των Shietal., παρουσιάζει την ανάπτυξη μιας νέας φθορομετρικής μεθόδου για την ανίχνευση της β-λακτοσφαιρίνης (β-LG), βασισμένη στη χρήση απταμερών, μαγνητικών νανοσωματιδίων και κβαντικών τελειών άνθρακα (C-dots). Η μεθοδολογία της μελέτης βασίστηκε στον υβριδισμό μεταξύ απταμερών ακινητοποιημένων σε μαγνητικά νανοσωματίδια  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  και συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων επισημασμένων με C-dots. Παρουσία β-LG, το απταμερές προσδένεται προτιμησιακά στην πρωτεΐνη, οδηγώντας σε μερική απελευθέρωση των επισημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων στο διάλυμα. Μετά από μαγνητικό διαχωρισμό, το υπερκείμενο που περιέχει τα απελευθερωμένα C-dots-cDNA ποσοτικοποιείται φθορομετρικά. Υπό βέλτιστες συνθήκες, η ένταση φθορισμού είναι ανάλογη του λογαρίθμου της συγκέντρωσης β-LG στο εύρος 0,25-50 ng/mL, με όριο ανίχνευσης 37 pg/mL. Η μέθοδος επέδειξε υψηλή εκλεκτικότητα έναντι άλλων πρωτεϊνών γάλακτος (BSA, καζεΐνη, γ-σφαιρίνη) και εφαρμόστηκε επιτυχώς στον προσδιορισμό β-LG σε υποαλλεργικά παρασκευάσματα, με ποσοστά ανάκτησης 88,4-93,8%. Συγκριτικά με προηγούμενες μεθόδους, η προτεινόμενη τεχνική παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα. Πιο συγκεκριμένα, τα πλεονεκτήματα αυτά συμπεριλαμβάνουν τη χρήση σταθερών απταμερών έναντι αντισωμάτων, την αξιοποίηση C-dots με εξαιρετική φωτοσταθερότητα και χαμηλό υπόβαθρο αυτοφθορισμού, και τον αποτελεσματικό μαγνητικό διαχωρισμό. Η μέθοδος προσφέρει ένα υποσχόμενο εργαλείο για τον έλεγχο ποιότητας γαλακτοκομικών προϊόντων και θα μπορούσε να προσαρμοστεί για την ανίχνευση διαφόρων αναλυτών μέσω της χρήσης κατάλληλων απταμερών (Shi, 2017).

Η μελέτη των Chenetal., είχε σα βασικό στόχο την ανάπτυξη ενός καινοτόμου διπλού απτασενσόρα (bivalent aptasensor) για την ανίχνευση της λακτοφερρίνης (Lac) σε δείγματα γάλακτος, βασιζόμενο στην ενίσχυση φθορισμού πολαρισμού (FP) με τη χρήση νανοσωματιδίων αργύρου. Η μεθοδολογία είχε σα βάση τη διάσπαση ενός προηγουμένως επιλεγμένου απταμερούς σε δύο τμήματα, τα οποία τροποποιήθηκαν με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) και δεκαεδρικά νανοσωματίδια αργύρου ( $\text{Ag}_{10}\text{NPs}$ ) αντίστοιχα. Τα διασπασμένα απταμερή προσδένονται σε διαφορετικές θέσεις της λακτοφερρίνης, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που μειώνει την απόσταση μεταξύ των  $\text{Ag}_{10}\text{NPs}$  και της FITC. Αυτό οδηγεί σε τριπλή ενίσχυση του σήματος μέσω: (1) αύξησης μάζας, (2)

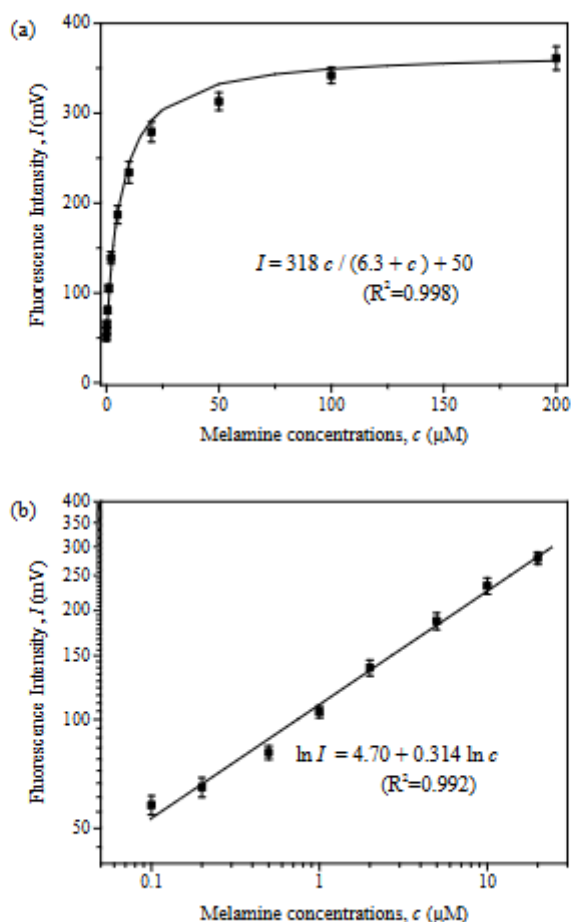


ενίσχυσης φθορισμού από μέταλλο (MEF) και (3) διπλής αναγνώρισης από τα διασπασμένα απταμερή. Υπό βέλτιστες συνθήκες, η μέθοδος επιδεικνύει εξαιρετική ευαισθησία με γραμμική απόκριση στο εύρος 0,2 ng/mL-25 µg/mL και όριο ανίχνευσης 1,25 pM, περίπου τρεις τάξεις μεγέθους χαμηλότερο από συμβατικές μεθόδους. Η εξειδίκευση επαληθεύτηκε έναντι άλλων πρωτεϊνών γάλακτος, ενώ η μέθοδος εφαρμόστηκε επιτυχώς σε πραγματικά δείγματα σκόνης γάλακτος με ικανοποιητικά ποσοστά ανάκτησης. Η καινοτομία της συγκεκριμένης μεθόδου έγκειται στην ανακάλυψη δύο νέων απταμερών με διακριτές θέσεις πρόσδεσης στη λακτοφερρίνη, καθώς και στο συνδυασμό του φαινομένου MEF με μετρήσεις FP για πρώτη φορά. Η προτεινόμενη προσέγγιση προσφέρει ένα ισχυρό αναλυτικό εργαλείο για τον ποιοτικό έλεγχο γαλακτοκομικών προϊόντων και θέτει τις βάσεις για την ανάπτυξη παρόμοιων διπλών απτασενσώρων για άλλους αναλύτες (Chen, 2017).

Η δημοσίευση των Tahetal., παρουσίασε την ανάπτυξη ενός καινοτόμου βιοαισθητήρα βασισμένου σε απταμερή για την ανίχνευση τροφικών αλλεργιογόνων, χρησιμοποιώντας ένα σύνθετο υλικό οξειδίου του γραφενίου/νανοσωματιδίων χρυσού σε μια χάρτινη αναλυτική διάταξη. Η μεθοδολογική προσέγγιση της συγκεκριμένης εργασίας, βασίστηκε στην ανάπτυξη μιας μικρορευστομηχανικής διάταξης σε χαρτί (µPAD) με υδρόφοβα κανάλια, δημιουργημένα με εκτύπωση κεριού, και λειτουργικοποιημένα νανοσωματίδια χρυσού (AuNP) για την ανίχνευση των αλλεργιογόνων αραχίνη (Ara h 1) για φιστίκια, β-λακτοσφαιρίνη (β-LG) για γάλα και τροπομυοσίνη (Pen a 1) για γαρίδες/οστρακοειδή. Τα AuNP συζεύχθηκαν με βιοτινυλιωμένα απταμερή μέσω της αλληλεπίδρασης βιοτίνης-στρεπταβιδίνης για την εξειδικευμένη ανίχνευση των αλλεργιογόνων-στόχων. Τα λειτουργικοποιημένα AuNP επωάζονται με το δείγμα και απορροφώνται από οξείδιο του γραφενίου (GO), δημιουργώντας σύμπλοκα GO-AuNP, εάν τα απταμερή δεν έχουν δομηθεί λόγω σύζευξης με αλλεργιογόνες πρωτεΐνες. Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης, η προτεινόμενη διάταξη µPAD είχε τη δυνατότητα να επιτύχει εξαιρετική ευαισθησία στην ανίχνευση αλλεργιογόνων στην περιοχή νανογραμµαρίων, με όρια ανίχνευσης 7,8 nM, 12,4 nM και 6,2 nM για αλλεργιογόνα φιστικιών, γάλακτος και γαρίδας αντίστοιχα. Η απλή χρωματομετρική ένδειξη, που κυμαίνεται από διαφανές έως ροζ παρουσία αλλεργιογόνων,

επιτρέπει την ανάγνωση των αποτελεσμάτων χωρίς την ανάγκη εξειδικευμένου εξοπλισμού. Συνεπώς, η προτεινόμενη διάταξη αισθητήρα απταμερών προσέφερε μία ταχεία και χαμηλού κόστους εφαρμογή που έχει και ιδιότητες φορητότητας και απέφυγε τη διασταυρούμενη μόλυνση των τροφίμων που εξετάζονταν για αλλεργιογόνα (Tah, 2018).

Η ερευνητική εργασία των παρουσιάζει την ανάπτυξη ενός καινοτόμου βιοαισθητήρα για την ανίχνευση μελαμίνης σε γάλα, ο οποίος βασίζεται στη συνδυαστική χρήση απταμερών και τεχνολογίας οπτικών ινών εξασθενημένου κύματος (EWF). Η μεθοδολογική προσέγγιση στηρίζεται στην ανταγωνιστική πρόσδεση μεταξύ ενός μακρού απταμερούς 88 νουκλεοτιδίων και της μελαμίνης, με το σύστημα ανίχνευσης να βασίζεται σε μια διαδοχική διαδικασία υβριδισμού, ανταγωνισμού και ανίχνευσης φθορισμού. Το αναλυτικό πρωτόκολλο περιλαμβάνει τη σύζευξη του απταμερούς με βοηθητικά DNA (MEL2) και φθορίζοντα DNA (MEL3) σε μαγνητικά σφαιρίδια. Παρουσία μελαμίνης, το απταμερές αποδεσμεύεται απελευθερώνοντας το MEL3, το οποίο στη συνέχεια ανιχνεύεται μέσω υβριδισμού με συμπληρωματικό DNA (MEL4) που είναι ακινητοποιημένο στην επιφάνεια της οπτικής ίνας. Υπό βέλτιστες πειραματικές συνθήκες, η μέθοδος επιδεικνύει γραμμική απόκριση στο εύρος συγκεντρώσεων 0,1-20  $\mu\text{M}$  μελαμίνης, με όριο ανίχνευσης 0,15  $\mu\text{M}$  σε ρυθμιστικό διάλυμα και 3,0  $\mu\text{M}$  σε γάλα. Η εκλεκτικότητα της μεθόδου επιβεβαιώθηκε έναντι δομικά παρόμοιων ενώσεων όπως το κυανουρικό οξύ, το αμμελίδιο και η αμμελίνη. Σε δείγματα γάλακτος, επιτεύχθηκαν ποσοστά ανάκτησης 92-108% με σχετική τυπική απόκλιση μικρότερη του 7,5%, ενώ ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ανέρχεται στα 17 λεπτά. Η προτεινόμενη μεθοδολογία προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα συγκριτικά με συμβατικές τεχνικές όπως η LC-MS/MS και η ανοσοδοκιμασία, καθώς συνδυάζει την ταχύτητα, την ευαισθησία και την εκλεκτικότητα με την απλότητα και το χαμηλό κόστος. Παρότι το όριο ανίχνευσης υπολείπεται ορισμένων εξειδικευμένων τεχνικών, παραμένει επαρκές για τον αξιόπιστο έλεγχο των κανονιστικών ορίων μελαμίνης σε γαλακτοκομικά προϊόντα, καθιστώντας τη μέθοδο κατάλληλη για εφαρμογές ρουτίνας στον ποιοτικό έλεγχο τροφίμων (Qiu, 2018).



**Εικόνα 5** Καμπύλες δόσης-απόκρισης για τη μελαμίνη από τον βιοαισθητήρα με βάση το απταμερές στον αισθητήρα EWF. α) Εξίσωση κορεσμού προσαρμοσμένη για συγκεντρώσεις μελαμίνης στην περιοχή 0-200  $\mu$ M. β) Καμπύλη βαθμονόμησης για συγκεντρώσεις μελαμίνης στην περιοχή 0,1-20  $\mu$ M. Η ένταση φθορισμού καταγράφεται ως η ηλεκτρική τάση του αισθητήρα EWF. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση των διπλότυπων αναλύσεων (πηγή: Qiu, 2018).

**Πίνακας 6 Συγκεντρωτικός Πίνακας χαρακτηριστικών των μελετών που χρησιμοποιούν βιοαισθητήρες απταμερών για την ανίχνευση αλλεργιογόνων στα γαλακτοκομικά προϊόντα.**

Μελέτη	Έτος	Αναλυτική Προσέγγιση	Αναλύτης -Στόχος	Όρια Ανίχνευσης	Μεθοδολογική Καινοτομία	Αναλυτική Απόδοση/Πλεονεκτήματα
Lettierietal.	2020	Ηλεκτροχημικός απταισθητήρας με PANI/PAA	β-λακτοσφαιρίνη	0.053 μg/L	Ηλεκτροπολυμερισμός σύνθετου πολυμερούς σε τυπωμένα ηλεκτρόδια	- Γραμμική απόκριση: 0.01-2 μg/L - Υψηλή εκλεκτικότητα έναντι BSA/καζεΐνης - Σταθερότητα ενός μηνός
Eissaetal.	2017	Απταμερικός βιοαισθητήρας σε γραφένιο	β-λακτοσφαιρίνη A/B	20 pg/mL	Πρώτη επιλογή απταμερών με SELEX (Kd: 80-82 nM)	- Υψηλή εκλεκτικότητα - Ποσοστά ανάκτησης: 90-95% - Χαμηλότερο LOD από ELISA/HPLC
Shietal.	2017	Φθορομετρική μέθοδος με μαγνητικά νανοσωματίδια/C-dots	β-λακτοσφαιρίνη	37 pg/mL	Συνδυασμός απταμερών με C-dots και μαγνητικό διαχωρισμό	- Γραμμικό εύρος: 0.25-50 ng/mL - Ανακτήσεις: 88.4-93.8% - Υψηλή εκλεκτικότητα
Chenetal.	2017	Διπλός απτασενσώρας με ενίσχυση FP	Λακτοφερρίνη	1.25 pM	Συνδυασμός MEF και FP με διασπασμένα απταμερή	- Γραμμικό εύρος: 0.2 ng/mL-25 μg/mL - Τριπλή ενίσχυση σήματος - Εξαιρετική ευαισθησία
Tahetal.	2018	Χάρτινη μικρορευστομηχανική διάταξη (μPAD)	Πολλαπλά αλλεργιογόνα	7.8-12.4 nM	Συνδυασμός GO/AuNP σε χάρτινη πλατφόρμα	- Χρωματομετρική ανίχνευση - Φορητότητα - Χαμηλό κόστος
Quietal.	2018	Οπτικών ινών εξασθενημένου κύματος (EWF)	Μελαμίνη	0.15 μM (buffer) 3.0 μM (γάλα)	Ανταγωνιστική πρόσδεση με διαδοχικό υβριδισμό	- Γραμμικό εύρος: 0.1-20 μM - Ανακτήσεις: 92-108% - Χρόνος ανάλυσης: 17 min

## 6.4 Μέθοδοι που βασίζονται στη Φασματομετρία Μάζας και υγρή χρωματογραφία

Η φασματομετρία μάζας (MS – MassSpectrometry) έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην πρωτεωμική έρευνα και έχει αποδειχθεί ισχυρή αναλυτική τεχνική τόσο για την ανάλυση πρωτεϊνών όσο και για την ανάλυση πεπτιδίων, συμπεριλαμβανομένης της ταυτοποίησης, του χαρακτηρισμού και του προσδιορισμού των αλλεργιογόνων τροφίμων. Πιο συγκεκριμένα, οι πλατφόρμες MS προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα, όπως υψηλή ταχύτητα, ακρίβεια, ευαισθησία, εξειδίκευση και επαναληψιμότητα (Picariello, 2011). Η ευαισθησία της είναι συγκρίσιμη με την ELISA και την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), επιτρέποντας πολλαπλή ανίχνευση στόχων σε μία μόνο διαδρομή με υψηλή εξειδίκευση. Επιπλέον, τα προβλήματα που σχετίζονται με τη διασταυρούμενη αντιδραστικότητα, τα οποία συχνά συνδέονται με τις ανοσοδοκιμασίες, εξαλείφονται επειδή η ανίχνευση του πεπτιδίου/πρωτεΐνης στόχου δεν απαιτεί αλληλεπίδραση με βιολογικό υποδοχέα (αντίσωμα), επιτρέποντας άμεση και σαφή ταυτοποίηση των αναλυτών-στόχων (Picariello, 2011).

Η πρωτεωμική ανάλυση ενός δείγματος αποτελείται συνήθως από ένα ή περισσότερα στάδια διαχωρισμού σε επίπεδο πρωτεΐνης ή/και πεπτιδίου (ηλεκτροφόρηση πηκτής, υγρή χρωματογραφία), ακολουθούμενη από ανάλυση MS. Υπάρχουν δύο κύριες προσεγγίσεις για την ανίχνευση, ποσοτικοποίηση και χαρακτηρισμό των αλλεργιογόνων: η προσέγγιση bottom-up, όπου οι πρωτεΐνες πέπτονται με ένζυμα, όπως η θρυψίνη, πριν από την ανάλυση MS και η προσέγγιση top-down, όπου οι ολόκληρες πρωτεΐνες θραύονται απευθείας μέσα στο φασματόμετρο μάζας, αποφεύγοντας το μεταβλητό στάδιο της πέψης πρωτεϊνών. Η προσέγγιση bottom-up είναι η πιο κοινή λόγω της περιορισμένης αναλυτικής ικανότητας των οργάνων που βασίζονται στην top-down μέθοδο (Prado, 2016).

Όλο και περισσότερες μελέτες, επικεντρώνονται σε τεχνικές που έχουν σκοπό την ανίχνευση αλλεργιογόνων γάλακτος ή γαλακτοκομικών προϊόντων, σε τρόφιμα με τεχνολογίες MS. Η πλειοψηφία αυτών των πειραματικών μελετών, χρησιμοποιεί

πολλαπλές προσεγγίσεις όσον αφορά τα αλλεργιογόνα - στόχους, επιτρέποντας τη διάκριση διαφορετικών αλλεργιογόνων γάλακτος (καζεΐνες, ALA και β-LG) σε διαφορετικούς πίνακες τροφίμων, όπως κρασιά, μπισκότα, βρεφικά γάλατα και προϊόντα αρτοποιίας, με ευαισθησίες που κυμαίνονται από 0.01 έως 5 mg/kg. Πολύ πρόσφατα, οι Jietal., ανέπτυξαν μια μέθοδο LC-MS/MS για την επιβεβαίωση και ποσοτικοποίηση 3 αλλεργιογόνων γάλακτος (ALA, β-LG και αS1-καζεΐνη) σε διάφορα προϊόντα τροφίμων, δηλαδή μπισκότα, βάφλες, ζαχαροπλαστική, πίτα με κρόκο κ.α., με αναφερόμενο LOD 0.2 mg/kg για β-LG και αS1-καζεΐνη και 0.39 mg/kg για ALA (Ji, 2017). Παρόμοιες ευαισθησίες βρέθηκαν και σε αντίστοιχη μελέτη από τους Losito et al., των οποίων η μέθοδος, που βασίζεται στην παγίδα ιόντων - MS, ήταν σε θέση να ανιχνεύσει καζεϊνικό άλας σε ίχνη σε διάφορα ιταλικά λευκά κρασιά, με LOD που κυμαίνεται από 0.09 έως 0.29 mg/L, ανάλογα με το κρασί (Losito, 2013).

Όπως και στις ανοσοχημικές μεθόδους, η σύσταση των τροφίμων επηρεάζει με εξίσου σημαντικό τρόπο την ευαισθησία των μεθόδων MS. Ως εκ τούτου, οι αναφερόμενες τιμές LOD είναι υψηλότερες για την ανάλυση αλλεργιογόνων σε σύνθετα τρόφιμα με πολλά συστατικά, τροφίμων όπως για παράδειγμα οι σοκολάτες. Η επίδραση της επεξεργασίας τροφίμων στα αλλεργιογόνα-στόχους πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψη, επειδή είναι γνωστό ότι η δομή τους επηρεάζεται διαφορετικά από διαφορετικούς τύπους επεξεργασίας, απαιτώντας την ταυτοποίηση πεπτιδίων δεικτών τόσο σε ακατέργαστους όσο και σε επεξεργασμένους πίνακες. Η επεξεργασία τροφίμων αλλοιώνει την εκχυλισιμότητα και τη διαλυτότητα των αλλεργιογόνων ή άλλων πρωτεϊνών δεικτών, γεγονός που μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την καλή απόδοση της μεθόδου που βασίζεται στην MS. Ωστόσο, τα πλεονεκτήματα της υψηλής ακρίβειας, της εξειδίκευσης και της ανάλυσης πολλαπλών στόχων, καθιστούν τις πλατφόρμες MS πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες για την ανάλυση αλλεργιογόνων από τις κλασικές ανοσοχημικές δοκιμασίες (Prado, 2016).

Οι Gomaaetal., διεξήγαγαν μια ολοκληρωμένη συγκριτική μελέτη αξιολογώντας την αποτελεσματικότητα των μεθόδων ELISA, πολυπλεξίας κυτταρομετρίας ροής και υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (LC-MS) στην ανίχνευση μεμονωμένων

και πολλαπλών αλλεργιογόνων τροφίμων σε μια μήτρα μπισκότων. Στόχος της μελέτης ήταν η αξιολόγηση του αντίκτυπου της θερμικής επεξεργασίας στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των αλλεργιογόνων. Οι ερευνητές εισήγαγαν σε ξηρό μείγμα μπισκότων χωρίς αλλεργιογόνα γνωστές συγκεντρώσεις (10, 100, 1000 ppm) καζεΐνης, πρωτεΐνης σόγιας και γλουτένης, τόσο μεμονωμένα όσο και σε συνδυασμό. Η ανάκτηση των αλλεργιογόνων μετρήθηκε στο ωμό μείγμα και στα ψημένα μπισκότα χρησιμοποιώντας εμπορικά κιτ ELISA, μια νέα βελτιστοποιημένη δοκιμασία πολυπλεξίας κυτταρομετρίας ροής και LC-MS με ταυτοποίηση πεπτιδίων βιοδεικτών. Η ELISA έδειξε υψηλές ανακτήσεις (85-127%) για όλα τα αλλεργιογόνα στο ωμό μείγμα, αλλά παρουσίασε σημαντικές μειώσεις (52-95%) στα ψημένα δείγματα, υποδηλώνοντας μειωμένη αποτελεσματικότητα εκχύλισης για τις θερμικά επεξεργασμένες πρωτεΐνες. Η δοκιμασία πολυπλεξίας κυτταρομετρίας ροής απέδωσε συγκρίσιμες ανακτήσεις με την ELISA, ενώ επέτρεψε ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών αλλεργιογόνων με μειωμένο χρόνο προετοιμασίας δείγματος. Η LC-MS ταυτοποίησε με επιτυχία ειδικά για τα αλλεργιογόνα πεπτίδια-βιοδείκτες σε 10 ppm για την καζεΐνη και την πρωτεΐνη σόγιας και 100 ppm για τη γλουτένη στα ψημένα μπισκότα. Η μελέτη υπογραμμίζει τις δυσκολίες στις αναλυτικές τεχνικές για ανίχνευση αλλεργιογόνων στα επεξεργασμένα τρόφιμα που περιέχουν ή έχουν σα βάση τα γαλακτοκομικά προϊόντα και επιπλέον τονίζει την ανάγκη για βελτιστοποιημένα πρωτόκολλα εκχύλισης. Η νέα μέθοδος πολυπλεξίας κυτταρομετρίας ροής παρουσιάζει προοπτικές για γρήγορο και οικονομικά αποδοτικό έλεγχο πολλαπλών αλλεργιογόνων. Ωστόσο, οι ίδιοι συγγραφείς τονίζουν ότι είναι αναγκαία η περαιτέρω επικύρωση της αποτελεσματικότητας της τεχνικής, χρησιμοποιώντας ένα ευρύτερο φάσμα αλλεργιογόνων και τροφίμων πριν τη γενίκευση των αποτελεσμάτων της συγκεκριμένης τεχνικής (Gomaa, 2015).

Οι Biancoetal. παρουσίασαν μια μέθοδο αναστρεφόμενης φάσης υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με υψηλής ευκρίνειας φασματομετρία μάζας (RPLC-ESI-HRMS) για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αλλεργιογόνων πρωτεϊνών γάλακτος σε σύνθετα τρόφιμα με βάση το κρέας η οποία είχε αυξημένο βαθμό ευαισθησίας και ακρίβειας. Η μεθοδολογία βασίστηκε στην εκλεκτική ανίχνευση δύο χαρακτηριστικών πεπτιδίων, του FFVAPFPEVFGK ( $m/z$  692.8682+) της  $\alpha$ -S1-καζεΐνης



και του TPEVDDEALEK ( $m/z$  623.2952+) της β-λακτογλοβουλίνης, τα οποία αντιπροσωπεύουν τη μερίδα της καζεΐνης και του ορού γάλακτος, αντίστοιχα. Η μέθοδος επικυρώθηκε ενδελεχώς ως προς την ανάκτηση, την επίδραση του υποστρώματος, την ακρίβεια, τη γραμμικότητα, τη μεταβλητότητα, το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ). Τα επιλεγμένα πεπτίδια-δείκτες αξιοποιήθηκαν για τον έλεγχο της παρουσίας μη δηλωμένων αλλεργιογόνων γάλακτος σε δείγματα όπως μαγειρεμένο κρέας, λουκάνικα και αποστειρωμένο πατέ. Εντυπωσιακά, σε δείγματα πατέ βόειου και χοιρινού κρέατος ανιχνεύθηκε συνολική περιεκτικότητα πρωτεΐνης γάλακτος (TCMP) έως και 22  $\mu\text{gTCMP/g}$  υποστρώματος, δηλαδή πάνω από 10 φορές το επιτρεπόμενο όριο δράσης (actionlevel), γεγονός που καθιστά αυτά τα προϊόντα ιδιαίτερα επικίνδυνα για άτομα με αλλεργία στο γάλα. Η ανεπιθύμητη παρουσία κρυφών αλλεργιογόνων σε τρόφιμα μπορεί να προκύψει είτε από σκόπιμη προσθήκη πρωτεϊνών χαμηλού κόστους για τη βελτίωση των οργανοληπτικών και δομικών χαρακτηριστικών των προϊόντων, είτε από ακούσια διασταυρούμενη επιμόλυνση κατά τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας. Το ευρωπαϊκό πρόγραμμα VoluntaryIncidentalTraceAllergenLabeling (VITAL) έχει προτείνει ένα επίπεδο δράσης (actionlevel) για την προστασία των ευαίσθητων καταναλωτών, ωστόσο η υπερβολική χρήση προειδοποιητικής σήμανσης (precautionaryallergenlabelling) συχνά οδηγεί σε σύγχυση και υποβάθμιση της σημασίας των ετικετών. Το προτεινόμενο από τη μελέτη εργαλείο ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου έχει αρκετά καλές προοπτικές για να χρησιμοποιηθεί στον ποσοτικό προσδιορισμό κρυφών αλλεργιογόνων πρωτεϊνών γάλακτος σε σύνθετα και επεξεργασμένα τρόφιμα (Bianco, 2022).

Επίσης, οι Ramachandranetal., παρουσίασαν μια προηγμένη μέθοδο φασματομετρίας μάζας Parallel Reaction Monitoring (PRM) για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό αλλεργιογόνων πρωτεϊνών καζεΐνης και ορού γάλακτος από επεξεργασμένα τρόφιμα. Η βελτιστοποιημένη μέθοδος στοχεύει σε ένα εξελιγμένο σύνολο 19 πεπτιδίων-δεικτών που επιλέχθηκαν μέσω μιας ενδελεχούς μεθοδολογίας επιλογής στόχων βάσει δεδομένων bottom-upπρωτεωμικής ανάλυσης σε διαφορετικά παράγωγα γάλακτος. Τα πεπτίδια αντιπροσωπεύουν και τις δύο κύριες αλλεργιογόνες πρωτεϊνικές ομάδες, ανεξάρτητα από τον εμπλουτισμό του γαλακτοκομικού συστατικού σε καζεΐνη ή

πρωτεΐνες ορού γάλακτος. Η αξιολόγηση της απόδοσης των πεπτιδίων-στόχων πραγματοποιήθηκε με δοκιμές ευαισθησίας σε μήτρες αποβουτυρωμένου γάλακτος σε σκόνη (NFDM) με συγκεντρώσεις από 1 έως 1000 ppm. Η χρήση ζελατίνης χοιρινής προέλευσης ως πρωτεΐνης-φορέα συνέβαλε σημαντικά στην αποφυγή μη ειδικής προσρόφησης και βελτίωσε τη γραμμικότητα και ευαισθησία ανίχνευσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Η εγκυρότητα και εφαρμοσιμότητα της μεθόδου επικυρώθηκε περαιτέρω σε δείγματα ψημένων μπισκότων με προσθήκη γνωστών συγκεντρώσεων NFDM (0, 1, 10, 100 ppm). Επτά πεπτίδια από τις καζεΐνες α-, β- και κ- και τρία πεπτίδια από τη β-λακτογλοβουλίνη ανιχνεύθηκαν με επιτυχία σε επίπεδα μόλις 1 ppm στη μήτρα ψημένων μπισκότων. Τα ευρήματα αναδεικνύουν τη σημασία του σχεδιασμού και της βελτιστοποίησης της μεθόδου ώστε να είναι ανθεκτική στις επιδράσεις της μήτρας και της θερμικής επεξεργασίας. Η ενσωμάτωση ενός φορέα προσρόφησης και η κλιμάκωση των σταδίων προετοιμασίας δειγμάτων μπορεί να ενισχύσει σημαντικά την απόδοση και την ευαισθησία της μεθόδου σε σύνθετα, επεξεργασμένα τρόφιμα. Ωστόσο, είναι σημαντικό να εξαιρούνται τα πεπτίδια που εμφανίζουν φαινόμενα μεταφοράς (carryover), ακόμη κι αν πρόκειται για κοινά χρησιμοποιούμενους και έντονους στόχους, καθώς μπορεί να οδηγήσουν σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Ramachadran, 2020).

Οι Qietal., ανέπτυξαν επίσης, μια καινοτόμο μέθοδο για την ταχεία ανίχνευση αλλεργιογόνων πρωτεϊνών γάλακτος σε ψημένα τρόφιμα, χρησιμοποιώντας ακινητοποιημένη θρυψίνη (PHMN-Trypsin) σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης - διαδοχική φασματομετρία μάζας (UPLC-MS/MS). Η PHMN-Trypsin, ένας νέος τύπος ακινητοποιημένης θρυψίνης, επέτρεψε σημαντικά ταχύτερη πέψη (15 λεπτά) συγκριτικά με τη συμβατική ελεύθερη θρυψίνη (12-16 ώρες), επιτυγχάνοντας παράλληλα ίση ή υψηλότερη κάλυψη αλληλουχίας για τις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες αS1-, αS2-, β- και κ-καζεΐνη. Για κάθε πρωτεΐνη-στόχο, επιλέχθηκαν δύο έως τρία ειδικά και χαρακτηριστικά πεπτίδια με βάση την ειδικότητα ως προς το είδος, την ένταση της απόκρισης μάζας και τη σταθερότητα. Τα όρια ποσοτικοποίησης των τεσσάρων πρωτεϊνών σε ψημένα τρόφιμα κυμαίνονταν από 0.38 έως 0.83 μg/g, με ανακτήσεις 65.2-86.1% και σχετικές τυπικές αποκλίσεις κάτω του 11%. Η επίδραση της υψηλής θερμοκρασίας κατά το ψήσιμο στην υποβάθμιση των αλλεργιογόνων μελετήθηκε

συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις στη μήτρα-μοντέλο και στη μη ψημένη μήτρα. Η αS1-καζεΐνη επηρεάστηκε λιγότερο, υποδεικνύοντας ότι η αS1-καζεΐνη και η β-καζεΐνη αποτελούν σημαντικούς δείκτες για την παρουσία αλλεργιογόνων γάλακτος σε ψημένα τρόφιμα. Η εφαρμογή της μεθόδου σε εμπορικά προϊόντα αποκάλυψε μη δηλωμένα αλλεργιογόνα γάλακτος σε έξι από τα έντεκα δείγματα χωρίς σχετική επισήμανση, με συνολικές συγκεντρώσεις καζεΐνης που θα μπορούσαν να προκαλέσουν συμπτώματα τροφικής αλλεργίας ακόμη και σε μικρές ποσότητες κατανάλωσης. Αυτά τα ευρήματα αναδεικνύουν τον κίνδυνο για τους καταναλωτές και την ανάγκη για αυστηρότερη παρακολούθηση και επισήμανση αλλεργιογόνων. Η καινοτόμος μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη αναφορά εφαρμογής της ακινητοποιημένης θρυψίνης στην ανίχνευση αλλεργιογόνων τροφίμων. Η αξιοποίηση της βελτιωμένης αποτελεσματικότητας και ταχύτητας πέψης της PHMN-Trypsin, σε συνδυασμό με την ευαισθησία και ειδικότητα της UPLC-MS/MS, παρέχει μια εξαιρετικά αποδοτική προσέγγιση από άποψη χρόνου και κόστους για τον ποιοτικό έλεγχο στη βιομηχανία τροφίμων (Qi, 2019).

Οι Guetal., ανέπτυξαν μια βελτιστοποιημένη και ευαίσθητη μέθοδο LC-MS/MS για την ταυτόχρονη ανίχνευση οκτώ αλλεργιογόνων συστατικών σε μήτρα σοκολάτας. Η μέθοδος ενσωματώνει ένα γρήγορο στάδιο εκχύλισης στερεάς φάσης χρησιμοποιώντας στήλη περιστροφής MonoSpin PBA, το οποίο βελτιώνει την απόδοση και ενισχύει την ευαισθησία. Τα πιο έντονα και αξιόπιστα πεπτιδικά δείκτες αναγνωρίστηκαν αρχικά μέσω πειραμάτων untargeted ανίχνευσης χρησιμοποιώντας φασματόμετρο μάζας υψηλής ευκρίνειας τετραπολικού-orbitrap και στη συνέχεια αξιοποιήθηκαν για το σχεδιασμό μιας MRM (Multiple Target Monitoring) μεθόδου, βάσει των πιο έντονων μεταπτώσεων που καταγράφηκαν για κάθε επιλεγμένο πρόδρομο πεπτίδιο. Η ποσοτική ανάλυση της τεχνικής MRM πραγματοποιήθηκε σε φασματόμετρο μάζας τριπλού τετραπόλου με βελτιστοποιημένη ευαισθησία και αναπαραγωγιμότητα. Επιτεύχθηκε κάλυψη πρωτεϊνικής αλληλουχίας 70.8-93.3% για την επιβεβαίωση του κάθε αλλεργιογόνου συστατικού και επιλέχθηκαν δύο ή τρία από τα πιο ευαίσθητα πεπτίδια-δείκτες για την ανάκτηση των ποσοτικών πληροφοριών. Τα όρια ποσοτικοποίησης προσδιορίστηκαν στα 0.2-0.4 μg/g για το γάλα, 1.0-4 μg/g για τη σόγια, 2.5-4 μg/g για το φιστίκι, 1-3 μg/g για τους ξηρούς

καρπούς, ενώ οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 60.1(±2.7)% έως 92.4(±5.6)% για τα δείγματα σοκολάτας, αποδεικνύοντας την εξαιρετική ικανότητα της μεθόδου επεξεργασίας δειγμάτων σε συνδυασμό με την ανάλυση LC-MS/MS. Τέλος, η μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία για τη διερεύνηση πολλαπλών αλλεργιογόνων σε εμπορικά διαθέσιμες σοκολάτες διαφόρων μαρκών, με στόχο τον εντοπισμό πιθανών αποκλίσεων μεταξύ της περιεκτικότητας σε αλλεργιογόνα και της επισήμανσης αλλεργιογόνων τροφίμων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ευρήματα σχετικά με την ανίχνευση αλλεργιογόνων γάλακτος στις σοκολάτες που μελετήθηκαν. Τέσσερα πεπτίδια-δείκτες που αντιπροσωπεύουν τις καζεΐνες αS1, αS2, β και κ επιλέχθηκαν για να παρακολουθούν τις πρωτεΐνες γάλακτος ως αλλεργιογόνα. Η ανίχνευση των καζεϊνών γάλακτος επιτεύχθηκε με εντυπωσιακά χαμηλά όρια ποσοτικοποίησης της τάξης των 0.17-0.43 μg/g και ανακτήσεις 61.5-92.4%. Το εύρος γραμμικότητας εκτεινόταν από τα LOQ έως 160 μg/g για όλες τις καζεΐνες. Μεταξύ των 24 εμπορικών δειγμάτων σοκολάτας που αναλύθηκαν, 6 βρέθηκαν θετικά σε μη δηλωμένα αλλεργιογόνα γάλακτος, με συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 8.2 μg/g έως 19,878 μg/g, υπογραμμίζοντας τον κίνδυνο για τους καταναλωτές με αλλεργία στο γάλα. Συνολικά, η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε στην παρούσα μελέτη επιδεικνύει εξαιρετική ευαισθησία, ειδικότητα και αξιοπιστία για την ανίχνευση ιχνών αλλεργιογόνων γάλακτος σε σύνθετες μήτρες σοκολάτας. Ο συνδυασμός μιας αποτελεσματικής διαδικασίας καθαρισμού δείγματος με την ανάλυση LC-MS/MS υψηλής ευκρίνειας επιτρέπει την ταυτόχρονη στοχευμένη ποσοτικοποίηση πολλαπλών πρωτεϊνών-δεικτών καζεΐνης σε χαμηλά επίπεδα ppm. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την αξιολόγηση της επίδρασης της επεξεργασίας των τροφίμων στην ευαισθησία της μεθόδου και για την επικύρωση της σε ευρύτερο φάσμα τροφίμων που περιέχουν αλλεργιογόνα (Gu, 2018).

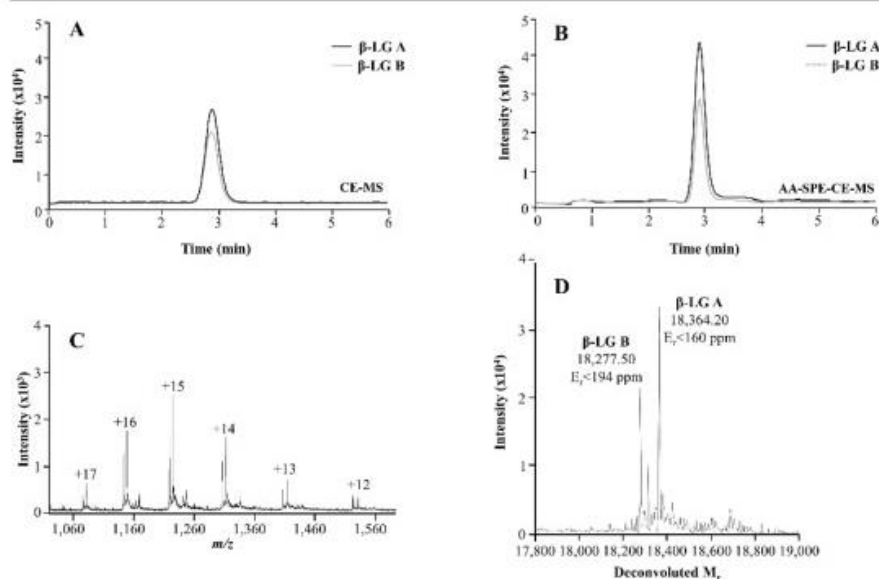
Η μελέτη των Fanetal., περιγράφει την ανάπτυξη μιας μεθόδου υγρής χρωματογραφίας-διαδοχικής φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS) για τον προσδιορισμό αλλεργιογόνων γάλακτος και αυγού σε τρόφιμα. Η προσέγγιση βασίστηκε στον εντοπισμό χαρακτηριστικών πεπτιδίων για την ωοαλβουμίνη, την α-λακταλβουμίνη (α-La), τη β-λακτογλοβουλίνη (β-Lg), την αS1-καζεΐνη (αS1-CN) και την αS2-καζεΐνη (αS2-CN), τα

οποία επιβεβαιώθηκαν και συντέθηκαν για περαιτέρω ανάλυση. Για την ποσοτικοποίηση, χρησιμοποιήθηκαν σχετικά ισοτοπικά επισημασμένα εσωτερικά πρότυπα. Η επικύρωση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε σε δείγματα ψωμιού, κέικ, μπισκότων, προϊόντων ρυζιού και αλευριού σίτου, απαλλαγμένα από αυγό και γάλα. Το γραμμικό εύρος κυμάνθηκε από 0,5 έως 5000,0 nmol/L για όλα τα αλλεργιογόνα-στόχους. Τα όρια ανίχνευσης κυμάνθηκαν από 0,94 έως 56,71 mg/100 g, ενώ τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ – Limit of Quantification) από 2,36 έως 141,78 mg/100 g. Οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 76,7% έως 122,8%, με σχετικές τυπικές αποκλίσεις εντός του εύρους 1,60%–15,60%. Η μέθοδος εφαρμόστηκε επιτυχώς για την ανίχνευση αλλεργιογόνων αυγού και γάλακτος σε ποικίλα δείγματα τροφίμων. Η εξειδίκευση, η γραμμικότητα, η ευαισθησία, η επίδραση υποστρώματος, η ακρίβεια και η ορθότητα της μεθόδου διερευνήθηκαν διεξοδικά. Οι πέντε χαρακτηριστικές πρωτεΐνες-δείκτες ανιχνεύθηκαν στα 30 εξεταζόμενα εμπορικά δείγματα σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 29,98 έως 5276,21 mg/100 g, επιβεβαιώνοντας την εφαρμοσιμότητα της μεθόδου. Παρά το γεγονός ότι οι περισσότερες ετικέτες τροφίμων αντικατόπτριζαν με ακρίβεια τα συστατικά, ανιχνεύθηκαν μη δηλωμένα αλλεργιογόνα σε ορισμένα δείγματα. Συνολικά, η προτεινόμενη μεθοδολογία, επιδεικνύει την ανάπτυξη μιας αξιόπιστης, ευαίσθητης και εξειδικευμένης LC-MS/MS μεθόδου για την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση πολλαπλών αλλεργιογόνων πρωτεϊνών αυγού και γάλακτος σε σύνθετα τρόφιμα τα οποία έχουν μεγάλο ποσοστό επεξεργασίας. Ο συνδυασμός της επιλογής κατάλληλων πεπτιδίων-δεικτών με τη χρήση ισοτοπικά επισημασμένων εσωτερικών προτύπων επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό ιχνών αλλεργιογόνων, συμβάλλοντας στη διαχείριση του κινδύνου διασταυρούμενης επιμόλυνσης στη βιομηχανία τροφίμων (Fan, 2023).

Η μελέτη των Vergara-Barberán et al., παρουσιάζει μια καινοτόμο μέθοδο απταμερικής εκχύλισης στερεάς φάσης σε σύζευξη με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση-φασματομετρία μάζας (AA-SPE-CE-MS) για τον καθαρισμό, τη συμπύκνωση, το διαχωρισμό και το χαρακτηρισμό της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης β-λακτογλοβουλίνης (β-LG) του γάλακτος σε δείγματα τροφίμων. Το προσροφητικό υλικό για την πλήρωση των μικροφυσιγγίων SPE παρασκευάστηκε με ακινητοποίηση ενός απταμερούς έναντι της β-

LG σε σωματίδια μαγνητικών χαντρών. Μετά από βελτιστοποίηση της μεθόδου SPE-CE-MS, το δείγμα (περίπου 75  $\mu\text{L}$ ) φορτώθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (BGE, 2 M οξικό οξύ pH 2.2), ενώ για την έκλυση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 100 mM  $\text{NH}_4\text{OH}$  (pH 11.2) (περίπου 100 nL). Η γραμμικότητα της μεθόδου κυμάνθηκε μεταξύ 0.1 και 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  και το όριο ανίχνευσης (LOD) ήταν 0.05  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , δηλαδή 200 φορές χαμηλότερο από ό,τι με CE-MS. Η μέθοδος ήταν επαναλήψιμη όσον αφορά τη σχετική τυπική απόκλιση (RSD) για τους χρόνους μετανάστευσης και τις περιοχές κορυφής (<0.5% και 2.4%, αντίστοιχα) και η διάρκεια ζωής του μικροφυσίγγιου ήταν περισσότερες από 25 αναλύσεις. Η εφαρμοσιμότητα της μεθόδου για τον προσδιορισμό χαμηλών επιπέδων  $\beta$ -LG αποδείχθηκε με την ανάλυση τροφίμων χωρίς γάλα (δηλαδή μια σοκολάτα 100% κακάο, ένα υποαλλεργικό παρασκεύασμα για βρέφη και ένα λευκό ψωμί χωρίς γαλακτοκομικά) και λευκών ψωμιών που περιέχουν γάλα. Τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά σε όλες τις περιπτώσεις, αποδεικνύοντας έτσι τις μεγάλες δυνατότητες της αναπτυχθείσας μεθόδου για ακριβή ασφάλεια και έλεγχο ποιότητας των τροφίμων. Η αξιοποίηση του απταμερούς υψηλής εξειδίκευσης και συγγένειας έναντι της  $\beta$ -LG επέτρεψε την επιλεκτική απομόνωση, συμπίκνωση και MS ανίχνευση των πρωτεομορφών της πρωτεΐνης σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ακόμη και από σύνθετα υποστρώματα τροφίμων, αποφεύγοντας ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω της ακριβούς ταυτοποίησης με MS. Οι ικανοποιητικές ανακτήσεις (83–94%) και RSD (<5.3% για χρόνους μετανάστευσης και <5.2% για εμβαδά κορυφής) σε εμβολιασμένες μήτρες τροφίμων χωρίς γάλα επιβεβαίωσαν την αποτελεσματικότητα και επιλεκτικότητα του προσροφητικού υλικού AA. Επιπλέον, η ανίχνευση χαμηλών επιπέδων (0.0101 mg ανά g δείγματος) μη δηλωμένης  $\beta$ -LG σε δείγμα ψωμιού ανέδειξε τη σημασία της μεθόδου για την πρόληψη αλλεργικών αντιδράσεων. Συνολικά, η παρούσα μελέτη καταδεικνύει τις εξαιρετικές δυνατότητες της AA-SPE-CE-MS ως μιας πολλά υποσχόμενης προσέγγισης για τον ακριβή προσδιορισμό και ποσοτικοποίηση ιχνών  $\beta$ -LG σε σύνθετες μήτρες, ξεπερνώντας τους βασικούς περιορισμούς των τυπικών τεχνικών χωρίς MS (Vergara-Barberan, 2023).





**Εικόνα 6** Α) ηλεκτροφερογραφήματα ιόντων εκχύλισης (EIE) για την ανάλυση CE-MS πρότυπου διαλύματος 50  $\mu\text{L}$ –1  $\beta$ -LG· Β) EIE για την ανάλυση AA-SPE-CE-MS πρότυπου διαλύματος 1  $\mu\text{L}$ –1  $\beta$ -LG· γ) φάσμα μάζας (κατά CE-MS) στο χρονικό παράθυρο της κορυφής  $\beta$ -LG (περίπου 3 λεπτά)· και δ) αποσπειροειδές φάσμα μάζας (κατά CE-MS). ( $E_r$  (ppm) =  $\kappa$ .  $\frac{\text{πειραματικό} - M_{r(\text{theoretical})}}{M_{r(\text{theoretical})}} \times 106$ ). (πηγή: Vergana -Barberan, 2023)

Η μελέτη των Chenetal., περιγράφει την ανάπτυξη μιας μη ανοσολογικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλλεργιογόνου  $\beta$ -καζεΐνης αγελαδινού γάλακτος σε ψημένες μήτρες τροφίμων με υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης σε σύζευξη με φασματομετρία μάζας τριπλού τετραπόλου (UPLC-TQ-MS/MS) σε λειτουργία παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων. Συγκρίθηκαν οκτώ από τα δέκα θεωρητικά πεπτίδια από την  $\beta$ -καζεΐνη μετά από πέψη με θρυψίνη και αναπτύχθηκαν μέθοδοι παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων με σκοπό τον προσδιορισμό πέντε χαρακτηριστικών πεπτιδίων. Το πεπτίδιο VLPVPQK επιλέχθηκε ως το χαρακτηριστικό πεπτίδιο για την αγελαδινή  $\beta$ -καζεΐνη λόγω της υψηλής ευαισθησίας. Σχεδιάστηκε ένα σταθερά ισοτοπικά επισημασμένο εσωτερικό πρότυπο για τη ρύθμιση της αστάθειας της προκατεργασίας του δείγματος και του ιονισμού που προκαλείται από την επίδραση υποστρώματος. Χρησιμοποιώντας την παρούσα μέθοδο πέψης εναιωρήματος, η φυσική και η μετουσιωμένη  $\beta$ -καζεΐνη θα μπορούσαν να πεφθούν για την απελευθέρωση του χαρακτηριστικού πεπτιδίου στο μέγιστο βαθμό. Η μέθοδος UPLC-TQ-MS/MS που αναπτύχθηκε με βάση ένα χαρακτηριστικό πεπτίδιο θρυψίνης οδήγησε σε έναν αξιόπιστο



προσδιορισμό της αλλεργιογόνου β-καζεΐνης αγελαδινού γάλακτος σε ψημένες μήτρες τροφίμων σε χαμηλό επίπεδο ποσοτικοποίησης έως 500  $\mu\text{gkg}^{-1}$  με ικανοποιητική ακρίβεια (<8,9%) και ανάκτηση ( $98,8\% \pm 2,6\%$  έως  $106,7\% \pm 3,0\%$ ). Η επιλογή των κατάλληλων χαρακτηριστικών αλλεργιογόνων πεπτιδίων ήταν κρίσιμο βήμα για την ανάπτυξη μιας μεθόδου MS και περιελάμβανε την αξιολόγηση αποκλειστικότητας αλληλουχίας, ευαισθησίας και σταθερότητας με *in silico* και *in vitro* πειράματα. Διερευνήθηκαν τρεις στρατηγικές εσωτερικών προτύπων, με την επισημασμένη με βαρέα ισότοπα μακρά πεπτιδική αλληλουχία να αποδεικνύεται βέλτιστη επιλογή. Επίσης, έγινε βελτιστοποίηση της προκατεργασίας του δείγματος, με τη μέθοδο πέψης εναιωρήματος να επιτυγχάνει ποσοτικοποίηση τόσο της διαλυτής όσο και της αδιάλυτης β-καζεΐνης. Η επικύρωση περιελάμβανε αξιολόγηση γραμμικότητας, ορίων ποσοτικοποίησης, ανάκτησης και ακρίβειας, με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Συνολικά, η μέθοδος UPLC-TQ-MS/MS παρείχε μια προσέγγιση για τον ποσοτικό προσδιορισμό ιχνών της αλλεργιογόνου β-καζεΐνης σε επεξεργασμένα τρόφιμα η οποία είχε μεγάλα ποσοστά ακρίβειας απόδοσης. Ο συνδυασμός βέλτιστων πεπτιδίων-στόχων, σταθερά επισημασμένων εσωτερικών προτύπων και βελτιωμένων πρωτοκόλλων προκατεργασίας δειγμάτων επιτρέπει την αξιόπιστη ανίχνευση μετουσιωμένων πρωτεϊνών, ξεπερνώντας τους περιορισμούς των παραδοσιακών ανοσοχημικών δοκιμών (Chen, 2015).

Η δημοσίευση των Hosteltler et al., επικεντρώνεται στην ανάπτυξη και επικύρωση μίας μεθόδου υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS) για τον ποσοτικό προσδιορισμό αλλεργιογόνων καζεΐνης σε βρεφικά γάλατα εκτεταμένης υδρόλυσης καζεΐνης. Η καζεΐνη αποτελεί το κύριο αλλεργιογόνο του γάλακτος και η παρουσία της σε υποαλλεργικά γάλατα μπορεί να προκαλέσει ανοσολογικές αντιδράσεις σε ευαισθητοποιημένα βρέφη. Η προτεινόμενη μέθοδος βασίζεται στην ποσοτικοποίηση πεπτιδικών δεικτών από τις πρωτεΐνες  $\alpha\text{s}1$ -καζεΐνη και  $\alpha\text{s}2$ -καζεΐνη, χρησιμοποιώντας εξωτερική καμπύλη βαθμονόμησης με πρότυπα άπαχου γάλακτος σε σκόνη. Η δειγματοπροληπτική προετοιμασία περιλαμβάνει εκχύλιση με ρυθμιστικό διάλυμα διοξυχολικού νατρίου και όξινου ανθρακικού αμμωνίου στους  $60^\circ\text{C}$ , αποπρωτεϊνοποίηση με στήλες 7 kDa, πέψη με θρυψίνη και κατακρήμνιση με οξύ πριν την ανάλυση. Βάσει τριών πεπτιδικών δεικτών, το γραμμικό εύρος ποσοτικοποίησης της καζεΐνης ήταν 1.8-42

μg/g γάλακτος σε σκόνη, με όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) 1.8 μg/g. Οι συντελεστές συσχέτισης (R<sup>2</sup>) των καμπυλών βαθμονόμησης ήταν  $\geq 0.99$ . Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ήταν  $\leq 22\%$  RSD και η ενδιάμεση ακρίβεια  $\leq 23\%$  RSD. Η ανάκτηση καζεΐνης από το εμπλουτισμένο υλικό (2-20 μg/g) κυμάνθηκε από 78% έως 118%. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η προτεινόμενη μέθοδος LC-MS/MS μπορεί να χρησιμοποιηθεί αξιόπιστα για την επιβεβαίωση της παρουσίας αλλεργιογόνων καζεΐνης σε υποαλλεργικά βρεφικά γάλατα. Η εφαρμογή της μπορεί να συμβάλλει στη διασφάλιση της ποιότητας και ασφάλειας αυτών των προϊόντων για τα αλλεργικά στο γάλα βρέφη (Hosteleter, 2021).

**Πίνακας 7 Συγκεντρωτικός Πίνακας χαρακτηριστικών των μελετών που χρησιμοποιούν Φασματομετρία μάζας και υγρή χρωματογραφία για την ανίχνευση αλλεργιογόνων στα γαλακτοκομικά προϊόντα.**

Μελέτη	Έτος	Αναλυτική Προσέγγιση	Αναλύτες/Στόχοι	Όρια Ανίχνευσης/Ποσοτικοποίησης	Μεθοδολογική Καινοτομία	Αναλυτική Απόδοση/Πλεονεκτήματα
Gomaaetal.	2015	Συγκριτική μελέτη ELISA, κυτταρομετρίας ροής και LC-MS	Καζεΐνη, πρωτεΐνη σόγιας, γλουτένη	10 ppm (καζεΐνη/σόγια) 100 ppm (γλουτένη)	Αξιολόγηση επίδρασης θερμικής επεξεργασίας στην ανίχνευση	- Ανακτήσεις ELISA 85-127% σε ωμό μείγμα - Μείωση 52-95% μετά από θερμική επεξεργασία - Συγκριτική αξιολόγηση τριών μεθόδων
Biancoetal.	2022	RPLC-ESI-HRMS	α-S1-καζεΐνη, β-λακτογλοβουλίνη	22 μg/g υποστρώματος	Εκλεκτική ανίχνευση χαρακτηριστικών πεπτιδίων	- Ανάλυση σύνθετων τροφίμων με βάση το κρέας - Ανίχνευση μη δηλωμένων αλλεργιογόνων - Υψηλή ευαισθησία
Ramachandranetal.	2020	Parallel Reaction Monitoring	Καζεΐνη και	1 ppm σε μπισκότα	19 πεπτίδια-	- Ανθεκτικότητα

Μελέτη	Έτος	Αναλυτική Προσέγγιση	Αναλύτες/Στόχοι	Όρια Ανίχνευσης/Ποσοτικοποίησης	Μεθοδολογική Καινοτομία	Αναλυτική Απόδοση/Πλεονεκτήματα
		(PRM)	πρωτεΐνες ορού γάλακτος		δείκτες με bottom-up πρωτεωμική	στις επιδράσεις μήτρας - Βελτιστοποιημένη προετοιμασία δείγματος - Χρήση ζελατίνης ως φορέα
Qietal.	2019	UPLC-MS/MS με PHMN-Trypsin	αS1-, αS2-, β- και κ-καζεΐνη	0.38-0.83 µg/g	Ταχεία πέψη με ακινητοποιημένη θρυψίνη	- Χρόνος πέψης 15 λεπτά - Ανακτήσεις 65.2-86.1% - RSD < 11%
Guetal.	2018	LC-MS/MS με SPE MonoSpin PBA	8 αλλεργιογόνα συστατικά	0.2-0.4 µg/g (γάλα)	Βελτιστοποιημένη εκχύλιση στερεάς φάσης	- Ανακτήσεις 60.1-92.4% - Κάλυψη πρωτεϊνικής αλληλουχίας 70.8-93.3% - Εφαρμογή σε σοκολάτες
Fanetal.	2023	LC-MS/MS	Πολλαπλά αλλεργιογόνα γάλακτος/αυγού	0.94-56.71 mg/100g	Χρήση ισοτοπικά επισημασμένων προτύπων	- Γραμμικό εύρος: 0.5-5000.0 nmol/L - Ανακτήσεις: 76.7-122.8% - RSD: 1.60-15.60%
Vergara-Barberán et al.	2023	AA-SPE-CE-MS	β-λακτογλοβουλίνη	0.05 µg/mL	Απταμερική εκχύλιση με CE-MS	- 200x βελτίωση LOD vs CE-MS - Ανακτήσεις: 83-94% - >25 αναλύσεις/μικροφυσίγγιο
Chenetal.	2015	UPLC-TQ-MS/MS	β-καζεΐνη	500 µg/kg	Επιλογή πεπτιδίου VLPVPQK ως δείκτη	- Ακρίβεια <8.9% - Ανακτήσεις: 98.8-106.7% - Ανάλυση μετουσιωμένων

Μελέτη	Έτος	Αναλυτική Προσέγγιση	Αναλύτες/Στόχοι	Όρια Ανίχνευσης/Ποσοτικοποίησης	Μεθοδολογική Καινοτομία	Αναλυτική Απόδοση/Πλεονεκτήματα
						πρωτεϊνών
Hosteltler et al.	2021	LC-MS/MS	as1- και as2-καζεΐνη	LOQ: 1.8 µg/g	Εξωτερική βαθμονόμηση με πρότυπα γάλακτος	- Γραμμικό εύρος: 1.8-42 µg/g - Ανακτήσεις: 78-118% - RSD ≤23%

## 6.5 Μέθοδοι που βασίζονται στο DNA

Οι μέθοδοι ανίχνευσης αλλεργιογόνων με βάση το DNA έχουν προσελκύσει αυξανόμενο ενδιαφέρον λόγω της υψηλής τους ειδικότητας, ευαισθησίας, ανεξαρτησίας από πιθανές βιολογικές επιδράσεις που σχετίζονται με την παραγωγή αντισωμάτων και της υψηλής θερμικής σταθερότητας των μορίων DNA, παράγοντες οι οποίοι είναι ιδιαίτερα σημαντικοί για την ανάλυση επεξεργασμένων τροφίμων. Ως εκ τούτου, οι μέθοδοι που βασίζονται στο DNA έχουν αποδειχθεί εξαιρετικές εναλλακτικές λύσεις στις μεθόδους που βασίζονται σε πρωτεΐνες, ειδικά όταν αναλύονται ιδιαίτερα επεξεργασμένα τρόφιμα (Costa, 2017). Οι DNA στόχοι μπορεί να είναι γονίδια που κωδικοποιούν αλλεργιογόνες πρωτεΐνες ή άλλες ειδικές αλληλουχίες και, ως εκ τούτου, θεωρούνται έμμεσοι δείκτες της παρουσίας ενός αλλεργιογόνου συστατικού (Costa, 2017).

Οι περισσότερες από τις δημοσιευμένες εργασίες που χρησιμοποιούν μεθόδους βασισμένες στο DNA συνίστανται στην ενίσχυση αρχικών αλληλουχιών στόχων DNA με PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών, υπεύθυνων για την προσφορά υψηλού επιπέδου εξειδίκευσης στις δοκιμές (Mafra, 2008, Prado, 2016). Οι κύριες προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση αλλεργιογόνων είναι η PCR τελικού σημείου, η πολλαπλή PCR, η PCR πραγματικού χρόνου και η PCR-ELISA, αλλά πρόσφατα νέες πολλά υποσχόμενες εξελίξεις έχουν κερδίσει μεγάλο ενδιαφέρον, όπως η PCR πραγματικού χρόνου συζευγμένη με ανάλυση τήξης υψηλής ευκρίνειας (HRM), η ένθετη PCR πραγματικού χρόνου σε ένα σωλήνα, τα DNA arrays και οι γονιδιακοί αισθητήρες (genosensors). Η πλειονότητα των σχετικών δημοσιεύσεων, εφαρμόζει μεθόδους

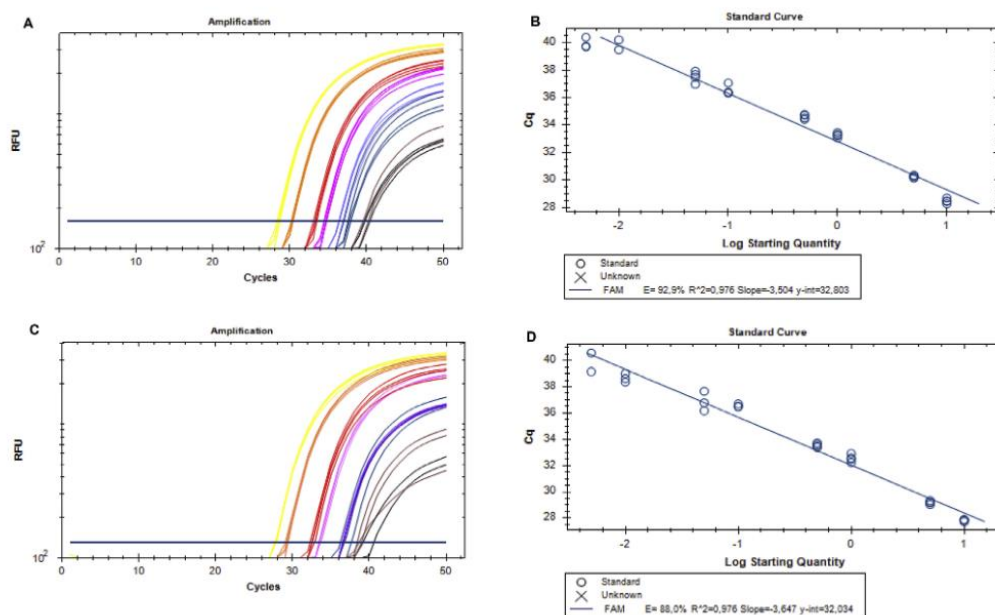
βασισμένες στο DNA για την πιστοποίηση γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως τα τυριά (Dalmasso, 2011) και για την ταυτοποίηση διαφορετικών ειδών σε γαλακτοκομικά προϊόντα (Zhang, 2007, De, 2011). Από την άλλη πλευρά, λίγες είναι οι μελέτες οι οποίες περιγράφουν την ανίχνευση αλλεργιογόνων γάλακτος σε τρόφιμα, με την PCR πραγματικού χρόνου να είναι η κύρια τεχνική που χρησιμοποιείται για αυτόν τον σκοπό. Οι μέθοδοι PCR πραγματικού χρόνου έχουν τα πλεονεκτήματα ότι παρέχουν ποσοτικά αποτελέσματα με επαρκές κόστος εγκατάστασης, εύλογο χρόνο εκτέλεσης και μέτριες απαιτήσεις για εξειδικευμένο εξοπλισμό και προσωπικό.

Οι Köppeletal., ανέπτυξαν 2 τετραπλά και 2 εξαπλά συστήματα PCR πραγματικού χρόνου με ευκίνητες TaqMan για την ταυτόχρονη ανίχνευση διαφόρων αλλεργιογόνων σε τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων των αλλεργιογόνων του γάλακτος (Πίνακας 5). Οι μέθοδοι επέδειξαν καλή εξειδίκευση με ευαισθησία έως 0,64 µg/mL βοοειδούς DNA (Koppel, 2010, Kopel, 2012). Επίσης στη μελέτη των Xiaoetal., επικεντρώνεται στην ανάπτυξη και επικύρωση μίας μεθόδου PCR πραγματικού χρόνου με τη χρήση ιχνηθέτη TaqMan Minor Groove Binder (MGB) για την ειδική ανίχνευση του γονιδίου της α-λακταλβουμίνης (α-LA) του βοοειδούς (Bostaurus) και την εφαρμογή της στην ανίχνευση αλλεργιογόνων γάλακτος σε εμπορικά τρόφιμα. Η προτεινόμενη μεθοδολογία παρουσίασε υψηλή εξειδίκευση για το γάλα αγελάδας, με σταθερή ανίχνευση 0.05 ng βοοειδούς DNA, επιδεικνύοντας σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των ανοσοχημικών μεθόδων ως προς την ευαισθησία, τη σταθερότητα και την ανθεκτικότητα σε έντονες θερμικές επεξεργασίες. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε 42 εμπορικά δείγματα τροφίμων με ή χωρίς δηλωμένη παρουσία γάλακτος, με τα αποτελέσματα να συμφωνούν πλήρως με τη σήμανση ως προς την παρουσία ή απουσία του αλλεργιογόνου. Συγκριτικά με προηγούμενες μελέτες που αξιοποιούσαν την PCR πραγματικού χρόνου για τον έλεγχο αλλεργιογόνων γάλακτος, η συγκεκριμένη ερευνητική προσπάθεια πέτυχε σημαντικά χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και υψηλότερη αξιοπιστία ακόμη και σε ιδιαίτερα επεξεργασμένα συνδυαστικά τρόφιμα (Xiao, 2016).

Η ερευνητική ομάδα των Villaetal., σε μία πιο πρόσφατη δημοσίευση, είχε σα στόχο την ανάπτυξη μίας μεθόδου PCR πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση και

ποσοτικοποίηση ιχνών αλλεργιογόνων πρωτεϊνών γάλακτος αγελάδας σε σύνθετα προϊόντα κρέατος. Η μελέτη περιλάμβανε εκτενή διερεύνηση και σύγκριση διαφορετικών μιτοχονδριακών (cytb και 12S rRNA) και πυρηνικών (γονίδια β-λακτογλοβουλίνης και β-καζεΐνης) γονιδιακών στόχων ως υποψήφιων έμμεσων δεικτών για την παρουσία γάλακτος. Η εκτενής πειραματική αξιολόγηση των εκκινητών σε ποιοτική PCR ανέδειξε τις περιοχές 12S rRNA, cytb, β-λακτογλοβουλίνης και β-καζεΐνης ως τις πιο ελπιδοφόρες ως προς την ευαισθησία, με όριο ανίχνευσης έως 0.01% συμπυκνώματος πρωτεϊνών γάλακτος (ΣΠΓ) σε προσομοιωμένα μίγματα ωμού κιμά και μαγειρεμένου ζαμπόν. Ωστόσο, η εφαρμογή των προσεγγίσεων σε real-time PCR κατέδειξε σημαντική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα των γονιδίων με διάφορα είδη κρέατος, καθιστώντας τα ακατάλληλα για ποσοτικούς σκοπούς. Η ανάπτυξη TaqMan ανιχνευτών σε μιτοχονδριακές αλληλουχίες βελτίωσε την εξειδίκευση, με το σύστημα 12S rRNA να αναδεικνύεται ως το βέλτιστο καθώς παρουσίασε οριακή αντιδραστικότητα μόνο με 2 είδη σε όψιμους κύκλους ενίσχυσης (>36). Το σύστημα παρείχε γραμμικό εύρος 10-0.005% ΣΠΓ σε ωμό κρέας και ζαμπόν με αποδεκτές αναλυτικές παραμέτρους απόδοσης, πλην της απόδοσης PCR (88%) σε επεξεργασμένα δείγματα (ENGL, 2015). Το όριο ανίχνευσης ορίστηκε στο 0.05% ΣΠΓ λόγω της παρατηρούμενης διασταυρούμενης αντίδρασης. Η ανάπτυξη μεθόδων υψηλής ευαισθησίας και εξειδίκευσης για τον εντοπισμό γάλακτος ως δυνητικού αλλεργιογόνου αποδείχθηκε ιδιαίτερα απαιτητική, καθώς η πλειονότητα προηγούμενων ερευνών επικεντρωνόταν στην πιστοποίηση γαλακτοκομικών (Villa, 2019).





**Εικόνα 7** Καμπύλες ενίσχυσης (A, C) και αντίστοιχες καμπύλες βαθμονόμησης (B, D) που λαμβάνονται με PCR σε πραγματικό χρόνο στοχεύοντας το μιτοχονδριακό γονίδιο 12S rRNA βοοειδών χρησιμοποιώντας τα δυαδικά μείγματα συμπυκνώματος πρωτεΐνης αγελαδινού γάλακτος (MPC) σε ωμό κρέας γαλοπούλας (A, B) και σε μαγειρεμένα χοιρομέρια (C, D) (10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,005% (w/ w)) (n = 4). (Πηγή: Villa, 2019)

Οι Planque et al., παρουσίασαν μία καινοτόμο μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης συζευγμένης με φασματομετρία μαζών (UHPLC-MS/MS) για την ταυτόχρονη ανίχνευση ιχνών αλλεργιογόνων πρωτεϊνών γάλακτος (καζεΐνες, ορού), αυγού (λευκού, κρόκου), σόγιας και φιστικιού σε σύνθετα και επεξεργασμένα τρόφιμα. Η μεθοδολογία βασίζεται σε ένα ενιαίο πρωτόκολλο προετοιμασίας των δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένης εκχύλισης και καθαρισμού, εφαρμόσιμο σε διαφορετικά τρόφιμα όπως σοκολάτα, παγωτό, σάλτσα ντομάτας και μπισκότα. Η επιλογή πεπτιδικών δεικτών επιτεύχθηκε μέσω επισταμένης θεωρητικής και πειραματικής αξιολόγησης εστιάζοντας, εκτός από την εξειδίκευση, στη σταθερότητα έναντι της θερμικής επεξεργασίας. Για την πιστοποίηση της ευαισθησίας της μεθόδου, εφαρμόστηκε ένα εύρος προ-προσδιορισμένων επιπέδων αλλεργιογόνων σε εμβολιασμένα ή επεξεργασμένα δείγματα των μητρών-στόχων, παρέχοντας ενιαίο όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) 0.5 mg/kg για καζεΐνες, 5 mg/kg για πρωτεΐνες ορού, 3.4 mg/kg για πρωτεΐνες λευκού αυγού, 30.8 mg/kg για πρωτεΐνες κρόκου αυγού, 2.5 mg/kg για σόγια και 5 mg/kg για φιστίκι. Τα



καταγεγραμμένα LOQ υποδεικνύουν μία σημαντική βελτίωση της ευαισθησίας έναντι υφιστάμενων LC-MS/MS μεθόδων για πρωτεΐνες ορού γάλακτος και κρόκου αυγού, καθώς και την καταλληλότητα της μεθόδου ως προς τα προτεινόμενα όρια VITAL για τις περισσότερες αλλεργιογόνες πρωτεΐνες. Η ευθυγράμμιση του σήματος MS με τη συγκέντρωση του αλλεργιογόνου ήταν ικανοποιητική στις περισσότερες περιπτώσεις, καταδεικνύοντας την αξιοπιστία της προσέγγισης παρά την απουσία εσωτερικού προτύπου (Planqueetal., 2016).

Η ερευνητική μελέτη των Wangetal., είχε σα στόχο την ανάπτυξη μιας ταχείας ανοσοχρωματογραφικής μεθόδου πλευρικής ροής για την ανίχνευση της γλυκινίνης, ενός σημαντικού αλλεργιογόνου της σόγιας, σε σκόνη γάλακτος. Η προτεινόμενη μέθοδος βασίζεται στην αρχή της σάντουιτς ανοσοδοκιμασίας, χρησιμοποιώντας ένα μονοκλωνικό αντίσωμα (mAb) επισημασμένο με κολλοειδή χρυσό και ένα πολυκλωνικό αντίσωμα (pAb) για τη σύλληψη και ανίχνευση της πρωτεΐνης-στόχου, αντίστοιχα. Ο σημαντικότερος παράγοντας για την επιτυχία μιας ανοσοχρωματογραφικής μεθόδου πλευρικής ροής είναι η διαθεσιμότητα αντισωμάτων υψηλής εξειδίκευσης και επιθυμητής συγγένειας. Για το σκοπό αυτό, τα παραχθέντα mAb 2C3H5 κατά της γλυκινίνης χαρακτηρίστηκαν ως προς την υψηλή συγγένεια ( $K_a=4.27 \times 10^9$  L/mol) και ειδικότητα, καθώς δεν παρουσίασαν διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με άλλα αλλεργιογόνα της σόγιας (β-κογγλυκινίνη, αναστολέα της θρυψίνης και αγγλουτινίνη) στην ανάλυση Western blot. Για την αξιολόγηση της αξιοπιστίας της αναπτυχθείσας μεθόδου, πραγματοποιήθηκαν μελέτες ευαισθησίας, εξειδίκευσης και ανάκτησης σε δείγματα σκόνης γάλακτος εμβολιασμένα με γλυκινίνη. Το όριο ανίχνευσης προσδιορίστηκε στα 0.69 mg/kg με χρήση οπτικού σαρωτή πυκνότητας, γραμμική απόκριση στο εύρος 50-3200 ng/ml και μηδενική αντιδραστικότητα έναντι αλλεργιογόνων τόσο της σόγιας όσο και άλλων τροφίμων. Τέλος, οι ανακτήσεις της γλυκινίνης στα εμποτισμένα δείγματα κυμάνθηκαν από 80.5 έως 89.9%, με τους υψηλότερους συντελεστές μεταβλητότητας να κυμαίνονται από 5.29% (ενδο-δοκιμής) έως 6.72% (μεταξύ παρτίδων) (Wang, 2015).

**Πίνακας 8 Συγκεντρωτικός πίνακας χαρακτηριστικών μελετών οι οποίες χρησιμοποιούν μεθόδους που βασίζονται στο DNA για την ανίχνευση αλλεργιογόνων γαλακτοκομικών**

Μελέτη	Έτο ς	Αναλυτική Μεθοδολογία	Αναλύτες-Στόχοι	Όρια Ανίχνευσ ης	Μεθοδολογ ική Καινοτομία	Αναλυτικά Χαρακτηριστ ικά Απόδοσης
Köppelet al.	2010, 2012	Τετραπλά και εξαπλά συστήματα PCR πραγματικού χρόνου	Πολλαπλά αλλεργιογόνα συμπεριλαμβανομ ένων πρωτεϊνών γάλακτος	0,64 μg/mL βόειου DNA	Εφαρμογή πολυπλεκτικ ών συστημάτων ανιχνευτών TaqMan	- Επιτυχής ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών αλλεργιογόνω ν - Υψηλή εξειδίκευση για τις αλληλουχίες- στόχους - Επικύρωση σε διάφορες μήτρες τροφίμων
Xiaoetal.	2016	PCR πραγματικού χρόνου με ανιχνευτή TaqMan MGB	Γονίδιο α- λακταλβουμίνης (Bostaurus)	0,05 ng βόειου DNA	Καινοτόμος σχεδιασμός ανιχνευτή TaqMan MGB για είδος-ειδικό γονίδιο	- Ανώτερη θερμική σταθερότητα έναντι μεθόδων βασισμένων σε πρωτεΐνες - Επικύρωση σε 42 εμπορικά δείγματα - Ενισχυμένη ευαισθησία συγκριτικά με συμβατικές μεθόδους PCR
Villaetal.	2019	PCR πραγματικού χρόνου με πολλαπλούς γονιδιακούς στόχους	Μιτοχονδριακά (cytb, 12S rRNA) και πυρηνικά (β- LG, β-καζεΐνη) γονίδια	0,05% συμπύκν ωμα πρωτεϊνώ ν γάλακτος	Διεξοδική σύγκριση πυρηνικών και μιτοχονδρια κών στόχων	- Γραμμικό εύρος: 10- 0,005% ΣΠΓ - Απόδοση PCR: 88% σε επεξεργασμέν α δείγματα - Αξιολόγηση διασταυρούμε νης αντιδραστικότ ητας με πολλαπλά είδη

Μελέτη	Έτος	Αναλυτική Μεθοδολογία	Αναλύτες-Στόχοι	Όρια Ανίχνευσης	Μεθοδολογική Καινοτομία	Αναλυτικά Χαρακτηριστικά Απόδοσης
						κρέατος
Planqueetal.	2016	UHPLC-MS/MS	Πολλαπλές αλλεργιογόνες πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών γάλακτος	Καζεΐνες: 0,5 mg/kg Πρωτεΐνες ορού: 5 mg/kg	Ενοποιημένο πρωτόκολλο προετοιμασίας δειγμάτων για πολλαπλά αλλεργιογόνα	- Εναρμόνιση LOQ με επίπεδα δράσης VITAL - Επικύρωση σε σύνθετες μήτρες τροφίμων - Ενισχυμένη ευαισθησία για πρωτεΐνες ορού
Wangetal.	2015	Ανοσοχρωματογραφία πλευρικής ροής	Γλυκινίνη σε σκόνη γάλακτος	0,69 mg/kg	Μονοκλωνικό αντίσωμα υψηλής συγγένειας (K <sub>a</sub> =4,27×10 <sup>9</sup> L/mol)	- Γραμμική απόκριση: 50-3200 ng/mL - Ποσοστά ανάκτησης: 80,5-89,9% - CV: 5,29-6,72%

## Κεφάλαιο 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και η σύγκριση της απόδοσης των αναλυτικών μεθόδων οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό αλλεργιογόνων ουσιών οι οποίες εμφανίζονται στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Πιο συγκεκριμένα οι ανοσοχημικές μέθοδοι ELISA, όπως καταδεικνύεται από τις μελέτες των Deckwartetal. (2014) και de Luisetal. (2009), επικεντρώνονται πρωτίστως στην ανίχνευση καζεϊνών και β-λακτογλοβουλίνης, επιτυγχάνοντας όρια ανίχνευσης στην περιοχή 0,05-200 μg/L. Η εξέλιξη των μεθόδων ELISA χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη εξειδικευμένων προσεγγίσεων σάντουιτς και ανταγωνιστικών μεθόδων, με τη μέθοδο σάντουιτς να επιδεικνύει υπεροχή στην εξειδίκευση και ευαισθησία. Στον τομέα των βιοαισθητήρων, η έρευνα των Ashleyetal. (2018) και Kilic et al. (2020) καταδεικνύει σημαντική πρόοδο στην ανάπτυξη εξειδικευμένων συστημάτων ανίχνευσης. Η χρήση νανοσωματιδίων

μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών (nanoMIPs) και βολταμετρικών τεχνικών έχει οδηγήσει σε εξαιρετικά χαμηλά όρια ανίχνευσης της τάξης των pg/mL για την α-καζεΐνη και α-λακταλβουμίνη. Οι τεχνικές φασματομετρίας μάζας, όπως παρουσιάζονται στις εργασίες των Bianco et al. (2022) και Ramachandran et al. (2020), προσφέρουν πολυπαραμετρική ανάλυση με ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών αλλεργιογόνων. Η εφαρμογή τεχνικών Parallel Reaction Monitoring (PRM) και RPLC-ESI-HRMS επιτυγχάνει ανίχνευση στην περιοχή 1-22 μg/g, με εξαιρετική εξειδίκευση στην ταυτοποίηση πεπτιδικών δεικτών.

Επίσης, αξιοσημείωτη τεχνολογική πρόοδος παρατηρείται στην ανάπτυξη μεθόδων DNA. Οι Xia et al. (2016) και Villa et al. (2019) εισήγαγαν καινοτόμες προσεγγίσεις PCR πραγματικού χρόνου με εξειδικευμένους ανιχνευτές TaqMan MGB, επιτυγχάνοντας εξαιρετική ευαισθησία (0,05 ng βόειου DNA) και υψηλή εξειδίκευση στην ανίχνευση γονιδίων-στόχων. Με βάση τα δεδομένα των μελετών που παρουσιάστηκαν στις αντίστοιχες παραγράφους, η μέση αναλυτική απόδοση ανά κατηγορία μεθόδων ήταν οι εξής:

- Ανοσοχημικές μέθοδοι: Μέσο LOD ~50 μg/L, ανακτήσεις 85-120%
- Βιοαισθητήρες: Μέσο LOD στην περιοχή pg/mL-ng/mL, ανακτήσεις 87-97%
- Φασματομετρία μάζας: LOQ 0,5-5 mg/kg για διάφορες πρωτεΐνες, ανακτήσεις 65-110%
- Μέθοδοι DNA: LOD 0,05-0,64 μg/mL βόειου DNA, γραμμικότητα στο εύρος 0,005-10%

Συγκριτικά πλεονεκτήματα παρατηρούνται στις συνδυαστικές προσεγγίσεις, όπως καταδεικνύεται από την έρευνα των Vergara-Barberán et al. (2023), όπου η σύζευξη απταμερικής εκχύλισης με CE-MS επιτυγχάνει βελτίωση κατά 200 φορές στο όριο ανίχνευσης συγκριτικά με συμβατικές τεχνικές CE-MS. Η ολοκληρωμένη αξιολόγηση των μεθοδολογικών προσεγγίσεων υποδεικνύει ότι η επιλογή της βέλτιστης αναλυτικής τεχνικής εξαρτάται από τις ειδικές απαιτήσεις της εκάστοτε εφαρμογής, συμπεριλαμβανομένων παραμέτρων όπως η πολυπλοκότητα της μήτρας, ο βαθμός επεξεργασίας του τροφίμου και οι απαιτούμενοι χρόνοι ανάλυσης.

Βάσει της συγκριτικής ανάλυσης των παρουσιαζόμενων μεθοδολογικών προσεγγίσεων, η αποτελεσματικότητα των τεχνικών ανίχνευσης αλλεργιογόνων γαλακτοκομικών προϊόντων μπορεί να αξιολογηθεί μέσω πολλαπλών παραμέτρων απόδοσης. Οι ανοσοχημικές μέθοδοι ELISA παρουσιάζουν σημαντική ευαισθησία, με όρια ανίχνευσης που κυμαίνονται από 10  $\mu\text{g/L}$  έως 200  $\mu\text{g/L}$  (Deckwartetal., 2014). Ωστόσο, η αποτελεσματικότητά τους επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμική επεξεργασία, με μειώσεις ανάκτησης έως και 95% σε επεξεργασμένα δείγματα (Gomaaetal., 2015). Οι βιοαισθητήρες, ιδιαίτερα οι απταμερικοί, επιδεικνύουν εξαιρετική ευαισθησία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο ηλεκτροχημικός απταισθητήρας των Lettierietal. (2020) με LOD 0,053  $\mu\text{g/L}$ , ενώ ο απταισθητήρας των Eissaetal. (2017) επιτυγχάνει ανίχνευση στα 20  $\text{pg/mL}$ . Η υψηλή εξειδίκευση και η σταθερότητα των απταμερών προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των αντισωμάτων. Οι τεχνικές φασματομετρίας μάζας παρουσιάζουν αξιοσημείωτη αναλυτική ικανότητα, με τη μέθοδο UHPLC-MS/MS των Planqueetal. (2016) να επιτυγχάνει LOQ 0,5  $\text{mg/kg}$  για καζεΐνες. Ιδιαίτερα σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί η δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλαπλών αλλεργιογόνων και η αξιοπιστία σε σύνθετες μήτρες τροφίμων. Οι μέθοδοι βασισμένες στο DNA, όπως η real-time PCR των Xiaoetal. (2016), επιτυγχάνουν εξαιρετικά χαμηλά όρια ανίχνευσης (0,05  $\text{ng}$  βόειου DNA) και παρουσιάζουν υψηλή ανθεκτικότητα στη θερμική επεξεργασία. Ωστόσο, η έμμεση συσχέτιση με την ποσότητα των πρωτεϊνικών αλλεργιογόνων αποτελεί περιορισμό.

Συμπερασματικά, η επιλογή της βέλτιστης μεθόδου εξαρτάται από το συγκεκριμένο αναλυτικό πλαίσιο:

1. Για ταχεία ανάλυση ρουτίνας: Οι τεχνικές ELISA παραμένουν πρακτικές και οικονομικά αποδοτικές.
2. Για υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση: Οι απταμερικοίβιοαισθητήρες προσφέρουν εξαιρετική απόδοση.
3. Για πολύπλοκες μήτρες και επεξεργασμένα τρόφιμα: Η LC-MS/MS αποτελεί την πλέον αξιόπιστη επιλογή.
4. Για επεξεργασμένα προϊόντα: Οι μέθοδοι DNA παρέχουν αξιόπιστη ανίχνευση.

Η υιοθέτηση συμπληρωματικών τεχνικών, συνδυάζοντας για παράδειγμα LC-MS/MS με απταμερικούς βιοαισθητήρες, θα μπορούσε να προσφέρει τη βέλτιστη αναλυτική προσέγγιση, συνδυάζοντας υψηλή ευαισθησία, εξειδίκευση και αξιοπιστία στην ανίχνευση αλλεργιογόνων γαλακτοκομικών προϊόντων.

Η ανησυχία σχετικά με την αλλεργία στο γάλα έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία έτη, κυρίως επειδή η πλειονότητα των προσβεβλημένων ατόμων είναι βρέφη ηλικίας κάτω των 3 ετών. Δεδομένου ότι επί του παρόντος δεν υπάρχει θεραπεία για τις τροφικές αλλεργίες, τα ευαισθητοποιημένα άτομα είναι υποχρεωμένα να αποφεύγουν τα γαλακτοκομικά προϊόντα και όλα τα τρόφιμα που περιέχουν παράγωγα γάλακτος. Σε περίπτωση τυχαίας έκθεσης, διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα (H1- και H2-αντιισταμινικά, β2-αγωνιστές ή γλυκοκορτικοστεροειδή) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανακούφιση των κλινικών συμπτωμάτων που σχετίζονται με τις ανεπιθύμητες ανοσολογικές αποκρίσεις, αν και η επινεφρίνη χρησιμοποιείται συνήθως για τη θεραπεία πολύ σοβαρών και απειλητικών για τη ζωή αλλεργικών αντιδράσεων (αναφυλαξία) (Abrams, 2020).

Από την άλλη πλευρά, κάποιες πρόσφατες εξελίξεις έχουν σημειωθεί στην ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών για τη θεραπεία της αλλεργίας στο γάλα και την πρόκληση ανοχής στους αλλεργικούς ασθενείς. Η ανοσοθεραπεία από του στόματος φαίνεται να αποτελεί μια υποσχόμενη προσέγγιση, με ποσοστό επιτυχίας που κυμαίνεται από 37% έως 70%. Μια άλλη προσέγγιση επικεντρώνεται στη μείωση της αλλεργιογονικότητας του γάλακτος μέσω της χρήσης νέων τεχνολογιών επεξεργασίας τροφίμων. Η επεξεργασία προκαλεί αλλαγές στις πρωτεΐνες του γάλακτος που μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την ευαισθησία τους στη γαστρεντερική πέψη, την κινητική απορρόφησης και, κατά συνέπεια, την ανοσοαντιδραστικότητά τους (Abrams, 2020). Για τη βελτίωση της προστασίας των καταναλωτών και τη διασφάλιση της ποιότητας ζωής των ευαισθητοποιημένων ατόμων, έχουν θεσπιστεί διάφοροι κανονισμοί και οδηγίες που καθιστούν υποχρεωτική τη σήμανση των δυνητικά αλλεργιογόνων συστατικών/τροφίμων, συμπεριλαμβανομένου του γάλακτος. Συνεπώς, η ανάπτυξη μεθοδολογιών για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση αλλεργιογόνων είναι επιτακτική για την εφαρμογή των κανονισμών επισήμανσης και τον έλεγχο της παρουσίας κρυφών αλλεργιογόνων συστατικών.

Οι μέθοδοι ELISA έχουν παράσχει ευαίσθητες και ειδικές τεχνικές για την ανίχνευση πρωτεϊνών γάλακτος σε τρόφιμα, παρότι περιορίζονται σημαντικά από την επεξεργασία τροφίμων που μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Έχουν επίσης εφαρμοστεί ανοσοαισθητήρες, οι οποίοι παρέχουν ταχεία, επαναλήψιμη και δυννητικά πλήρως αυτοματοποιημένη ανάλυση. Οι πλατφόρμες φασματομετρίας μάζας, όπως η LC-MS/MS, έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητά τους στην ανίχνευση αλλεργιογόνων πρωτεϊνών και πεπτιδίων γάλακτος, ενώ οι μέθοδοι που βασίζονται στο DNA, παρά το γεγονός ότι αποτελούν έμμεσες προσεγγίσεις ανίχνευσης, θεωρούνται αποτελεσματικές εναλλακτικές λύσεις, καθώς επηρεάζονται λιγότερο από την επεξεργασία των τροφίμων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η διερεύνηση των σύγχρονων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό αλλεργιογόνων στα γαλακτοκομικά προϊόντα με βάση τα πρόσφατα δεδομένα της βιβλιογραφίας, καταδεικνύει μια σημαντική πρόοδο στην ανάπτυξη εξειδικευμένων και ευαίσθητων τεχνικών ανίχνευσης. Η συγκριτική αξιολόγηση των μεθοδολογικών προσεγγίσεων αναδεικνύει ότι οι ανοσοχημικές μέθοδοι ELISA, παρά τους περιορισμούς τους στην ανίχνευση θερμικά επεξεργασμένων πρωτεϊνών, παραμένουν χρήσιμες για τον έλεγχο ρουτίνας, ενώ οι καινοτόμοι απταμερικοίβιοαισθητήρες επιδεικνύουν εξαιρετική ευαισθησία στην κλίμακα pg/mL. Οι τεχνικές φασματομετρίας μάζας, ιδιαίτερα η LC-MS/MS, προσφέρουν αξιοσημείωτα πλεονεκτήματα στην ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών αλλεργιογόνων σε σύνθετες μήτρες τροφίμων, ενώ οι μέθοδοι που βασίζονται στο DNA παρουσιάζουν υψηλή ανθεκτικότητα στη θερμική επεξεργασία. Η συνδυαστική χρήση συμπληρωματικών τεχνικών, προσφέρει βελτιστοποιημένη αναλυτική απόδοση, υποδεικνύοντας ότι η μελλοντική κατεύθυνση στην ανάλυση αλλεργιογόνων θα πρέπει να επικεντρωθεί στην ανάπτυξη ολοκληρωμένων πλατφορμών που συνδυάζουν πολλαπλές τεχνικές ανίχνευσης. Η επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου θα πρέπει να βασίζεται στις ειδικές απαιτήσεις της εκάστοτε εφαρμογής, λαμβάνοντας υπόψη παραμέτρους όπως η πολυπλοκότητα της μήτρας, ο βαθμός επεξεργασίας του τροφίμου, οι απαιτούμενοι χρόνοι



ανάλυσης και το κόστος, με απώτερο στόχο τη διασφάλιση της ασφάλειας των καταναλωτών με αλλεργίες στα γαλακτοκομικά προϊόντα.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abrams, E. M., Kim, H., Gerdt, J., & Protudjer, J. L. P. (2020). Milk allergy most burdensome in multi-food allergic children. *Pediatric Allergy and Immunology*, 31(7), 827-834.
- Alm, J. S., Swartz, J., Björkstén, B., Engstrand, L., Engström, J., Kühn, I., Lilja, G., Möllby, R., Norin, E., & Pershagen, G. (2002). An anthroposophic lifestyle and intestinal microflora in infancy. *Pediatric Allergy and Immunology*, 13(6), 402-411.
- Ashley, J., Shukor, Y., D'Aurelio, R., Trinh, L., Rodgers, T., Temblay, J., Pleasants, M., & Tothill, I. E. (2018). Synthesis of MIP nanoparticles for  $\alpha$ -casein detection using SPR as a milk allergen sensor. *Acs Sensors*. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00850>
- Bianco, M., Calvano, C. D., Ventura, G., Losito, I., & Cataldi, T. R. (2022). Determination of hidden milk allergens in meat-based foodstuffs by liquid chromatography coupled to electrospray ionization and high-resolution tandem mass spectrometry. *Food Control*, 131, 108443. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108443>
- Billakanti, J. M., Fee, C. J., Lane, F. R., Kash, A. S., & Fredericks, R. (2010). Simultaneous, quantitative detection of five whey proteins in multiple samples by surface plasmon resonance. *International Dairy Journal*, 20(2), 96-105. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.08.008>
- Bock, S. A. (2010). AAAAI support of the EAACI Position Paper on IgG4. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(6), 1410.
- Bohle, B., Zwölfer, B., Heratizadeh, A., Jahn-Schmid, B., Antonia, Y. D., Alter, M., Keller, W., Zuidmeer, L., van Ree, R., & Werfel, T. (2006). Cooking birch pollen-related food:

- Divergent consequences for IgE-and T cell-mediated reactivity in vitro and in vivo. *Journal of allergy and clinical immunology*, 118(1), 242–249.
- Boyce, J. A., Assa'ad, A., Burks, A. W., Jones, S. M., Sampson, H. A., Wood, R. A., Plaut, M., Cooper, S. F., Fenton, M. J., & Arshad, S. H. (2011). Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: Summary of the NIAID-sponsored expert panel report. *Journal of Pediatric Nursing*, 26(3), e2–e17.
- Breiteneder, H., & Clare Mills, E. (2013). Food Allergens—Molecular and Immunological Characteristics. *Food Allergy: Adverse Reactions to Foods and Food Additives*, 47–67.
- Brożek, J., Terracciano, L., Hsu, J., Kreis, J., Compalati, E., Santesso, N., Fiocchi, A., & Schünemann, H. (2012). Oral immunotherapy for IgE-mediated cow's milk allergy: A systematic review and meta-analysis. *Clinical & Experimental Allergy*, 42(3), 363–374. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2011.03948.x>
- Bu, G., Luo, Y., Chen, F., Liu, K., & Zhu, T. (2013). Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: A mini-review. *Dairy science & technology*, 93, 211–223.
- Chen, Q., Zhang, J., Ke, X., Lai, S., Tao, B., Yang, J., Mo, W., & Ren, Y. (2015). Quantification of bovine  $\beta$ -casein allergen in baked foodstuffs based on ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(1), 25–34. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.990994>
- Chen, Z., Li, H., Jia, W., Liu, X., Li, Z., Wen, F., Zheng, N., Jiang, J., & Xu, D. (2017). Bivalent aptasensor based on silver-enhanced fluorescence polarization for rapid detection of lactoferrin in milk. *Analytical chemistry*, 89(11), 5900–5908. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00261>
- Cheng, S., Yang, Y., Ni, X., Peng, J., & Lai, W. (2017). Fluorescent microspheres lateral flow assay for sensitive detection of the milk allergen casein. *Food and Agricultural Immunology*, 28(6), 1017–1028. <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1325841>
- Chinnasamy, T., Segerink, L. I., Nystrand, M., Gantelius, J., & Svahn, H. A. (2014). A lateral flow paper microarray for rapid allergy point of care diagnostics. *Analyst*, 139(10), 2348–2354. <https://doi.org/10.1039/c3an01806g>

- Constantin, C., Quirce, S., Poorafshar, M., Touraev, A., Niggemann, B., Mari, A., Ebner, C., Akerström, H., Heberle-Bors, E., & Nystrand, M. (2009). Micro-arrayed wheat seed and grass pollen allergens for component-resolved diagnosis. *Allergy*, 64(7), 1030–1037. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.01955.x>
- Costa, J., Fernandes, T. J., Villa, C., Oliveira, M., & Mafra, I. (2017). Advances in food allergen analysis. *Food safety: Innovative analytical tools for safety assessment*, 305–360.
- Costa, J., Mafra, I., Carrapatoso, I., & Oliveira, M. B. P. (2016). Hazelnut allergens: Molecular characterization, detection, and clinical relevance. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(15), 2579–2605. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.826173>
- Dalmasso, A., Civera, T., La Neve, F., & Bottero, M. T. (2011). Simultaneous detection of cow and buffalo milk in mozzarella cheese by Real-Time PCR assay. *Food Chemistry*, 124(1), 362–366. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.017>
- Damodaran, S., & Li, Y. (2017). A two-step enzymatic modification method to reduce immuno-reactivity of milk proteins. *Food Chemistry*, 237, 724–732. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.152>
- De, S., Brahma, B., Polley, S., Mukherjee, A., Banerjee, D., Gohaina, M., Singh, K. P., Singh, R., Datta, T. K., & Goswami, S. L. (2011). Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle and buffalo milk and cheese. *Food Control*, 22(5), 690–696. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.026>
- Deckwart, M., Carstens, C., Webber-Witt, M., Schäfer, V., Eichhorn, L., Kang, S., Fischer, M., Brockow, K., Christmann, M., & Paschke-Kratzin, A. (2014). Development of a sensitive ELISA for the detection of casein-containing fining agents in red and white wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(28), 6803–6812. <https://doi.org/10.1021/jf5006098>
- Deeth, H. C. (2006). Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. *International Dairy Journal*, 16(6), 555–562. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.08.011>
- Diaz-Amigo, C. (2010). Towards a comprehensive validation of ELISA kits for food allergens. Case 2—Milk. *Food Analytical Methods*, 3(4), 351–356.

- Do, A. B., Williams, K., & Toomer, O. T. (2016). In vitro digestibility and immunoreactivity of bovine milk proteins. *Food Chemistry*, 190, 581–587.
- Dos Anjos, F., Machado, A., Ferro, C., Otto, F., & Bogin, E. (1998). Gamma-glutamyltransferase as a marker for the pasteurization of raw milk. *Journal of food protection*, 61(8), 1057–1059.
- Downs, M. L., & Taylor, S. L. (2010). Effects of thermal processing on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of milk residues in a model food matrix. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10085–10091. <https://doi.org/10.1021/jf101718f>
- Du Toit, G., Roberts, G., Sayre, P. H., Plaut, M., Bahnson, H. T., Mitchell, H., Radulovic, S., Chan, S., Fox, A., & Turcanu, V. (2013). Identifying infants at high risk of peanut allergy: The Learning Early About Peanut Allergy (LEAP) screening study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(1), 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.09.015>
- Durham, S. R., Gould, H. J., Thienes, C. P., Jacobson, M. R., Masuyama, K., Rak, S., Lowhagen, O., Schotman, E., Cameron, L., & Hamid, Q. A. (1997). Expression of  $\epsilon$  germ-line gene transcripts and mRNA for the  $\epsilon$  heavy chain of IgE in nasal B cells and the effects of topical corticosteroid. *European journal of immunology*, 27(11), 2899–2906.
- Eckl-Dorna, J., Pree, I., Reisinger, J., Marth, K., Chen, K., Vrtala, S., Spitzauer, S., Valenta, R., & Niederberger, V. (2012). The majority of allergen-specific IgE in the blood of allergic patients does not originate from blood-derived B cells or plasma cells. *Clinical & Experimental Allergy*, 42(9), 1347–1355. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2012.04030.x>
- Eissa, S., Tlili, C., L'Hocine, L., & Zourob, M. (2012). Electrochemical immunosensor for the milk allergen  $\beta$ -lactoglobulin based on electrografting of organic film on graphene modified screen-printed carbon electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 38(1), 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.06.008>
- Eissa, S., & Zourob, M. (2017). In vitro selection of DNA aptamers targeting  $\beta$ -lactoglobulin and their integration in graphene-based biosensor for the detection of milk

- allergen.*Biosensors and Bioelectronics*, 91, 169–174.<https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.12.020>
- El-Agamy, E. (2007). The challenge of cow milk protein allergy.*Small Ruminant Research*, 68(1–2), 64–72.<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.016>
- Fan, S., Ma, J., Liu, Z., Ning, Y., Cao, M., Li, Q., & Zhang, Y. (2023). Determination of egg and milk allergen in food products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on signature peptides and isotope-labeled internal standard.*Food Science and Human Wellness*, 12(3), 728–736.<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.09.006>
- Fiocchi, A., Brozek, J., Schünemann, H., Bahna, S. L., von Berg, A., Beyer, K., Bozzola, M., Bradsher, J., Compalati, E., & Ebisawa, M. (2010). World Allergy Organization (WAO) diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (DRACMA) guidelines.*World Allergy Organization Journal*, 3(4), 57–161.<https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3181defeb9>
- Fisher, H., Du Toit, G., & Lack, G. (2011). Specific oral tolerance induction in food allergic children: Is oral desensitisation more effective than allergen avoidance?: A meta-analysis of published RCTs.*Archives of disease in childhood*, 96(3), 259–264.<https://doi.org/10.1136/adc.2009.172460>
- Flicker, S., Gadermaier, E., Madritsch, C., & Valenta, R. (2011). Passive immunization with allergen-specific antibodies.*Vaccines against Allergies*, 141–159.[https://doi.org/10.1007/82\\_2011\\_143](https://doi.org/10.1007/82_2011_143)
- Fox, P., & Kelly, A. (2006). Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 1.*International Dairy Journal*, 16(6), 500–516.
- Galan-Malo, P., López, M., Ortiz, J.-C., Pérez, M. D., Sánchez, L., Razquin, P., & Mata, L. (2017). Detection of egg and milk residues on working surfaces by ELISA and lateral flow immunoassay tests.*Food control*, 74, 45–53.<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.027>
- Gaucheron, F. (2005). The minerals of milk.*Reproduction Nutrition Development*, 45(4), 473–483.<https://doi.org/10.1051/rnd:2005030>

- Gomaa, A., & Boye, J. (2015a). Impact of irradiation and thermal processing on the immunochemical detection of milk and egg allergens in foods. *Food research international*, 74, 275–283. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.023>
- Gomaa, A., & Boye, J. (2015b). Simultaneous detection of multi-allergens in an incurred food matrix using ELISA, multiplex flow cytometry and liquid chromatography mass spectrometry (LC–MS). *Food Chemistry*, 175, 585–592. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.017>
- Goulding, D., Fox, P., & O'Mahony, J. (2020). Milk proteins: An overview. *Milk proteins*, 21–98.
- Grammatikos, A. P. (2008). The genetic and environmental basis of atopic diseases. *Annals of medicine*, 40(7), 482–495. <https://doi.org/10.1080/07853890802082096>
- Gu, S., Chen, N., Zhou, Y., Zhao, C., Zhan, L., Qu, L., Cao, C., Han, L., Deng, X., & Ding, T. (2018). A rapid solid-phase extraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous screening of multiple allergens in chocolates. *Food Control*, 84, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.033>
- Hochwallner, H., Schulmeister, U., Swoboda, I., Spitzauer, S., & Valenta, R. (2014). Cow's milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. *Methods*, 66(1), 22–33.
- Holčapek, M., Jirásko, R., & Lída, M. (2012). Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A*, 1259, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.072>
- Ji, J., Zhu, P., Pi, F., Sun, C., Sun, J., Jia, M., Ying, C., Zhang, Y., & Sun, X. (2017). Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous detection of the main milk allergens. *Food Control*, 74, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.030>
- Johnson, P. E., Sancho, A. I., Crevel, R. W., & Mills, E. C. (2011). Detection of allergens in foods. Στο *Food allergens: Analysis instrumentation and methods* (σελ. 13–27). CRC Press, Taylor & Francis Group Boca Raton.

- Karlsson, M., Johansen, F., Kahu, H., Macpherson, A., & Brandtzaeg, P. (2010). Hypersensitivity and oral tolerance in the absence of a secretory immune system. *Allergy*, 65(5), 561–570.
- Khorshidian, N., Khanniri, E., Koushki, M. R., Sohrabvandi, S., & Yousefi, M. (2022). An overview of antimicrobial activity of lysozyme and its functionality in cheese. *Frontiers in nutrition*, 9, 833618.
- Kilic, T., Philipp, P. J., Giavedoni, P., & Carrara, S. (2020). Milk allergen detection: Sensitive label-free voltammetric immunosensor based on electropolymerization. *BioNanoScience*, 10, 512–522.
- Kleine-Tebbe, J., Wangorsch, A., Vogel, L., Crowell, D. N., Haustein, U.-F., & Vieths, S. (2002). Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1–related PR-10 protein in soybean, SAM22. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110(5), 797–804. <https://doi.org/10.1067/mai.2002.128946>
- Koczula, K. M., & Gallotta, A. (2016). Lateral flow assays. *Essays in biochemistry*, 60(1), 111–120. <https://doi.org/10.1042/EBC20150012>
- Köppel, R., Dvorak, V., Zimmerli, F., Breitenmoser, A., Eugster, A., & Waiblinger, H.-U. (2010). Two tetraplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from eight allergens in food. *European Food Research and Technology*, 230(3), 367–374. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1164-3>
- Köppel, R., van Velsen-Zimmerli, F., & Bucher, T. (2012). Two quantitative hexaplex real-time PCR systems for the detection and quantification of DNA from twelve allergens in food. *European Food Research and Technology*, 235(5), 843–852. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1806-8>
- Lack, G. (2012). Update on risk factors for food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(5), 1187–1197. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.02.036>
- Larché, M. (2011). T cell epitope-based allergy vaccines. *Vaccines against Allergies*, 107–119. [https://doi.org/10.1007/82\\_2011\\_131](https://doi.org/10.1007/82_2011_131)



- Larché, M., Akdis, C. A., & Valenta, R. (2006). Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 6(10), 761–771. <https://doi.org/10.1038/nri1934>
- Lettieri, M., Hosu, O., Adumitrachioaie, A., Cristea, C., & Marrazza, G. (2020). Beta-lactoglobulin electrochemical detection based with an innovative platform based on composite polymer. *Electroanalysis*, 32(2), 217–225. <https://doi.org/10.1002/elan.201900318>
- Linhart, B., & Valenta, R. (2012). Mechanisms underlying allergy vaccination with recombinant hypoallergenic allergen derivatives. *Vaccine*, 30(29), 4328–4335.
- Lopes, J. P., & Sicherer, S. (2020). Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and treatment. *Current opinion in immunology*, 66, 57–64.
- Losito, I., Introna, B., Monaci, L., Minella, S., & Palmisano, F. (2013). Development of a method for the quantification of caseinate traces in Italian commercial white wines based on liquid chromatography–electrospray ionization–ion trap–mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(50), 12436–12444. <https://doi.org/10.1021/jf4034909>
- MacGibbon, A. (2020). Composition and structure of bovine milk lipids. *Advanced dairy chemistry, volume 2: lipids*, 1–32.
- Mafra, I., Ferreira, I. M., & Oliveira, M. B. P. (2008). Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, 227, 649–665. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0782-x>
- Malekzad, H., Jouyban, A., Hasanzadeh, M., Shadjou, N., & de la Guardia, M. (2017). Ensuring food safety using aptamer based assays: Electroanalytical approach. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 94, 77–94. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.07.001>
- Martorell-Aragónés, A., Echeverría-Zudaire, L., Alonso-Lebrero, E., Boné-Calvo, J., Martín-Muñoz, M., Nevot-Falcó, S., Piquer-Gibert, M., Valdesoiro-Navarrete, L., & allergy committee of SEICAP, F. (2015). Position document: IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergologia et immunopathologia*, 43(5), 507–526. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2015.01.003>

- Mehennaoui, S., Poorahong, S., Jimenez, G. C., & Siaj, M. (2019). Selection of high affinity aptamer-ligand for dexamethasone and its electrochemical biosensor. *Scientific reports*, 9(1), 6600.
- Mehta, B. M. (2015). Chemical composition of milk and milk products. *Handbook of food chemistry*, 511–553.
- Metcalfe, D. D., Sampson, H. A., Simon, R. A., & Lack, G. (2013). *Food allergy: Adverse reaction to foods and food additives*. John Wiley & Sons.
- Minic, R., & Zivkovic, I. (2020). Optimization, validation and standardization of ELISA. Στο *Norovirus* (σελ. 9–28). IntechOpen London, UK.
- Mojtabavi, N., Dekan, G., Stingl, G., & Epstein, M. M. (2002). Long-lived Th2 memory in experimental allergic asthma. *The Journal of Immunology*, 169(9), 4788–4796. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.9.4788>
- Montiel, V. R.-V., Campuzano, S., Conzuelo, F., Torrente-Rodríguez, R. M., Gamella, M., Reviejo, A., & Pingarrón, J. M. (2015). Electrochemical magnetoimmunosensing platform for determination of the milk allergen  $\beta$ -lactoglobulin. *Talanta*, 131, 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.076>
- Montiel, V. R.-V., Campuzano, S., Torrente-Rodríguez, R. M., Reviejo, A. J., & Pingarrón, J. M. (2016). Electrochemical magnetic beads-based immunosensing platform for the determination of  $\alpha$ -lactalbumin in milk. *Food Chemistry*, 213, 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.004>
- Niederberger, V., Ring, J., Rakoski, J., Jäger, S., Spitzauer, S., Valent, P., Horak, F., Kundi, M., & Valenta, R. (2007). Antigens drive memory IgE responses in human allergy via the nasal mucosa. *International archives of allergy and immunology*, 142(2), 133–144.
- Nielsen, S. S. (2002). Plasmin system and microbial proteases in milk: Characteristics, roles, and relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6628–6634. <https://doi.org/10.1021/jf0201881>
- Niessen, W. M. (2006). *Liquid chromatography-mass spectrometry*. CRC press.

- Picariello, G., Mamone, G., Addeo, F., & Ferranti, P. (2011). The frontiers of mass spectrometry-based techniques in food allergenomics. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7386–7398. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.033>
- Planque, M., Arnould, T., Dieu, M., Delahaut, P., Renard, P., & Gillard, N. (2016). Advances in ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for sensitive detection of several food allergens in complex and processed foodstuffs. *Journal of Chromatography A*, 1464, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.08.033>
- Prado, M., Ortea, I., Vial, S., Rivas, J., Calo-Mata, P., & Barros-Velázquez, J. (2016). Advanced DNA-and protein-based methods for the detection and investigation of food allergens. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(15), 2511–2542. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.873767>
- Prescott, S. L., Bouygue, G. R., Videky, D., & Fiocchi, A. (2010). Avoidance or exposure to foods in prevention and treatment of food allergy? *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 10(3), 258–266.
- Qi, K., Liu, T., Yang, Y., Zhang, J., Yin, J., Ding, X., Qin, W., & Yang, Y. (2019). A rapid immobilized trypsin digestion combined with liquid chromatography–Tandem mass spectrometry for the detection of milk allergens in baked food. *Food Control*, 102, 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.03.017>
- Qiu, Y., Tang, Y., Li, B., Gu, C., & He, M. (2018). Aptamer-based detection of melamine in milk using an evanescent wave fiber sensor. *Analytical Methods*, 10(40), 4871–4878. <https://doi.org/10.1039/C8AY01594E>
- Rajakulendran, M., Tham, E. H., Soh, J. Y., & Van Bever, H. (2018). Novel strategies in immunotherapy for allergic diseases. *Asia Pacific Allergy*, 8(2), e14. <https://doi.org/10.5415/apallergy.2018.8.e14>
- Ramachandran, B., Yang, C. T., & Downs, M. L. (2020). Parallel reaction monitoring mass spectrometry method for detection of both casein and whey milk allergens from a baked food matrix. *Journal of proteome research*, 19(8), 2964–2976. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00844>

- Rebe Raz, S., Liu, H., Norde, W., & Bremer, M. G. (2010). Food allergens profiling with an imaging surface plasmon resonance-based biosensor. *Analytical Chemistry*, 82(20), 8485–8491. <https://doi.org/10.1021/ac101819g>
- Reisinger, J., Triendl, A., K  chler, E., Bohle, B., Krauth, M. T., Rauter, I., Valent, P., Koenig, F., Valenta, R., & Niederberger, V. (2005). IFN- $\gamma$ -enhanced allergen penetration across respiratory epithelium augments allergic inflammation. *Journal of allergy and clinical immunology*, 115(5), 973–981.
- Robb, D. B., Covey, T. R., & Bruins, A. P. (2000). Atmospheric pressure photoionization: An ionization method for liquid chromatography– mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 72(15), 3653–3659. <https://doi.org/10.1021/ac0001636>
- Ross, G. M., Salentijn, G. I., & Nielen, M. W. (2019). A critical comparison between flow-through and lateral flow immunoassay formats for visual and smartphone-based multiplex allergen detection. *Biosensors*, 9(4), 143. <https://doi.org/10.3390/bios9040143>
- Sassolas, A., Blum, L. J., & Leca-Bouvier, B. D. (2009). Electrochemical aptasensors. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 21(11), 1237–1250. <https://doi.org/10.1002/elan.200804554>
- Sena-Torralba, A., Gabald  n-Atienza, J., Cubells-G  mez, A., Casino, P., Maquieira,   ., & Morais, S. (2022). Lateral Flow Microimmunoassay (LF $\mu$ IA) for the Reliable Quantification of Allergen Traces in Food Consumables. *Biosensors*, 12(11), 980.
- Shah, K., & Maghsoudlou, P. (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): The basics. *British journal of hospital medicine*, 77(7), C98–C101. <https://doi.org/10.12968/hmed.2016.77.7.C98>
- Shi, M., Cen, Y., Sohail, M., Xu, G., Wei, F., Ma, Y., Xu, X., Ma, Y., Song, Y., & Hu, Q. (2018). Aptamer based fluorometric  $\beta$ -lactoglobulin assay based on the use of magnetic nanoparticles and carbon dots. *Microchimica Acta*, 185, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2569-5>

- Tah, A., Olmos Cordero, J. M., Weng, X., & Neethirajan, S. (2018). Aptamer-based biosensor for food allergen determination using graphene oxide/gold nanocomposite on a paper-assisted analytical device. *BioRxiv*, 343368.
- Taylor, S. L., & Baumert, J. L. (2015). Worldwide food allergy labeling and detection of allergens in processed foods. *Food allergy: Molecular basis and clinical practice*, 101, 227–234. <https://doi.org/10.1159/000373910>
- Taylor, S. L., Baumert, J. L., Kruizinga, A. G., Remington, B. C., Crevel, R. W., Brooke-Taylor, S., Allen, K. J., of Australia, T. A. B., & Houben, G. (2014). Establishment of reference doses for residues of allergenic foods: Report of the VITAL expert panel. *Food and Chemical Toxicology*, 63, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.032>
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosensors and bioelectronics*, 16(1–2), 121–131. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)
- Török, K., Hajas, L., Horváth, V., Schall, E., Bugyi, Z., Kemény, S., & Tömösközi, S. (2015). Identification of the factors affecting the analytical results of food allergen ELISA methods. *European Food Research and Technology*, 241, 127–136. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2441-y>
- Tunick, M. H., & Van Hekken, D. L. (2015). Dairy products and health: Recent insights. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(43), 9381–9388.
- Valenta, R., Ferreira, F., Focke-Tejkl, M., Linhart, B., Niederberger, V., Swoboda, I., & Vrtala, S. (2009). From allergen genes to allergy vaccines. *Annual review of immunology*, 28(1), 211–241.
- Valenta, R., Hochwallner, H., Linhart, B., & Pahr, S. (2015). Food allergies: The basics. *Gastroenterology*, 148(6), 1120–1131.
- Valenta, R., & Kraft, D. (1996). *Type I allergic reactions to plant-derived food: A consequence of primary sensitization to pollen allergens*. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(96\)80062-5](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(96)80062-5)

- Valenta, R., Linhart, B., Swoboda, I., & Niederberger, V. (2011). Recombinant allergens for allergen-specific immunotherapy: 10 years anniversary of immunotherapy with recombinant allergens. *Allergy*, 66(6), 775–783. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02565.x>
- Vasilescu, A., Nunes, G., Hayat, A., Latif, U., & Marty, J.-L. (2016). Electrochemical affinity biosensors based on disposable screen-printed electrodes for detection of food allergens. *Sensors*, 16(11), 1863. <https://doi.org/10.3390/s16111863>
- Vergara-Barberán, M., Simó-Alfonso, E. F., Herrero-Martínez, J. M., & Benavente, F. (2023). Accurate determination of the milk protein allergen  $\beta$ -lactoglobulin by on-line aptamer affinity solid-phase extraction capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Talanta*, 259, 124542. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124542>
- Vickery, B. P., Scurlock, A. M., Kulis, M., Steele, P. H., Kamilaris, J., Berglund, J. P., Burk, C., Hiegel, A., Carlisle, S., & Christie, L. (2014). Sustained unresponsiveness to peanut in subjects who have completed peanut oral immunotherapy. *Journal of allergy and clinical immunology*, 133(2), 468–475. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.11.007>
- Villa, C., Costa, J., Oliveira, M. B. P., & Mafra, I. (2020). Cow's milk allergens: Screening gene markers for the detection of milk ingredients in complex meat products. *Food Control*, 108, 106823. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106823>
- Vriezinga, S. L., Auricchio, R., Bravi, E., Castillejo, G., Chmielewska, A., Crespo Escobar, P., Kolaček, S., Koletzko, S., Korponay-Szabo, I. R., & Mummert, E. (2014). Randomized feeding intervention in infants at high risk for celiac disease. *New England Journal of Medicine*, 371(14), 1304–1315. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1404172>
- Wang, Y., Deng, R., Zhang, G., Li, Q., Yang, J., Sun, Y., Li, Z., & Hu, X. (2015). Rapid and sensitive detection of the food allergen glycinin in powdered milk using a lateral flow colloidal gold immunoassay strip test. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 63(8), 2172–2178. <https://doi.org/10.1021/jf5052128>
- Warren, C. M., Jiang, J., & Gupta, R. S. (2020). Epidemiology and burden of food allergy. *Current allergy and asthma reports*, 20, 1–9.

- Xiao, G., Qin, C., Wenju, Z., & Qin, C. (2016). Development of a real-time quantitative PCR assay using a TaqMan minor groove binder probe for the detection of  $\alpha$ -lactalbumin in food. *Journal of dairy science*, 99(3), 1716–1724. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10255>
- Yu, F., Li, H., Sun, W., Zhao, Y., Xu, D., & He, F. (2019). Selection of aptamers against Lactoferrin based on silver enhanced and fluorescence-activated cell sorting. *Talanta*, 193, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.063>
- Yunginger, J. W., Ahlstedt, S., Eggleston, P. A., Homburger, H. A., Nelson, H. S., Ownby, D. R., Platts-Mills, T. A., Sampson, H. A., Sicherer, S. H., & Weinstein, A. M. (2000). Quantitative IgE antibody assays in allergic diseases. *Journal of allergy and clinical immunology*, 105(6), 1077–1084. <https://doi.org/10.1067/mai.2000.107041>
- Zamberlin, Š., Antunac, N., Havranek, J., & Samaržija, D. (2012). Mineral elements in milk and dairy products. *Mljekarstvo: časopis za unaprijeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, 62(2), 111–125.
- Zhang, C.-L., Fowler, M. R., Scott, N. W., Lawson, G., & Slater, A. (2007). A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food control*, 18(9), 1149–1158. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.07.018>



Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.